

بسمه تعالی

جهاد دانشگاهی

پژوهشگاه رویان

مرکز زیست فناوری رویان

عنوان طرح:

تولید رده سلولی CHO DG44 ترشح کننده داروی نو ترکیب داربی پوتین آلفا

مجری طرح:

دکتر امیر امیری یکتا

همکاران:

سیده هدی جزایری، زهرا هلفی نژاد، عباس دانشی پور، فاطمه هاشمی نژاد و ریحانه لهراسبی

تاریخ

۱۴۰۲/۰۸/۲۸

خلاصه طرح:

داربی پوئتین آلفا یک پروتئین تحریک کننده بیوسنتز اریتروپوئتین است که در دسته‌ی فاکتورهای رشد هماتوپوئتیک قرار می‌گیرد. از این پروتئین نوترکیب دارویی برای درمان انواع آنمی از جمله کم خونی‌های ایجاد شده به واسطه‌ی بیماری‌های مزمن کلیوی، شیمی‌درمانی و ایدز استفاده می‌شود. با توجه به اینکه مصرف اریتروپویتین در دراز مدت منجر به ایجاد مقاومت در پاسخ به این دارو می‌شود، مولکول داربی پوئتین آلفا می‌تواند این نقص را جبران نموده و جایگزین مناسبی برای خونسازی در بیماران مبتلا به کم خونی باشد. در این تحقیق برای به دست آوردن این داروی نوترکیب انسانی، توالی ژنی مولکول مذکور تهیه و در وکتور بیانی درج می‌شود. در مرحله بعد، ترنسفکشن لاین سلولی CHO توسط وکتور نوترکیب، غربالگری سلول‌های ترنسفورم شده در محیط انتخابی و تایید مولکولی درج سازه ژنی در لاین سلولی انجام می‌شود. سپس میزان بیان ژن اندازه‌گیری و سلول‌های دارای بیان بالاتر انتخاب و بیان آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. در مرحله بعد، لاین دارای بیان بالا و پایدار در مقیاس بیشتر از مرحله قبل کشت داده شده و سپس فرایند خالص سازی اولیه در مقیاس آزمایشگاهی و همچنین تست‌های کنترل کیفی پروتئین هدف انجام می‌شود.

فصل اول

کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه

زیست داروها یا محصولات دارویی با منشا بیولوژیکی^۱ به عنوان مواد پیشگیری کننده و درمانی شناخته می شوند که از منابع بیولوژیکی مانند اندامها، بافتها میکروارگانیسمها یا سلولهای حیوانی به دست می آیند. رشد سریع محصولات زیست دارویی با توجه به عملکرد بهتر، عوارض جانبی کمتر و احتمال موفقیت بیشتر در درمان بیماریها نسبت به داروها و مولکولهای شیمیایی باعث شده علیرغم پیچیده بودن و پرهزینه بودن پروسه تولید، تلاشهای گستردهای جهت توسعه آنها انجام شود. طی سی سال گذشته صنعت زیست دارو^۲ از فناوری^۳ DNAی نو ترکیب بهره ی بسیاری برده است و این فناوری زمینه را برای تولید طیف وسیعی از پروتئینهای طبیعی و اصلاح شده در مقیاس بزرگ فراهم ساخته است (۲). زیست داروها شامل دسته متنوعی از محصولات مانند واکسنها، مونوکلونال آنتی بادیها، و پروتئینهای نو ترکیب درمانی می باشند. بطور کلی پروتئینهای نو ترکیب یک سوم کل داروهای در حال توسعه را تشکیل داده اند و تقاضا برای آنها به طور پیوسته در حال افزایش است، به طوری که پیش بینی می شود بازار فروش آنها از ۱/۶۵۴ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۷ به ۲/۸۵۰ میلیارد دلار در سال ۲۰۲۲ برسد.

در این بین داروی اریتروپوئین نو ترکیب انسانی با توجه به اهمیت این پروتئین در درمان کم خونی مرتبط با نارسایی مزمن کلیوی، سرطان و عفونت HIV، و در جراحیها برای کاهش انتقال خون آلوژنیک^۴ به عنوان یکی از اولین پروتئینهای نو ترکیب تولید شده است. تولید EPO نو ترکیب انسانی در سال ۱۹۸۳ میلادی در *E. coli* و در سال ۱۹۸۶ میلادی در سلول CHO^۵ آغاز گردید (۳۱، ۳۲). پس از دو سال آزمایش بر روی انسان، در نهایت

^۱ Biopharmaceutical

^۲ Biopharmaceutical

^۳ Deoxyribonucleic Acid

^۴ allogeneic

^۵ Chinese Hamster Ovary

در سال ۱۹۸۸ میلادی، این پروتئین نوترکیب مجوز FDA^۶ را دریافت کرد (۳۳). نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی بر روی ساختارهای قندی اریتروپوئین که در ارتباط با نیمه عمر آن در خون، چگونگی اتصال آن به رسپتور و فعالیت بیولوژیکی آن می باشد، سبب شد تا داربی پوئین آلفا در سال ۲۰۰۱ میلادی جهت درمان آنمی، به دلیل اثر ماندگارتر و صرفه جویی در زمان و هزینه های مصرفی بیماران به عنوان داروی جایگزین rhEPO معرفی شود (۲۳). داربی پوئین آلفا در سال ۲۰۰۴ میلادی به عنوان داروی موثر درمان کم خونی در بیماران درگیر با سرطان غیرمیلوئید نیز معرفی شد (۳۴).

طی تحقیقات انجام شده در سال ۲۰۱۷ میلادی مشخص شد که شیوع بیماری کم خونی مرتبط با نارسایی مزمن کلیوی در ایران حدوداً دو برابر بیشتر از شدت گسترش آن در سطح جهانی می باشد. یکی از مهم ترین عوارض این بیماری، کم خونی بوده که سبب ایجاد علائمی مانند خستگی، بی حالی، ضعف، بی اشتها، اختلال در خواب و در موارد شدیدتر باعث مرگ فرد می شود. در حال حاضر به منظور درمان این عارضه در کشور از rhEPO^۷ استفاده می گردد (۴-۶). با توجه به مزیت های درمان آنمی با داربی پوئین آلفا نسبت به rhEPO و عدم تولید این داروی نوترکیب در کشور، حرکت در جهت تولید آن می تواند نقش مهمی در درمان کم خونی برای افراد مبتلا به CKD^۸، HIV^۹ و یا سرطان های غیرمیلوئید داشته باشد.

^۶ Food and Drug Administration

^۷ Recombinant Human Erythropoietin

^۸ Chronic Kidney Disease

^۹ Human Immunodeficiency Virus

۱-۲- بیان مسئله

۱-۲-۱- بررسی مولکول مورد مطالعه

۱-۱-۲-۱- اریتروپوئتین

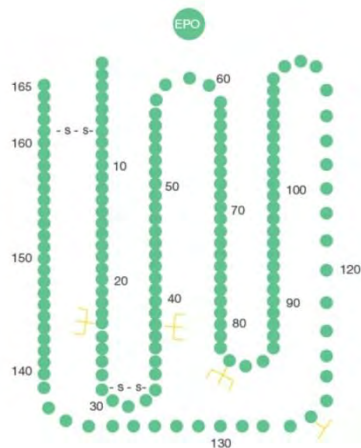
در سال ۱۹۴۸ میلادی، اریتروپوئتین به عنوان هورمون تحریک کننده اریتروپوئیز معرفی گردید (۵). این مولکول در پاسخ به کاهش سطح اکسیژن بافتی از سلول‌های پری‌توبولار کلیه به درون خون ترشح شده و سپس به رسپتورهای اختصاصی خود بر سطح سلول‌های پیش‌ساز اریتروسیتی در مغز استخوان متصل و با فعال کردن مسیر درون سلولی JAK/STAT^{۱۰}، موجب تکثیر و تمایز اریتروسیت‌های نابالغ به اریتروسیت‌های بالغ می‌شود. در نتیجه‌ی این فرایند، افزایش سطح هماتوکریت خون را خواهیم داشت (۱۰).

جایگاه ژنی این مولکول بر روی بازوی بلند کروموزم شماره‌ی ۷، دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون بوده که ۶۰٪ وزن پروتئین تولید شده از این ژن را ۱۶۶ آمینواسید و ۴۰٪ آن را زنجیره‌های قندی تشکیل می‌دهند (۶-۸). این گلیکوپروتئینی ۳۰/۴ کیلودالتونی، دارای سه جایگاه N-گلیکوزیلاسیون بر روی آمینو اسیدهای آسپارژین با شماره‌های ۲۴، ۳۸ و ۸۳ و یک جایگاه O-گلیکوزیلاسیون بر روی آمینو اسید سرین شماره‌ی ۱۲۶ می‌باشد. طی تغییرات پس از ترجمه و قرارگرفتن زنجیره‌های قندی بر روی پایه‌ی پروتئینی این مولکول، انتهای هر زنجیره در جایگاه‌های N-گلیکوزیلاسیون بین ۲ تا ۴ سیالیک اسید و جایگاه O-گلیکوزیلاسیون، ۰ تا ۲ سیالیک اسید قرار می‌گیرد. بطور کلی ایزوفرم‌های مختلف hEPO^{۱۱} می‌تواند بین ۶ تا ۱۴ سیالیک اسید را در ساختار خود حمل کند. ساختار سوم فضایی این مولکول به صورت ۴ مارپیچ آلفای ناهمسو بوده که توسط چند لوپ به یکدیگر

^{۱۰} Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription

^{۱۱} Human Erythropoietin

متصل شده‌اند. علاوه بر آن دو باند دی‌سولفید در این ساختار، سبب پایداری و حفظ فعالیت زیستی این مولکول می‌شوند (شکل ۱-۱) (۹).



شکل ۱-۲- ساختار اریتروپوئتین انسانی. این مولکول دارای سه جایگاه N-گلیکوزیلاسیون، یک جایگاه O-گلیکوزیلاسیون و دو باند دی‌سولفید می‌باشد.

داروی اریتروپوئتین از ابتدا در دسته داروهای بیماران خاص قرار گرفت و مهم‌ترین مورد مصرف این دارو برای بیماران همودیالیز است این دارو در درمان افراد مبتلا به بیماری مزمن کلیوی (CKD) که یک بیماری پیش‌رونده است و یکی از علائم مهم آن ایجاد کم‌خونی به دلیل کاهش بیان هورمون اریتروپوئتین در بدن می‌باشد، ایجاد می‌شود. این بیماری از هفدهمین عامل اصلی مرگ در جهان به رده دوازدهم صعود کرده‌است. درمان قطعی برای درمان این بیماری وجود ندارد اما این بیماران برای زندگی بیشتر و بهتر مجبور به تزریق داروی اریتروپوئتین، انجام دیالیز و پیوند کلیه هستند. باتوجه به نتایج مثبت دریافت شده از اریتروپوئتین نو ترکیب در اصلاح کم‌خونی و همچنین اهمیت کنترل آنمی در بیماران، در حال حاضر از این هورمون علاوه بر درمان کم‌خونی ناشی از CKD، در بهبود آنمی برگرفته از عفونت‌هایی مانند HIV و کم‌خونی پس از جراحی نیز استفاده می‌شود. همچنین این

دارو به منظور جبران آنمی ناشی از شیمی‌درمانی، در بیماران مبتلا به سرطان‌های غیرمیلوئید نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱-۱۶).

۱-۲-۱-۲- داربی پوئین آلفا

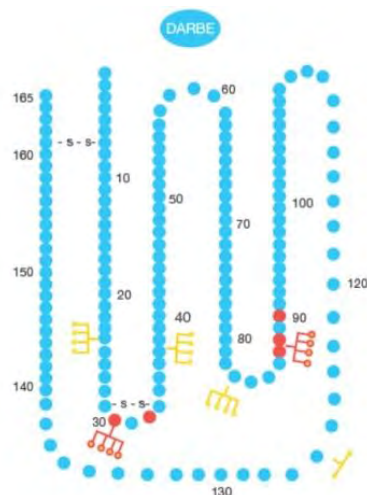
بخش کربوهیدراتی مولکول‌های گلیکوپروتئینی نقش‌های متفاوتی در ترشح، میزان حلالیت، پایداری، مدت زمان فعال بودن و نیمه‌عمر ایفا می‌کند (۱۷، ۱۸). حذف سیالیک اسید از EPO و یا rhEPO سبب افزایش فعالیت آن‌ها در شرایط *In Vitro* و به دلیل جمع‌آوری سریع این مولکول‌ها توسط رسپتورهای کبدی asialoglycoprotein از جریان خون، سبب کاهش شدید فعالیت آن‌ها در شرایط *In Vivo* می‌شود (۱۹، ۲۰). تحقیقات انجام شده در اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰ میلادی نشان داد که ایزوفرم‌های مختلف اریتروپوئین در شرایط درون سلولی، قدرت بیولوژیکی متفاوتی را از خود نشان می‌دهند. نتایج این مطالعات نشان داد که فعالیت بیولوژیکی و نیمه‌عمر، در ایزوفرم دارای ۱۴ سیالیک اسید نسبت به ایزوفرم دارای ۶ سیالیک اسید بیشتر بوده، و حذف آن از خون با سرعت کمتری اتفاق می‌افتد (۲۱). علاوه بر این، آزمایش‌ها انجام شده بر روی ایزوفرم‌های مختلف این مولکول مشخص کرد که کاهش تعداد سیالیک اسید در اریتروپوئین سبب افزایش تمایل آن به رسپتور اختصاصی این مولکول در سلول‌های پیش‌ساز اریتروسیتی می‌شود (۲۲). بطور کلی این مشاهدات مشخص نمود که تعداد سیالیک اسید حمل شده توسط مولکول اریتروپوئین، رابطه‌ی مستقیمی با نیمه‌عمر و قدرت بیولوژیکی آن در خون دارد.

بر این اساس و با استفاده از روش Site-direct mutagenesis، آنالوگ‌های متفاوتی از اریتروپوئین که دارای تعداد زنجیره‌ی کربوهیدرات بیشتر بودند تهیه و از نظر نیمه‌عمر، اتصال به رسپتور و فعالیت بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. از میان تمامی آنالوگ‌ها، NM279 و NM321 به ترتیب با ۴ و ۵ جایگاه N- گلیکوزیلاسیون جهت انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند. سپس مطالعات انجام شده نشان داد که آنالوگ دارای تعداد زنجیره‌ی

کربوهیدراتی و سیالیک اسید بیشتر، دارای نیمه عمر و فعالیت بیولوژیکی بالاتر و همچنین تمایل اتصال به رسپتور پایین تر بود. به همین جهت، NM321 با نام داربی پوئتین آلفا جهت انجام تحقیقات بعدی انتخاب شد (۹).

این مولکول با نام پروتئین تحریک کننده ی اریتروپوئیزس جدید (NESP^{۱۲}) یا داربی پوئتین آلفا دارای تغییر در ۵ آمینو اسید نسبت به ساختار rhEPO (Pro90Thr, Trp88Asn, Pro87Val, His32Thr, Aln30Asn). تفاوت های آمینو اسیدی داربی پوئتین آلفا با rhEPO سبب شده تا دو جایگاه جدید N-گلیکوزیلاسیون در محل آمینو اسیدهای آسپارژین ۳۰ و ۸۸ به ساختار این مولکول اضافه گردد. وجود این جایگاه ها، پتانسیل اتصال سیالیک اسید را در این مولکول تا ۲۲ عدد افزایش می دهد. ژن داربی پوئتین آلفا دارای ۵۸۲ نوکلئیک اسید بوده و پروتئین ساخته شده از آن حاوی ۱۶۵ آمینو اسید می باشد. همچنین ۵۲ درصد از وزن مولکولی این پروتئین ۳۷ کیلودالتونی را زنجیره های کربوهیدراتی تشکیل می دهند (شکل ۱-۲) (۹).

باتوجه به اینکه تغییر ۵ آمینو اسید در توالی پروتئینی داربی پوئتین آلفا، ساختار سوم آن را تحت تاثیر قرار نداده، این مولکول توانایی اتصال به رسپتورهای اختصاصی اریتروپوئتین در سطح سلول های پیش ساز اریتروسیتی را دارا بوده و می تواند از طریق فعال کردن مسیر درون سلولی JAK/STAT رونویسی از ژن های تکثیر و تمایز این سلول ها را فعال و درنهایت سبب افزایش سطح هماتوکریت خون شود (۱۰).



^{۱۲} Novel Erythropoiesis Stimulating Protein

شکل ۱-۲- ساختار مولکول داربی پوئتین آلفا. داربی پوئتین آلفا یک مولکول مهندسی شده از اریتروپوئتین بوده که دارای ۵ جایگاه N-گلیکوزیلاسیون و یک جایگاه O-گلیکوزیلاسیون می باشد و می تواند تا ۲۲ عدد سیالیک اسید را در ساختار خود حمل کند.

۱-۲-۳ مزایای استفاده از داربی پوئتین آلفا

داربی پوئتین آلفا دارای نیمه عمری حدوداً ۳ برابر بیشتر از rhEPO در جریان خون می باشد (۲۵). همین امر سبب شده تا تزریق این دارو با در نظر گرفتن میزان پیشروی بیماری در افرادی که از داربی پوئتین آلفا به منظور درمان آنمی استفاده می کنند، به صورت هفتگی و یا هر دو هفته یک بار انجام گیرد. افزایش میزان سیالیک اسید در NESP سبب شده تا حذف آن از طریق کبد و کلیه حدوداً ۵۰ تا ۶۰ درصد آرام تر از اریتروپوئتین نو ترکیب انجام گیرد و در نتیجه، فعالیت بیولوژیکی این مولکول در شرایط *In Vivo* افزایش یابد. علاوه بر نتایج مطالعات انجام شده، داده های فارماکوکینتیکی نیز نشان داده اند که با تزریق دوز کمتری از داربی پوئتین آلفا نسبت به rhEPO می توان به پاسخی مشابه در بدن بیماران دست پیدا نمود (۹).

جدول ۱-۱- مقایسه اریتروپوئتین و داربی پوئتین آلفا.

داربی پوئتین آلفا	اریتروپوئتین	موارد مورد نظر
۲۲ عدد	۱۴ عدد	حداکثر تعداد سیالیک اسید
۵۲٪	۴۰٪	درصد کربوهیدرات
۳۷ kDa	۳۰/۴ kDa	وزن مولکولی

نیمه عمر در خون	~ ۸/۵ ساعت	~ ۲۵/۳ ساعت
سرعت جدا شدن از EpoR	بعد از ۲۴ دقیقه	بعد از ۱۷ دقیقه
سرعت حذف از خون	۴- ۸/۶ mL/h/kg	۱/۶- ۲/۱ mL/h/kg
دفعات تزریق به بیمار	سه بار در هفته	یکبار در هفته و یا هر دو هفته یکبار

۱-۲-۲- سیستم‌های بیان کننده پروتئین نو ترکیب

۱-۲-۲-۱- انتخاب رده سلولی

جهت تولید پروتئین نو ترکیب در یک سیستم بیانی، دو جزء ضروری می‌باشد. اغلب، اولین جز مورد نیاز، سلول بوده که به عنوان یک محیط زیستی جهت تامین انرژی و فرایند سنتز پروتئین استفاده می‌گردد. بطور معمول سلول‌های میزبان به دو دسته‌ی پروکاریوتی و یوکاریوتی تقسیم‌بندی می‌شوند. سیستم بیانی باکتریایی در دسته‌ی پروکاریوت‌ها بوده که به دلیل سهولت دستکاری ژنتیکی، رشد سریع و توانایی رشد در محیطی ساده و کم هزینه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۵). از بین سیستم‌های متفاوت بیانی در پروکاریوت‌ها، بطور گسترده از *E. coli* در تولید پروتئین نو ترکیب استفاده می‌شود (۳۶). با این حال، این سیستم بیانی به دلیل ناتوانی در گلیکوزیله کردن پروتئین‌های سنتز شده، میزبان مناسبی جهت تولید پروتئین‌های پیچیده و گلیکوزیله نمی‌باشد (۳۷). سلول‌های میزبان یوکاریوتی به دلیل توانایی آن‌ها در سنتز پروتئین‌های گلیکوزیله و همچنین انجام تغییرات پس از ترجمه^{۱۳}، به عنوان میزبان مناسبی جهت تولید پروتئین‌های پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرند.

^{۱۳} Post Translational Modification

در میان سیستم‌های بیانی یوکاریوتی، سلول‌های پستانداران بیشترین و جامع‌ترین تغییرات پس از ترجمه را انجام می‌دهند. با وجود بازدهی کمتر سلول‌های پستانداران نسبت به باقی سلول‌های میزبان، همچنان از آن‌ها در تولید بسیاری از داروهای زیستی^{۱۴} استفاده می‌گردد. همین امر سبب شده تا محرکی قوی جهت بهبود و تقویت بازدهی این سلول‌ها ایجاد شود (۳۸، ۳۹). متداول‌ترین رده‌ی سلول بیانی پستانداران، از گونه‌های انسانی و جوندگان به ویژه همستر چینی و موش‌های خانگی مشتق شده‌اند. در میان تمامی سلول‌های پستانداران، CHO^{۱۵} محبوب‌ترین لاین سلولی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد (۳۶).

یکی از دلایل استفاده از این رده‌ی سلولی به عنوان سیستم بیانی، توانایی رشد آن به صورت سوسپانسیون و همچنین چسبیده با تراکم بالا و سهولت سازگاری آن با محیط‌های فاقد سرم می‌باشد (۴۲). سلول‌های CHO در برابر عفونت‌های ویروسی انسانی حساس نبوده و ایمنی بالایی دارند (۴۳). همچنین این سلول‌ها دارای تغییرات پس از ترجمه و گلیکوزیلاسیون مشابه سلول‌های انسانی بوده و پروتئین‌های ترشحی را به راحتی سنتز و به محیط بیرون از سلول منتقل می‌کنند (۴۴). بر همین اساس امروزه نزدیک به ۷۰ درصد پروتئین‌های دارویی نوترکیب در سیستم بیانی CHO ساخته می‌شوند (۴۵).

یکی از متداول‌ترین سلول‌های رده سلولی CHO، DG44 می‌باشد که در سال ۱۹۸۲ طی دو مرحله تابش اشعه گاما به سلول CHO-K1 که منجر به جهش در هر دو کپی ژن دی‌هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) شد، توسعه پیدا کرد. ژن DHFR در سنتز پیش‌سازهای نوکلئیک‌اسید نقش دارد و بنابراین فقدان آن باعث می‌شود این سلول‌ها برای رشد خود نیاز به گلایسین، هایپوگزانتین و تایمیدین (GHT) داشته باشند. بنابراین برای رشد سلول میبایست گلایسین، هایپوگزانتین و تایمیدین به صورت جداگانه یا بوسیله انتقال ژن DHFR به داخل سلول بوسیله ناقل جایگزین شوند. این نوع انتخاب متابولیک سلولی که از ژن DHFR استفاده می‌کند بیان بسیار بالاتر

^{۱۴} Biomedicine

^{۱۵} Chinese Hamster Ovary

و کارآمدتر را ارائه می‌دهد. خصوصیات دیگر این رده سلولی از جمله آداپته شدن به رشد سوسپانسیون در محیط فاقد سرم و مناسب بودن جهت تولید در مقیاس بالا باعث شده که این رده سلولی به عنوان یکی از پرکاربردترین میزبان‌های سلولی برای تولید زیست‌داروها مورد استفاده قرار بگیرد.

۱-۲-۲-۲- انتخاب سازه بیانی

دومین مورد ضروری در یک سیستم بیانی، سازه‌ی بیانی‌ای است که دارای بخش‌های تنظیم کننده و نواحی تکثیر کننده‌ی ژن، چهارچوب خوانش (ORF^{۱۶}) و همچنین اجزای لازم جهت رونویسی و ترجمه‌ی پروتئینی باشد. از رایج‌ترین وکتورهایی که در همسانه‌سازی مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان به ناقل‌های پلاسمیدی، ویروسی و کروموزوم‌های مصنوعی^{۱۷} اشاره نمود (۵۳). پلاسمید، DNAی حلقوی دو رشته بوده که توانایی تکثیر بطور مستقل را دارا می‌باشد و به صورت رایج به عنوان وکتور همسانه‌سازی از آن استفاده می‌شود (۵۵). در حال حاضر انواع مختلفی از ناقل‌ها در دسترس می‌باشند و انتخاب آن‌ها به عوامل مختلفی از جمله میزان توانایی حمل قطعه‌ی جدید، تعداد کپی^{۱۸} و روش‌های همسانه‌سازی بستگی دارد (۵۴). در این پژوهش با توجه به قابلیت ناقل‌های مختلف و بررسی اثر هر یک بر میزان بیان پروتئین از دو پلاسمید بیانی استفاده شد.

۱-۲-۲-۲-۱- وکتور pOptiVEC

pOptiVEC یک وکتور ۴/۳۸۳ kb بوده که از پلاسمید منشا گرفته و در ساختار خود دارای پروموتور ویروس سایتومگال انسانی (hCMV^{۱۹}) می‌باشد و سبب بیان بالای ژن مورد نظر می‌شود. این وکتور پس از پروموتور

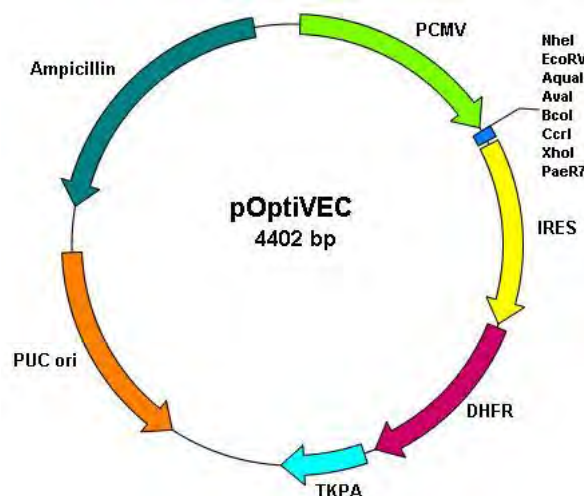
^{۱۶} Open Reading Frame

^{۱۷} Artificial chromosome

^{۱۸} Copy Number

^{۱۹} Human Cytomegalovirus

دارای توالی $IRES^{۲۰}-DHFR^{۲۱}$ بوده و علاوه بر آن در ساختار اصلی خود حاوی توالی مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین جهت استفاده به عنوان نشانگر انتخابی^{۲۲} می‌باشد. باتوجه به اینکه رده‌ی سلولی CHO-DG44 توانایی تولید دی‌هیدروفولات ردوکتاز را ندارد، از وجود توالی این ژن در وکتور pOptiVEC می‌توان جهت جداسازی کلونی‌های دریافت‌کننده‌ی ناقل مورد نظر استفاده نمود. ادغام وکتور pOptiVEC در ژنوم سلول میزبان به صورت تصادفی بوده و در صورت درج این سازه در مناطق هتروکروماتین، رونویسی از آن صورت نمی‌گیرد. همین امر سبب شده تا بیانی ناپایدار و متغیر از ترنس‌ژن را در سلول‌های هدف داشته باشیم (شکل ۳-۱) (۶۲).



شکل ۳-۱- تصویر شماتیک وکتور pOptiVEC.

^{۲۰} Internal Ribosome Entry Site

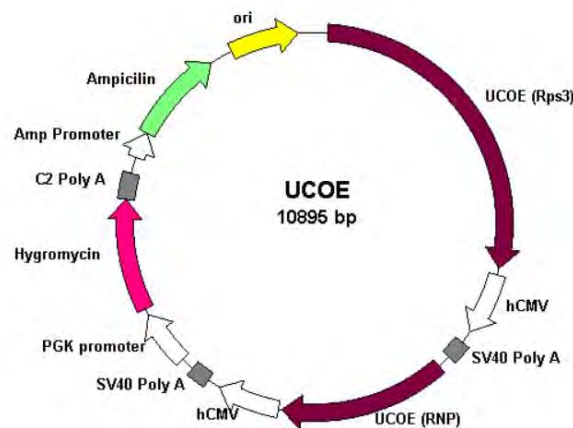
^{۲۱} Dihydrofolate Reductase

^{۲۲} Selection Marker

UCOE ۱-۲-۲-۲-۲-وکتور

وکتور حاوی عنصر UCOE با نام تجاری CET 1019 HD-hygro و سایز kb ۱۰/۸۹۵، دارای دو پروموتور hCMV، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و هیگرومایسین به منظور نشانگر انتخابی به ترتیب در سیستم بیانی باکتری و پستانداران می‌باشد (شکل ۱-۴).

UCOE یک جزیره‌ی CpG عاری از متیلاسیون بوده که از ژن‌های Housekeeping انسانی جدا می‌شود (۶۴). در سال ۲۰۰۵ میلادی برای اولین بار پتانسیل عنصر UCOE در افزایش بیان و همچنین مقاومت به عوامل خاموش‌کننده‌ی ژن آشکار گردید. این قطعه می‌تواند تاثیر مارکرهای اپی‌ژنتیکی مانند متیلاسیون، که باعث خاموش شدن ژن می‌شود را مهار کرده، ساختار کروماتین را تغییر و سبب بیان پایدار و بالا از ژن مورد نظر حتی در نواحی هتروکروماتین سانترومری شود (۶۵، ۶۶). مطالعات مقایسه‌ای نشان داده است که سلول‌های دریافت‌کننده‌ی ژن مورد نظر با استفاده از وکتور حاوی قطعه UCOE، دارای بیان بالاتری از کلون‌های دریافت‌کننده‌ی وکتور غیر UCOE می‌باشند (۶۷).



شکل ۱-۴- تصویر شماتیک وکتور UCOE.

۱-۲-۳- روش‌های بهینه‌سازی بیان ژن

اگرچه ایده اصلی تولید رده‌های سلولی نو ترکیب از اواسط دهه ۱۹۸۰ تغییر چندانی نکرده، اما میزان تولید پروتئین طی سالیان متمادی دچار تغییرات چشمگیری شده است. میزان بالای تولید که در پروسه‌های انجام‌شده در حال حاضر بدست می‌آید، نتیجه سال‌ها تحقیق و بهتر شدن درک دانشمندان از پروسه‌های بیان ژن، متابولیسم، رشد و تاخیر آپوپتوز در سلول‌های پستانداران است. تلاش‌های بسیاری منجر به توسعه ناقل‌ها، مهندسی سلول‌های میزبان، تولید انواع محیط‌های کشت و بهبود روش‌های غربالگری و انتخاب شده است. در این راستا با توجه به بررسی‌های انجام گرفته بنظر می‌رسد استفاده از چند استراتژی به صورت موازی می‌تواند تاثیر زیادی در بالا رفتن میزان بیان پروتئین داشته باشد. با توجه به اهمیت تولید بالا جهت تجاری شدن یک محصول در این پژوهش تلاش کردیم از روش‌های مختلف برای رسیدن به این هدف استفاده کنیم. در ادامه توضیح مختصری درخصوص این استراتژی‌ها خواهیم داشت.

۱-۲-۳-۱- بهینه‌سازی کدون‌ها و وکتورها

مطالعات زیادی نشان دادند که تغییر در توالی‌های اسیدهای نوکلئیک رمزکننده یک ژن و مطابقت دادن آن‌ها با توالی‌های رایج رمزکننده در سلول میزبان منجر به افزایش چشمگیر تولید پروتئین نو ترکیب می‌شود. بر این اساس با تغییر در کدون‌های tRNA می‌توان از ژنی که دارای کدون‌های کمیاب tRNA در سلول میزبان می‌باشد و بنابراین ممکن است در میزان بالا بیان نشود به ژنی با کدون‌های رایج دسترسی پیدا کرد. (۵۰). استفاده از وکتورهای بیانی مناسب با قابلیت انتقال مؤثر ژن‌ها به سلول‌های میزبان به همراه پروموتورهای قوی و توالی‌های تقویت‌کننده نیز نقش مهمی در بالا رفتن میزان بیان پروتئین دارد.

۱-۲-۳-۲- بالابردن کارایی ترسفکشن

خطی کردن پلاسمید قبل از ترسفکشن منجر به فعال شدن لیگازهای هسته‌ای و ایجاد اتصالات کووالان از مولکول‌های DNA پلاسمیدی منفرد می‌شوند، در مرحله بعد آنزیم‌های نوترکیبی کاتالیز درج شدن رندومی این قطعات^{۲۳} را انجام می‌دهند. این امر به همراه انتخاب سلول‌های ترنسفکت شده به وسیله آنتی بیوتیک یا روش جایگزین منجر به بیان پایدار و طولانی مدت از پروتئین نوترکیب می‌شود. از طرف دیگر، تکرار پروسه ترسفکشن و انتخاب رده سلولی نوترکیب دارای بالاترین میزان بیان می‌تواند در غربالگری بهتر سلول‌های دارای بیان بالا در مراحل اولیه توسعه لاین سلولی موثر باشد.

۱-۲-۳-۳- استفاده از عناصر موثر جهت غلبه بر تأثیرات منفی مکان درج شدن ژن مورد نظر

در ژنوم سلول میزبان از جمله UCOE ها

جایگاه درج اثر زیادی روی میزان رونویسی از ژن نوترکیب دارد، پدیده‌ای که به عنوان "تأثیر مکان"^{۲۴} شناخته شده است. مشخص شده است که درج در نواحی هتروکروماتینی موجب کاهش در بیان یا عدم بیان می‌شود، در صورتی که درج در نواحی یوکروماتینی اغلب موجب بیان ترنسژن می‌شود. البته درج شدن در یوکروماتین به معنی اطمینان از داشتن بیان بلندمدت نیست، چراکه بیان ترنسژن در سلول‌های پستانداران در خیلی موارد به سرعت غیرفعال (خاموش) می‌شود که احتمالاً به خاطر تأثیر کروماتین متراکم در نزدیک ترنسژن است. خاموش شدن ژنی با هیپواسیتلاسیون هیستون، میتلاسیون لیزین شماره ۹ از هیستون H₃ و افزایش میتلاسیون CPG در ناحیه پروموتور ترنسژن مرتبط است (۳۹، ۴۰). استراتژی‌های مختلفی برای غلبه بر تأثیرات منفی مکان در درج شدن رندوم وجود دارد که از آن جمله استفاده از عناصر cis-regulatory شامل insulatorها، عناصر boundary.

^{۲۳} Concatamers

^{۲۴} Position effect

نواحی اتصالات ماتریکس / scaffold^{۲۵}، عناصر بازکننده کروماتین UCOEs^{۲۶}، عناصر تثبیت‌کننده ضد سرکوبگر^{۲۷}، ناحیه آغازین همانندسازی پستانداران^{۲۸} و مناطق متصل‌شونده به ماتریکس هسته‌ای^{۲۹} می‌باشد (۴۱-۴۴). درج‌شدن این عناصر در اطراف ترنسژن موجب کاهش تأثیر هتروکروماتین شده و سبب بیان پایدار ترنسژن می‌شود (۴۵، ۴۶) استفاده از این عوامل تنظیمی با هدف جلوگیری از خاموش شدن ژن یکی از موارد مهم و تاثیرگذار در بهینه‌سازی وکتور بیانی و افزایش سطح بیان پروتئین است.

۱-۲-۳-۴- استفاده از تکنیک‌های تکثیر ژنی

روش‌های متعددی برای زیاد کردن ژن‌های کلون شده از طریق اتصال آن‌ها به یک مارکر قابل تکثیر و قابل انتخاب وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش دی هیدروفولات ردوکتاز (DHFR) و گلوکاتیون سنتاز (GS) اشاره کرد. در هر دو مورد انتخاب سلول‌های ترنسفکت‌شده در غیاب یک متابولیت مناسب (هیپوگزانتین و تیمیدین^{۳۰} در DHFR و گلوتامین در GS) صورت می‌گیرد که موجب عدم رشد سلول‌های ترنسفورم نشده می‌شود. در این بین متداول‌ترین استراتژی تکثیر ژنی، روش DHFR/MTX است. DHFR آنزیمی است که ۵ و ۶ دهیدروفولات ردوکتاز را به ۵ و ۶ و ۷ و ۸ تترا هیدرو فولات احیا می‌کند که این ماده جهت سنتز DNA مورد نیاز است. رده سلولی‌ای که در این مورد استفاده می‌شود دارای نقص در آنزیم DHFR است و باید تا زمانی که به صورت پایدار با وکتور بیان کننده DHFR ترنسفکت شود، در محیط حاوی پیش‌سازهای پورین شامل هیپوگزانتین و تیمیدین رشد کند. انتخاب سلول‌های ترنسفکت‌شده توسط DHFR نیاز به ایجاد فشار انتخابی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها را از بین می‌برد. DHFR همچنین به عنوان یک مارکر تکثیر کننده ژنومیک برای ژن مورد نظر با

^{۲۵} Scaffold/Matrix Attachment Regions

^{۲۶} Ubiquitous Chromatin Region Opening Elements (UCOE)

^{۲۷} Stabilizing Anti-Repressor Elements (STARs)

^{۲۸} Replication Initiation Region (IR)

^{۲۹} Matrix Attachment Regions (MAR)

^{۳۰} HT

استفاده از انتخاب توسط متوتروکسات می‌باشد (۵۱، ۵۲). سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور دارای ژن DHFR در محیط حاوی MTX، که مهار کننده DHFR است، قرار داده می‌شوند، تکثیر در کپی‌های ژن DHFR منجر به ایجاد سلول‌های مقاوم به متوتروکسات می‌شود. نزدیکی فیزیکی ژن مورد نظر به DHFR نیز موجب تکثیر و افزایش بیان آن می‌شود (۲۷، ۳۰، ۳۸). در کنار مزایای این روش، استفاده از آن با مشکلاتی ازجمله زمانبر بودن پروسه آداپته شدن سلول به دوزهای زیاد شونده متوتروکسات همراه است. به همین دلیل و با توجه به اهمیت بالارفتن سرعت تولید رده‌های سلولی نو ترکیب برخی از شرکت‌های تجاری از روش‌های جایگزین تکنیک‌های تکثیر ژنی استفاده می‌کنند.

۱-۲-۳-۵- جداسازی سلول‌های نو ترکیب دارای بیان بالا

در حال حاضر تولید هورمون‌های نو ترکیب عمدتاً توسط سیستم‌های درج رندوم انجام می‌شود. این سیستم‌ها جمعیتی از سلول‌های ترنسفکت شده با جایگاه‌های درج کروموزومی غیر قابل پیش‌بینی، تعداد کپی‌های نامشخص و سطوح هتروژن بیان پروتئین را ایجاد می‌کنند، که این امر لزوم تلاش برای انتخاب کلون‌های دارای بیان بالا را موجب می‌شود. علاوه بر تأثیرات غیر قابل پیش‌بینی درج رندوم، رده سلولی CHO و بیشتر رده‌های سلولی نامیرا، دستخوش تغییرات بالای ژنوتیپی و فنوتیپی طی پروسه کشت سلول می‌شوند. با توجه به اینکه بیان پروتئین، از سلول انرژی می‌گیرد، سطوح هتروژن بیان ممکن است منجر به رشد بالای سلول‌های دارای بیان کم بعد از چندین پاساژ و بنابراین تأثیر منفی بر روی جمعیت سلول‌های تولید کننده پروتئین نو ترکیب بشوند. بنابراین روش انتخاب که شامل شناسایی سلول مورد نظر از جمعیت سلول‌های هتروژن ترنسفکت شده می‌باشد، یکی از مهمترین مراحل توسعه یک رده سلولی نو ترکیب است. بر همین اساس، از روش‌های انتخابی متعددی برای جداسازی بهترین سلول‌های تولید کننده پروتئین نو ترکیب و افزایش آن‌ها به شکل جمعیتی کلونال از سلول‌های دارای بیان بالا استفاده می‌شود که از لحاظ پیچیدگی، کارایی و هزینه با

یکدیگر متفاوت می‌باشند. در زمان انتخاب نوع روش جداسازی می‌بایست فاکتورهای متعددی را در نظر گرفت. کیفیت جداسازی، درصد زنده‌مانی سلول پس از این فرایند و همچنین بازدهی نهایی، سه فاکتور مهم در تعیین و انتخاب نوع روش جداسازی سلول‌های مورد نظر می‌باشند. انتخاب روشی کارآمد به منظور جداسازی، سبب دستیابی به سلول‌های هدف، در کمترین زمان خواهد شد.

از روش‌های جداسازی سلول‌های نو ترکیب دارای بیان بالا می‌توان به تکنیک‌های ساده مثل روش رقیق‌سازی محدود کننده^{۳۱}، روش‌های جداسازی با استفاده از میکروسکوپ، با استفاده از فلورسنت فعال شده (FACS^{۳۲}) و یا با کمک میدان مغناطیسی فعال شده (MACS^{۳۳}) و تکنیک‌های پیشرفته اتوماتیک اشاره کرد.

۱-۲-۳-۵-۱- روش فلوسایتومتری

فلوسایتومتری یکی از گسترده‌ترین روش‌های مورد استفاده محققان برای انتخاب سلول‌ها با فنوتایپ مورد نظر می‌باشد. این تکنیک، علاوه بر استفاده برای انتخاب کلون‌های دارای بیان بالا، برای آنالیز رشد سلولی و متابولیسم هم مورد استفاده قرار می‌گیرد که این موارد نیز بر روی تولید سلولی تأثیرگذار هستند. در این میان روش Flurescence avtivated cell sorting (FACS)، توانایی انتخاب سلول‌ها با توجه به سطح فلورنس مورد نظر را ایجاد می‌کند. یکی از مهمترین مشخصات FACS، توانایی بررسی تعداد زیادی نمونه است، به طوری که امکان بررسی میلیون‌ها سلول را در چند دقیقه فراهم می‌کند. بنابراین ابتدا میزان تولید هر سلول بررسی می‌شود و تنها سلول‌هایی که میزان تولید مورد نظر را دارند، در پلیت‌های ۹۶ خانه کلون می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده است که sort کردن ساب کلون‌های با تولید بالا می‌تواند به طور چشمگیری تعداد روش‌های Screenning را کاهش دهد

^{۳۱} Limiting dilution

^{۳۲} Fluorescence Activated Cell Sorting

^{۳۳} Magnetic Activated Cell Sorting

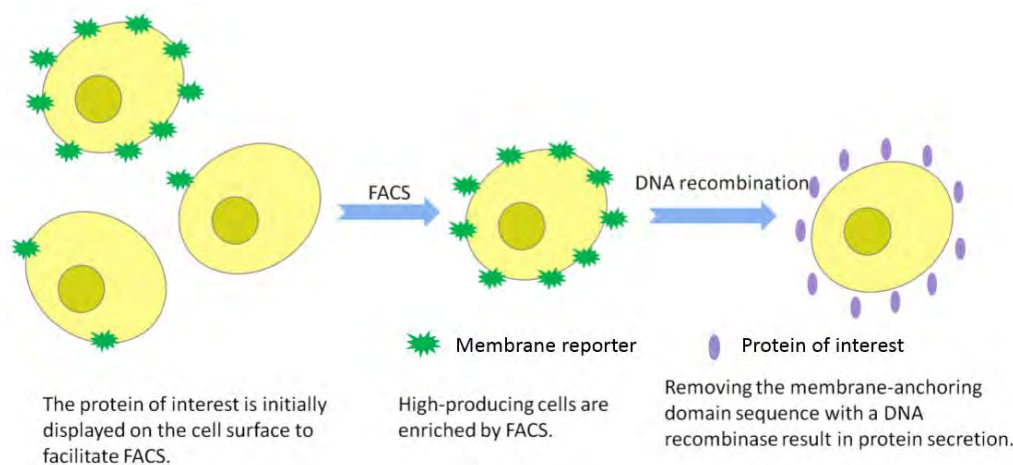
(تا میزان بیش از ۱۰ برابر). همچنین زمان مورد نیاز برای دستیابی به رده سلولی دارای بیان بالا با استفاده از این روش ۵۰٪ کاهش و میزان تولید اختصاصی محصول از ۲۵ تا ۱۲۰ برابر افزایش را نشان داده است.

لازم به ذکر است که انجام FACS برای پروتئین‌های ترشحی با مشکلاتی مواجه است، چراکه اگر پروتئین ترشحی به سلولی که آن را ترشح کرده متصل نباشد، آنالیز FACS قابل اجرا نمی‌باشد. بنابراین برای اینکه FACS با موفقیت انجام شود، داشتن اتصال پروتئین مورد نظر به سطح سلول و یا اتصال به یک سیگنال فلورسنت ضروری است. سیگنال فلورسنت را می‌توان به واسطه‌ی بیان ژن‌های گزارشگر به همراه ژن موردنظر ایجاد کرد و سلول‌هایی که بیشترین نور فلورسنت را منتشر می‌کنند، جداسازی نمود.

در این روش از بیان همزمان پروتئین مورد نظر با یک پروتئین ثانویه استفاده می‌شود. بیان پروتئین گزارشگر معمولاً پایین‌تر از بیان پروتئین مورد نظر نگه داشته می‌شود. این امر با استفاده از پروموتورهای ضعیف شده، کدون آغازگر Leaky و یا قراردادن ژن گزارشگر بعد از IRES و ژن مورد نظر قبل از آن محقق می‌شود. یکی از این روش‌ها، اتصال مستقیم پروتئین ترشحی به سطح سلول با استفاده از پپتیدهای بین‌غشایی و یا پپتید (RAKR) Furin Cleavage جهت اتصال ناپایدار پروتئین ترشحی به دومین سیتوزولی بین‌غشایی و یا بیان همزمان پروتئین مورد نظر با بیوتین جهت اتصال به آویدین در سطح سلول می‌باشد. همچنین از پروتئین‌های گزارشگر شامل YFP, GFP و RFP و یا مارکرهای سطحی سلول مثل CD4 یا CD20 (که در حالت عادی در سلول‌های CHO تولید نمی‌شوند)، برای این منظور استفاده می‌شود.

لازم به ذکر است با توجه به لزوم حذف مارکر اضافه شده در پروسه تولید لاین‌های دارویی، با قرار دادن این بخش در بین دو LoxP، و استفاده از آنزیم Cre، حذف ناحیه اضافه شده بعد از FACS انجام می‌شود. برای این منظور در مرحله ساخت سازه ژنی، بعد از قرار گرفتن ژن مورد نظر در جایگاه مولتیپل کلونینگ سایت، مارکر سطحی توسط IRES به شکلی که دوطرف آن جایگاه LoxP قرار داشته باشد، درج می‌شود. سپس ترنسفکشن سلول CHO DG44 با سازه خطی انجام و در مرحله بعد، رده سلولی دارای بیان بالا با استفاده از FACS انتخاب می‌شود.

در مرحله آخر، سلول‌های انتخابی در معرض آنزیم Cre، جهت حذف مارکر سطحی، قرار داده می‌شوند (شکل ۱-۵).



شکل ۱-۵- انتخاب سلول‌های دارای بیان بالا با استفاده از FACS

۱-۲-۳-۵-۲- ژن‌های گزارشگر

استفاده از پروتئین‌های فلورسنت به عنوان مولکول‌های گزارشگر، ابزاری محبوب در بررسی بیان ژن و ترنسفکت سلولی می‌باشد (۳۷). امروزه گزارشگرهای فلورسنت و لومینسنت^{۳۴} به دلیل حساسیت بالا، ردیابی آسان و قابلیت کمی‌سازی آن‌ها، مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۹). پروتئین GFP مهم‌ترین گزارشگر فلورسنت بوده که از عروس دریایی با نام *Aequorea Victoria* جداسازی می‌شود (۴۰).

GFP یک پروتئین فلورسنت سبز رنگ، دارای ۲۳۸ آمینو اسید با وزن مولکولی ۲۶/۹ kDa بوده که در صورت تحریک با اشعه فرابنفش در طول موج ۳۹۵ nm و ۴۹۰ nm، نور مرئی سبز رنگی با طول موج ۵۰۹ nm ساطع می‌کند (۴۱، ۴۲). امروزه باتوجه به این موضوع که GFP، مولکولی پایدار و غیر سمی بوده و به منظور بررسی آن

^{۳۴} Luminescent

نیازی به فیکس کردن سلول نمی‌باشد، در بیولوژی به عنوان یک گزارش دهنده‌ی میزان بیان کاربرد دارد (۴۴)، پروتئین GFP دارای بازده تاخوردگی پایینی در دمای 37°C بوده و همین امر سبب می‌شود تا سیگنال دریافت شده به طرز چشمگیری کاهش یابد. از طرفی این پروتئین پس از بلوغ تمایل زیادی به تجمع و تراکم درون سلولی دارد (۴۳).

با توجه به این موارد پروتئین EGFP^{۳۵} به عنوان جایگزین پروتئین GFP مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین EGFP یکی از پرکاربردترین گونه‌های مهندسی شده از پروتئین GFP با ۲۹۳ آمینو اسید و وزن مولکولی kDa ۳۲/۷، که پس از قرارگیری در معرض اشعه‌ی فرابنفش رنگ فلورسنت درخشانی را با طول موج nm ۴۹۰ از خود ساطع می‌کند (۴۶). تحقیقات انجام شده بر روی این پروتئین هیچ گونه اثرات زیان آور و سمیتی را نشان نداده و مشخص شده است که EGFP از نظر بیولوژیکی بی‌اثر می‌باشد (۴۷، ۴۸). بطور کلی ساختار پروتئین EGFP مشابه GFP بوده با این تفاوت که آمینو اسید فنیل آلانین شماره‌ی ۶۴ به لوسین و سرین شماره‌ی ۶۵ به ترئونین تغییر پیدا کرده است (۴۳). این دو جهش سبب افزایش بازدهی تاخوردگی این پروتئین در دمای 37°C ، سرکوب تحریک در طول موج nm ۳۹۰، ساطع شدن نور سبز پررنگی در طول موج nm ۴۹۰ شده است (۴۳).

^{۳۵} Enhanced Green Fluorescent Protein

۱-۳- اهداف پژوهش

با توجه به سند چشم انداز جمهوری اسلامی ایران در افق ۱۴۰۴ مبنی بر دستیابی به جایگاه اول اقتصادی، علمی و فناوری در سطح منطقه و اینکه صنعت تولید داروهای بیولوژیک از هر سه منظر اقتصادی، علمی و فناوری حائز اهمیت است و با توجه به مزیت‌های درمان آنمی با داربی‌پوئتین آلفا نسبت به rhEPO و عدم تولید این داروی نو ترکیب در کشور، حرکت در جهت تولید آن به عنوان هدف اصلی این پروژه قرار گرفته است. در این راستا و از آنجا که اولین و مهمترین قدم در تهیه یک داروی نو ترکیب در شرکت‌های دارویی، تولید لاین سلولی تولید کننده آن مولکول در مقیاس آزمایشگاهی است، هدف اصلی پروژه حاضر نیز تولید لاین سلولی CHO DG44 ترشح کننده مولکول نو ترکیب داربی‌پوئتین آلفا می‌باشد.

فصل دوم

روش انجام پژوهش

۲-۱- آنالیز و بررسی بیوانفورماتیکی

۲-۱-۱: طراحی استراتژی کلونینگ

در بخشی از این طرح قصد داریم با طراحی و کلون سازی سازه ژنی داربی پوئتین آلفا و کلون کردن آن داخل دو وکتور pOptiVEC و UCOE و انتقال این دو وکتور به رده سلولی CHO-DG44 به تولید مولکول داربی پوئتین آلفا برسیم. برای این منظور در مرحله اول، کلونینگ ژن داربی پوئتین آلفا در وکتور pOptiVEC و سپس کلونینگ در وکتور UCOE انجام شد. با توجه به اینکه ناقل UCOE فاقد لوکوس DHFR است و حضور این قطعه در انتخاب و تکثیر سول‌های ترنسفکت شده اهمیت دارد، تکثیر ژن داربی پوئتین آلفا به همراه IRES و DHFR از روی وکتور pOptiVEC جهت کلون سازی در ناقل UCOE انجام شد. در مرحله بعد، انتقال سازه‌های ساخته شده به سلول و غربالگری سلول‌ها صورت گرفته و سپس میزان بیان ژن در سطح mRNA و در سطح پروتئین اندازه‌گیری خواهد شد. مراحل کلی این بخش به ترتیب زیر می‌باشند:

- ۱- انتخاب و بررسی بیوانفورماتیکی ناقل‌های بیانی.
- ۲- بررسی بیوانفورماتیکی LoxP جهت درج در ناقل pOptiVEC
- ۳- بررسی بیوانفورماتیکی توالی داربی پوئتین آلفا به همراه IRES و DHFR جهت درج در ناقل UCOE
- ۴- طراحی آنزیم‌های مناسب جهت انجام واکنش هضم آنزیمی قطعه مورد نظر و آماده سازی آن برای مرحله کلونینگ.
- ۵- استخراج و هضم آنزیمی پلاسمیدها
- ۶- هضم آنزیمی و یا تکثیر دو قطعه داربی پوئتین آلفا و داربی پوئتین آلفا به همراه IRES و DHFR.
- ۷- کلون سازی قطعات آماده‌سازی شده درون ناقل‌های بیانی.
- ۸- ترنسفورماسیون ناقل نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha -IRES- Darbepoetin alpha -UCOE به میزبان باکتری DHFR

۹- تایید حضور سازه ژنی و صحت انجام درج توالی مورد نظر در میزبان باکتریایی با کمک روش‌های استخراج پلاسمید^{۳۶}، Colony PCR، برش آنزیمی^{۳۷} و تعیین توالی نوکلئوتیدی^{۳۸}.

۱۰- خطی سازی و خالص سازی دو ناقل بیانی نوترکیب pOptiVEC- Darbepoetin alpha و UCOE- Darbepoetin alpha-IRES-DHFR جهت آماده سازی برای ترنسفکشن.

۱۱- انتقال ناقل‌های بیانی نوترکیب به ژنوم سلول‌های CHO DG44.

۱۲- کشت سلول‌های CHO-DG44 ترنسفکت شده در محیط انتخابی به منظور رسیدن به کلون سلولی مثبت از نظر داشتن ناقل بیانی نوترکیب.

۱۳- تأیید درج توالی مورد نظر در ژنوم رده‌های سلولی CHO-DG44 با استفاده از PCR و توالی یابی سنگر بر روی نمونه‌های ژنومیک

۱۴- بررسی میزان بیان ژن در سطح ترنسکریپت با استفاده از Real-time PCR

۱۵- تأیید کیفی بیان پروتئین نوترکیب توسط Western Blotting

۱۶- بررسی کمی میزان بیان پروتئین نوترکیب با استفاده از تکنیک ELISA^{۳۹}

در بخش دیگر این طرح، طراحی و ساخت سازه‌های ژنی دارای ژن گزارشگر EGFP، تهیه‌ی لاین سلولی CHO DG44 نوترکیب به صورت پایدار، جداسازی این سلول‌ها با استفاده از روش FACS و بررسی بیان در سطح RNA و پروتئین انجام شد با توجه به لزوم حذف توالی ژن‌های گزارشگر در مراحل بعدی، این قطعه بین دو توالی LoxP قرار داده می‌شود. بدین منظور در مرحله اول، درج ژن گزارشگر EGFP در ناقل دارای LoxP انجام می‌شود. در مرحله بعد توالی ژن داربی‌پوئین آلفا به این وکتور اضافه شده و سپس کل توالی‌ها در ناقل pOptiVEC درج می‌شوند. مرحله آخر کار شامل تکثیر توالی‌های EGFP به همراه دو عدد LoxP در دوطرف آن و ژن داربی‌پوئین

^{۳۶} Plasmid Extraction

^{۳۷} Digestion

^{۳۸} Sequencing

^{۳۹} Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

آلفا به همراه IRES و DHFR. و سپس درج این قطعه در ناقل UCOE است. چکیده‌ی مراحل مولکولی انجام شده به منظور ساخت سازهای این بخش به شرح زیر می‌باشد.

۱. کلونینگ توالی‌های IRES-EGFP درون وکتور pKO-DTA-LoxP (pKO-DTA-LIGL)
۲. کلونینگ توالی Darbepoetin alfa درون وکتور pKO-DTA-LIGL (pKO-DLIGL)
۳. کلونینگ توالی‌های Darbepoetin alfa، LoxP، IRES، EGFP، LoxP درون وکتور pOptiVEC (pOptiVEC-DLIGL)
۴. کلونینگ توالی‌های DLIGL و IRES، DHFR درون وکتور pCR- Blunt (pCR Blunt-DLIGLID)
۵. کلونینگ توالی‌های Darbepoetin alfa، LoxP، IRES، EGFP، LoxP، IRES، DHFR درون وکتور UCOE (UCOE-DLIGLID)

در ادامه مراحل ترنسفورماسیون و ترنسفکشن مطابق با موارد مطرح شده قسمت قبل انجام شد.

۲-۲: تعیین توالی ژن

برای دسترسی به اطلاعات مرتبط با توالی داربی‌پوئتین آلفا از پایگاه DrugBank استفاده شد که به برخی از مشخصات مهم آن در زیر اشاره می‌شود:

Darbepoetin alfa

Accession Number

DB00012

Description

Human erythropoietin with 2 aa substitutions to enhance glycosylation (5 N-linked chains), 165 residues (MW=37 kD). Produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells by recombinant DNA technology.

Type

Biotech

Biologic Classification

Protein

Based

Therapies

Haematopoietic growth factors

Protein Chemical Formula

$C_{815}H_{1317}N_{233}O_{241}S_5$

Protein Average Weight

18396.1 Da

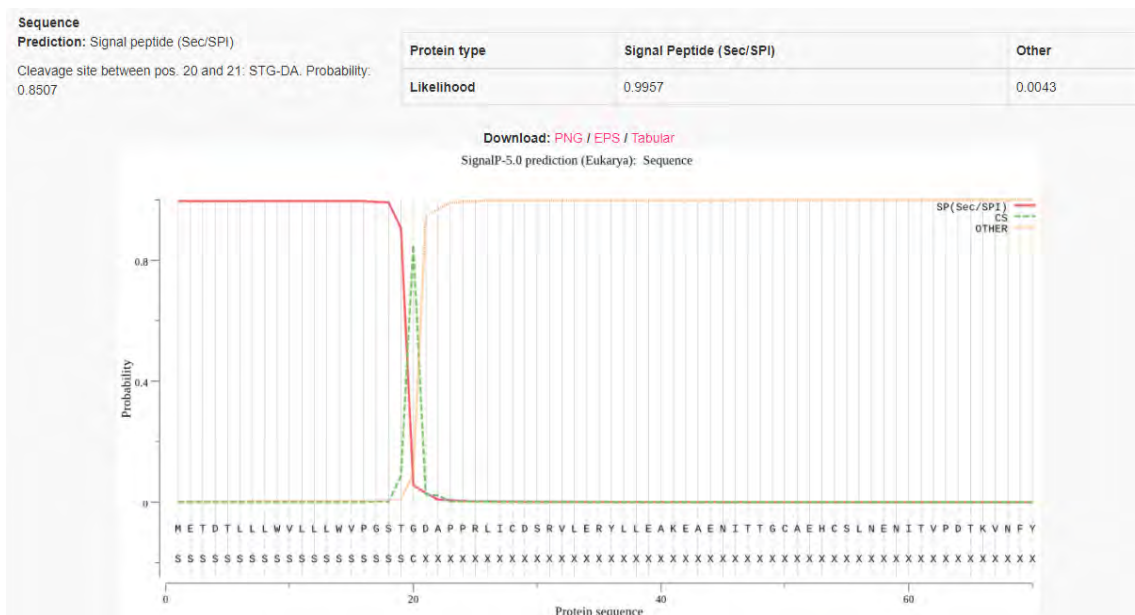
Sequences

>Darbepoetin alfa
MGVHECPAWLWLLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCNETC
SLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQVNETLQL
HVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKL
KLYTGEACRTGDR

توالی آمینواسیدی موجود در بانک دارویی جهت کلون شدن در ناقل باید به توالی اسیدنوکلیکی تبدیل شود. پس از تایید صحت توالی، باتوجه به اینکه سیستم بیانی در این پژوهش، سلول CHO DG44 در نظر گرفته شده، توالی نوکلئیک اسیدی این ژن با استفاده از نرم افزار آنالین شرکت GenScript، بر اساس ترجیح کدونی^{۴۰} سلول CHO DG44 بهینه سازی شد. این توالی طراحی شده به طول ۷۰۱ جفت باز و ۵۶۴ ORF جفت باز می باشد.

^{۴۰} Codon usage

قرار دادن سیگنال پپتید^{۴۱}، توالی کوزاک و جایگاه‌های مناسب برای آنزیم‌های محدودالانژ از مواردی است که در طراحی سازه لحاظ شده است. سیگنال پپتید شامل آمینواسیدهای ابتدایی ORF^{۴۲} می‌باشد که نقش مهمی در ترشح پروتئین نو ترکیب دارد. آنالیز توالی پپتیدی طراحی شده در پایگاه Signal P نشان می‌دهد که ۲۰ آمینو اسید ابتدایی این ORF، سیگنال پپتید هستند (شکل ۲-۱).

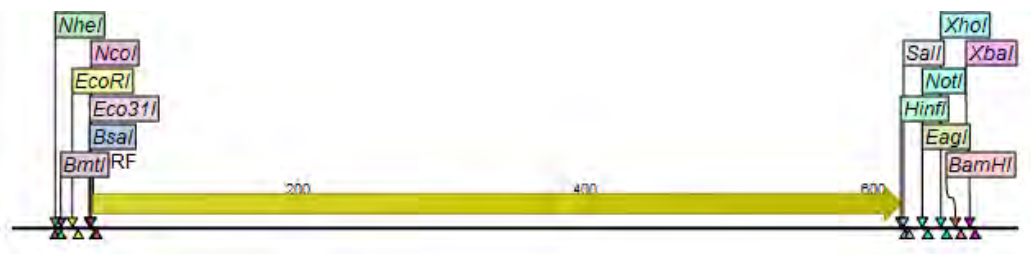


شکل ۲-۱: آنالیز توالی پپتیدی طراحی شده در پایگاه Signal P

به منظور کلون کردن توالی در وکتورهای بیانی تعدادی جایگاه آنزیمی روی توالی قرار داده شد. آنالیز جایگاه‌های برشی توالی طراحی شده با استفاده از نرم افزار CLC انجام شد (شکل ۲-۲).

^{f1} Signal peptide

^{††} Open Reading Frame

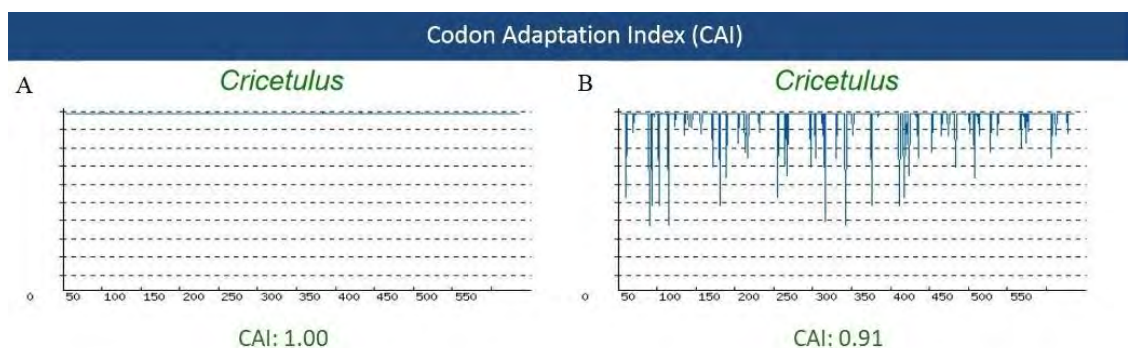


شکل ۲-۲: جایگاه‌های طراحی شده برای آنزیم‌های محدودالایر در توالی داربی پوئین آلفا

بررسی بهینه‌سازی توالی ژن داربی پوئین آلفا با استفاده از نرم‌افزار آنلاین GenScript Rare Codon Analysis Tool صورت گرفت. نتایج حاصل به شرح زیر می‌باشد.

۲-۲-۱- شاخص CAI (Codon Adaptation Index)

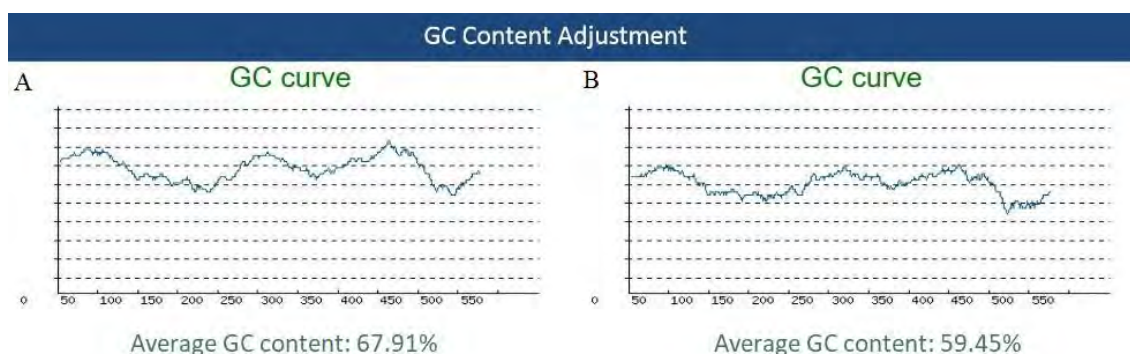
شاخص CAI، سازگاری کدونی را نشان می‌دهد. بیان بالا از پروتئین مورد نظر در سیستم بیانی هدف، رابطه‌ی مستقیمی با میزان CAI دارد. در صورتی که میزان این شاخص بالای ۰/۸ در نظر گرفته شود، انتظار بیان مناسبی از ژن هدف در سلول بیانی مورد نظر خواهیم داشت.



شکل ۲-۳: نمودار مقایسه‌ی شاخص CAI در توالی Wild type و بهینه‌شده‌ی ژن داربی پوئین آلفا. (A) شاخص CAI در توالی Wild type ژن داربی پوئین آلفا. (B) شاخص CAI در توالی بهینه‌شده‌ی ژن داربی پوئین آلفا.

۲-۲-۲- GC درصد

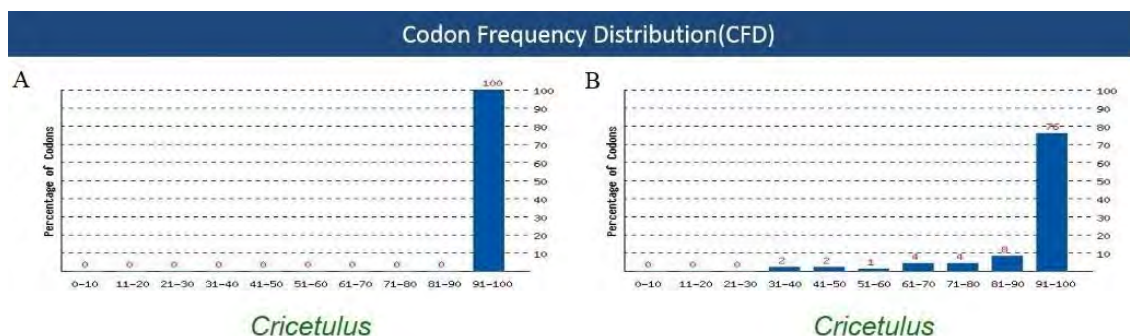
درصد GC ایده‌آل در توالی مورد نظر بین ۳۰٪ تا ۷۰٪ می‌باشد. در نمودار زیر میزان درصد GC در توالی ژن داربی پوئین آلفا، پیش و پس از بهینه‌سازی آورده شده است.



شکل ۲-۴: نمودار مقایسه‌ی درصد GC در توالی Wild type و بهینه‌شده‌ی ژن داربی پوئین آلفا. (A) درصد GC در توالی Wild type ژن داربی پوئین آلفا. (B) درصد GC در توالی بهینه‌شده‌ی ژن داربی پوئین آلفا.

۲-۲-۳- شاخص CFD (Codon Frequency Distribution)

شاخص CFD، معرف توزیع فراوانی کدونی می‌باشد. عدد ۱۰۰ نشان دهنده‌ی کدون با بیشترین فراوانی در سیستم بیانی هدف می‌باشد.



شکل ۲-۵: نمودار مقایسه‌ی شاخص CFD در توالی Wild type و بهینه‌شده‌ی ژن داربی پوئین آلفا. (A) شاخص CFD در توالی Wild type ژن داربی پوئین آلفا. (B) شاخص CFD در توالی بهینه‌شده‌ی ژن داربی پوئین آلفا.

در نهایت ژن بهینه‌سازی شده جهت سنتز به شرکت GenScript سفارش و سپس توالی، در وکتور pUC57 تحویل گرفته شد.

۲-۳: طراحی و سنتز پرایمر

برای کلون‌سازی یک قطعه‌ی ژنی در یک ناقل بیانی، هر کدام آن‌ها باید دارای انتهای چسبنده مکمل هم باشند. قبل از شروع طراحی پرایمر، انتخاب آنزیم‌های برش‌گر مرحله مهمی به حساب می‌آید. در انتهای ۵' پرایمرهای طراحی شده از توالی سازه‌های ژنی باید انتهای چسبنده توسط آنزیم‌های برش‌گر ایجاد گردد و انتهای چسبنده‌ی مکمل توالی هدف در دو انتهای ۳' ناقل بیانی با همان آنزیم‌ها ایجاد گردد. آنزیم‌های برش‌گر هر کدام توالی‌های خاصی را در منطقه‌ای از ناقل مورد برش قرار می‌دهند. این توالی‌ها معمولاً ۶ تایی و پالیندرومیک می‌باشند. آنزیم‌های برش‌گر انتخابی از MCS وکتور نباید توالی سازه ژنی را برش دهند. برای این منظور بررسی آنزیم‌های برش‌گر در سایت Neb cutter انجام و آنزیم‌های مربوط به هر پرایمر انتخاب شد. در مرحله بعد، طراحی پرایمرهای لازم جهت تکثیر هر دو سازه ژنی با کمک نرم‌افزار Gene Runner انجام گرفت. پرایمرها به گونه‌ای طراحی شدند که دمای اتصال نزدیک به هم، طول مناسب، عدم تشکیل حلقه، عدم تشکیل پرایمر دایمر و میزان مناسب

نوکلئوتیدهای GC در آن‌ها لحاظ گردد. سپس، با استفاده از برنامه Nucleotide Blast از بانک NCBI و نرم افزار CLC، جفت پرایمرهای هر PCR با توالی ناقل‌های بیانی مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود که جفت پرایمرها در نواحی دیگر ناقل تکثیر انجام نمی‌دهند. همچنین جفت پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن مورد نظر، با برنامه Primer-blast از بانک NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از تایید نهایی پرایمرهای طراحی شده، توالی مربوط به آن‌ها جهت سنتز به شرکت سیناکلون ارسال شد. توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعات، در بخش‌های مرتبط آورده شده است.

۲-۴- ساخت سازه‌های ژنی Darbepoetin alpha - pOptiVEC و UCOE-

Darbepoetin alpha -IRES-DHFR، انتقال آن‌ها به داخل سلول و بررسی بیان داربی-

پوئتین آلفا

۲-۴-۱- مراحل کلونینگ ژن داربی پوئتین آلفا در وکتور pOptiVEC

آماده سازی ژن داربی پوئتین آلفا جهت کلون کردن داخل سازه pOptiVEC

کشت مایع و استخراج پلاسمید pUC57

پس از سفارش ژن داربی پوئتین آلفا این ژن در وکتوری با نام تجاری pUC57 کلون شده و ارسال گردید. بنابراین در ابتدا، استخراج پلاسمید pUC57 که حاوی قطعه داربی پوئتین آلفا بود پس از کشت مایع در محیط LB با کیت High Pure Plasmid Isolation Kit از شرکت Roche طبق پروتکل زیر انجام گرفت:

در ابتدا لازم است تا از باکتری کشت مایع تهیه شود. بدین ترتیب یک کلونی از باکتری را در ۵ میلی لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۳ میکرولیتر آنتی بیوتیک و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بر روی شیکر با دوران ۲۰۰ دور

در دقیقه برای ۱۲ الی ۱۶ ساعت انکوبه شد. پس از آن در روز بعد ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با دوران ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد، مایع روی رسوب کاملاً خارج شد.

استخراج پلاسمید با کمک کیت طبق پروتکل زیر انجام شد:

۱- به رسوب سلولی ۲۵۰ میکرولیتر از Suspension buffer افزوده و مخلوط همگن شد.

۲- بعد از یک ورتکس کوتاه، ۲۵۰ میکرولیتر از lysis buffer اضافه شد.

۳- محلول فوق برای ۳ تا ۶ بار سر و ته و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد.

۴- مقدار ۳۵۰ میکرولیتر از binding buffer اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد.

۵- مایع روی رسوب به فیلتر منتقل و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد.

۶- به محتویات روی فیلتر ۷۰۰ میکرولیتر از Washing buffer II افزوده و سانتریفیوژ تحت شرایط فوق صورت پذیرفت.

۷- مایع زیر فیلتر کامل خارج و تحت شرایط فوق، بدون افزودن هیچ ماده‌ای مجدداً سانتریفیوژ شد.

۸- بعد از انتقال فیلتر به میکروتیوب جدید ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از Elution buffer از پیش گرم شده در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به آن اضافه شد.

۹- در دمای اتاق برای ۵ دقیقه محلول فوق انکوبه شد و سانتریفیوژ تحت شرایط فوق تکرار شد. محلول زیر فیلتر، پلاسمید استخراج شده می‌باشد. این زمان به Elution buffer اجازه می‌دهد که DNA را در خود حل کند و پس از سانتریفیوژ کردن، ناقل درون میکروتیوپ انتقال پیدا می‌کند.

۱۰- در نهایت غلظت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

واکنش برش آنزیمی توالی داربی پوئتین آلفا از ناقل pUC57

پس از استخراج پلاسمید pUC57 جهت جداسازی ژن داربی پوئتین آلفا از این وکتور و خارج سازی قطعه موردنظرمان عمل برش آنزیمی به وسیله آنزیم‌های محدودالایر *XhoI* و *EcoRV* طبق شرایط جدول ۱-۲ انجام شد، سپس جهت تأیید از صحت انجام Digestion، بروی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

جدول ۱-۲- مقدار و نوع ترکیبات موجود در واکنش برش آنزیمی ناقل بیانی pOptiVEC

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pUC57	۱۰ میکرولیتر (۲ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>XhoI</i> (10u/μl)	۰,۵ میکرولیتر
۳	آنزیم <i>EcoRV</i> (10u/μl)	۰,۵ میکرولیتر
۴	Red buffer (10x)	۲ میکرولیتر
۵	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

واکنش فوق در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد.

تخلیص قطعه داربی پوئتین آلفا و استخراج آن از ژل

محصول هضم آنزیمی در نهایت طبق پروتکل زیر از ژل تخلیص گردید.

برای به دست آوردن محصول خالص و حذف باندهای اضافه در مرحله برش آنزیمی، باند مورد نظر از روی ژل برش خورده و تخلیص گردید. بدین منظور محصول ۵ واکنش برشی آماده شد. برای انجام تخلیص ژل باید ژل با غلظت کم و نازک باشد. بدین جهت ۰/۵ گرم از آگارز در ۵۰ میلی لیتر محلول TAE1X حل و ژل آماده گردید. محتویات هر ۵ میکروتیوب حاصل از واکنش برش آنزیمی یکی شد. سپس Loading Dye و کل محصول واکنش برش آنزیمی به ترتیب به نسبت ۱ به ۶ با هم مخلوط شدند. برای ران محصول به ۴ چاهک بر روی ژل نیاز است که چاهک چهارم باید بزرگتر باشد. ترتیب ران نمونه ها به صورت زیر انجام گرفت:

چاهک اول: Ladder، چاهک دوم: ۵ میکرولیتر نمونه، چاهک سوم: ایجاد فضای خالی، چاهک چهارم: بقیه نمونه.

بعد از اتمام الکتروفورز، ژل از چاهک سوم برش خورد. ژل حاوی چاهک اول و دوم با استفاده از محلول آب مقطر و Gel red در مدت زمان ۴۰ دقیقه رنگ آمیزی و در داخل دستگاه مولد اشعه ماورای بنفش قرار گرفت. بعد از مشاهده باند مورد نظر، اطراف آن برش خورد. دو ژل در کنار یکدیگر قرار گرفتند و ناحیه برش خورده به عنوان راهنما برای برش باند مورد نظر از روی ژل مورد استفاده قرار گرفت. برای بدست آوردن وزن ژل برش خورده، میکروتیوب خالی را وزن نموده و بعد از انتقال نمونه برش خورده به آن نیز مجدد وزن گردید. خالص سازی باند مورد نظر از روی ژل توسط کیت High pure PCR product purification انجام گرفت. مراحل انجام کار به شرح زیر است:

۱- به ازای هر ۱۰۰ میلی گرم از وزن ژل، ۳۰۰ میکرولیتر از Binding Buffer اضافه گردید.

۲- بعد از یک ورتکس کوتاه، مخلوط فوق به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس چند ثانیه ورتکس گردید (این عمل چند مرتبه تکرار شد تا ژل کامل در بافر حل گردد).

۳- سپس به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم از وزن ژل، ۱۵۰ میکرولیتر از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید.

۴- محلول فوق به روی فیلتر منتقل و به مدت ۱ دقیقه با دوران ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید.

۵- مایع زیر فیلتر دور ریخته شد. به محتویات روی فیلتر، ۵۰۰ میکرولیتر از Washing Buffer افزوده و سانتریفیوژ تحت شرایط مرحله قبل تکرار گردید.

۶- پس از خارج نمودن مایع زیری، مجدداً ۲۰۰ میکرولیتر از Washing Buffer به محتویات روی فیلتر افزوده و تحت شرایط ذکر شده سانتریفیوژ گردید.

۷- مایع زیر فیلتر کاملاً خارج شد. به منظور حذف بافر شستشوی باقی‌مانده سانتریفیوژ با شرایط فوق، بدون افزودن هیچ ماده‌ای انجام گرفت.

۸- فیلتر به میکروتیوب جدید منتقل شد و ۵۰ میکرولیتر Elution Buffer اضافه گردید و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه قرار داده و تحت شرایط فوق سانتریفیوژ گردید.

محلول حاصل حاوی قطعه داربی‌پوئین آلفا است که برای تایید، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

کشت مایع و استخراج پلاسمید pOptiVEC

کشت مایع و استخراج پلاسمید pOptiVEC خام طبق پروتکل کیت High Pure Plasmid Isolation Kit که در موارد پیشین توضیح داده شد، صورت گرفت و غلظت آن با دستگاه نانودراپ خوانده شد.

واکنش برش آنزیمی وکتور pOptiVEC

در مرحله‌ی بعد، برش آنزیمی پلاسمید به وسیله دو آنزیم *XhoI* و *EcoRV* که قطعه داری پوئتین آلفا را با آن‌ها Digest کرده بودیم طبق شرایط جدول ۲-۲ انجام شد و این ناقل خطی گردید.

جدول ۲-۲- مقدار و نوع ترکیبات موجود در واکنش برش آنزیمی ناقل بیانی pOptiVEC

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pOptiVEC	۹ میکرولیتر (۱ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>XhoI</i> (10u/μl)	۰,۵ میکرولیتر
۳	آنزیم <i>EcoRV</i> (10u/μl)	۰,۵ میکرولیتر
۴	Red buffer (10X)	۲ میکرولیتر
۵	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

واکنش فوق در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد.

حذف بافر و مواد اضافی از محصول برش آنزیمی

سپس محصول Digestion با کیت High Pure PCR Product Purification Kit از شرکت Roche جهت

آماده‌سازی نمونه برای لیگاسیون طبق پروتکل زیر Cleanup شد.

۱- محصول ۵ واکنش برشی به یک میکروتیوب ۱,۵ میلی‌لیتری اضافه شد.

۲- به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از حجم محصول برش ۵۰۰ میکرولیتر از Binding Buffer اضافه و به خوبی پیپتاژ شد.

۳- محلول فوق به فیلتر منتقل و به مدت ۱ دقیقه با دور 13000g در دمای اتاق سانتریفیوژ شد.

۴- به محتویات روی فیلتر ۵۰۰ میکرولیتر از Washing Buffer افزوده و سانتریفیوژ تحت شرایط مرحله قبل تکرار شد.

۵- مجدداً ۲۰۰ میکرولیتر از Washing Buffer به محتویات روی فیلتر افزوده و تحت شرایط ذکر شده سانتریفیوژ صورت پذیرفت.

۶- مایع زیر فیلتر کاملاً خارج و تحت شرایط فوق، بدون افزودن هیچ ماده‌ای سانتریفیوژ انجام شد.

۷- بعد از انتقال فیلتر به میکروتیوب جدید، ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از Elution buffer به آن اضافه شد.

۸- محلول فوق در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و تحت شرایط فوق سانتریفیوژ انجام شد.

۹- محلول حاصل حاوی ژن مورد نظر است که برای تایید بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

کلون سازی توالی داربی پوئتین آلفا در کلونینگ سایت وکتور pOptiVEC

کلون سازی قطعه مورد نظر درون ناقل بیانی، با استفاده از واکنش اتصال انجام می‌گیرد. این واکنش مقدمه‌ای برای مرحله بعد یعنی ترنسفورماسیون می‌باشد. آنزیم به کار گرفته در این واکنش لیگاز می‌باشد که باعث ایجاد پیوند فسفودی‌استر بین دو نوکلئوتید کنار هم می‌گردد. واکنش کلونینگ قطعه DPO و پلاسمید pOptiVEC خطی شده تحت شرایط جدول ۲-۳ انجام گرفت.

جدول ۲-۳- مقدار و نوع ترکیبات موجود در واکنش کلون سازی توالی سازه ژنی داربی پوئتین آلفا در ناقل بیانی pOptiVEC

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pOptiVEC	۸ میکرولیتر
۲	قطعه داربی پوئتین آلفا	۵ میکرولیتر
۳	آنزیم <i>T4</i>	۱ میکرولیتر
۴	Ligation Buffer	۲ میکرولیتر
۵	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

تمامی مواد فوق به خوبی با هم مخلوط شده و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۱۶°C انکوبه شدند.

ترنسفورماسیون

برای ادامه مراحل بعدی و انتقال سازه ژنی درون سلول‌های بیانی پستانداران نیاز به مقادیر بیشتری از نمونه نوترکیب می‌باشد. بدین منظور در این مرحله انتقال DNA نوترکیب به درون سلول‌های مستعد^{۴۳} باکتریایی صورت می‌گیرد تا رشد و تکثیر به سرعت انجام شود.

نحوه کشت و آماده‌سازی سلول‌های مستعد باکتریایی

ابتدا نیاز به آماده‌سازی محلول کلراید کلسیم ۰/۱ مولار استریل، گلیسرول مطلق استریل و محیط کشت LB مایع می‌باشد. مراحل آماده‌سازی سلول‌های مستعد باکتریایی به شرح زیر است:

۱- ۳ میکرولیتر از باکتری TOP10 موجود در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد به ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB مایع حاضر در فالكونی با حجم ۵۰ میلی‌لیتر اضافه و به مدت ۱۲-۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دوران ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

۲- بعد از گذشت مدت زمان لازم، ۲-۳ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری برداشته و به فالكون حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع اضافه گردید و مجدداً برای ۲ تا ۳ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دوران ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

۳- فالكون حاوی باکتری‌های رشد یافته به مدت ۱۰ دقیقه در زیر هود بر روی یخ قرار گرفت.

^{۴۳} Competent Cell

۴- محلول فوق در ۴ فالکون ۵۰ میلی لیتر تقسیم شد و با دوران ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۵- پس از اتمام سانتریفیوژ، فالکون بر روی یخ به زیر هود منتقل شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب باکتریایی بدست آمده ۲۰ میلی لیتر محلول کلراید کلسیم سرد افزوده شد و به طور کامل همگن گردید.

۶- رسوب حل شده در کلراید کلسیم به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت.

۷- در این زمان ۳۰ دقیقه ای، محلول کلراید کلسیم و گلیسرول سرد اتوکلاو شده (با نسبت به ترتیب ۷۰ به ۳۰) باهم مخلوط شده و کاملاً همگن گردید.

۸- پس از گذشت مدت زمان گفته شده، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه با دوران ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید.

۹- مایع روی رسوب حذف گردید و ۲ میلی لیتر از محلول کلراید کلسیم و گلیسرول ساخته شده به رسوب اضافه شده و بر روی یخ کاملاً همگن گردید.

۱۰- در آخر، به هر کرایوویال سرد مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه اضافه شد و به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

ترانسفورماسیون ناقل بیانی نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha به سلول های باکتری

وکتور نو ترکیب که حاوی قطعه داربی پوئتین آلفا است به باکتری DH5 α طبق شرایط زیر ترانسفورم شد:

۱- سلول مستعد ساخته شده از فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد خارج شده و تحت شرایط استریل روی ظرف یخ قرار می گیرد. پس از گذشت ۲ تا ۳ دقیقه، ۱۵ میکرولیتر از ناقل نو ترکیب حاوی ژن به آن افزوده می شود.

۲- این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شده.

۳- به منظور ورود ناقل به داخل باکتری، مخلوط به مدت ۹۰ ثانیه در معرض شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتیگراد قرار می‌گیرد و بلافاصله به مدت ۲ دقیقه روی یخ منتقل می‌شود.

۴- یک میلی‌لیتر از محیط کشت LB (فاقد آنتی بیوتیک) به آن اضافه شده و یک ساعت در انکوباتور شیکردار با حرکت دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شود. این انکوباسیون سبب بیان ژن مقاوم به آنتی بیوتیک می‌شود. این ژن به واسطه ناقل به باکتری وارد شده است.

۵- مخلوط فوق با دور ۱۳۰۰۰ بار در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود.

۶- حدود ۸۰ میکرولیتر از مایع را روی رسوب باقی گذاشته و به آرامی رسوب را در محلول رویی حل می‌کنیم.

۷- روی محیط کشت آگار داخل پلیت ۱۵ میکرولیتر آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین ریخته می‌شود و به کمک پخش کننده، روی سطح پلیت به صورت یکنواخت پخش می‌گردد. سپس مخلوط باکتری کشت داده شده روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک پخش می‌شود.

۸- پلیت برای مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه می‌شود. پس از آن به منظور غربالگری کلون‌های مثبت لازم است تا از آن‌ها کشت خطی تهیه شود.

از تک‌کلونی‌ها کشت خطی انجام می‌شود تا مقدار بیشتری از کلونی‌ها در دسترس باشد. برای انجام کشت خطی، یک پلیت محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تقسیم بندی شد. از تک‌کلونی موجود بر روی پلیت حاوی باکتری کشت داده شده در هر خانه به صورت خطی و مورب کشت داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

تایید ترنسفورماسیون ناقل نوترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha در باکتری با استفاده از

Colony PCR

پس از انجام ترنسفورماسیون لازم است تا غربالگری صورت گیرد و کلون‌های نوترکیب شناسایی شوند. از جمله این غربال‌ها PCR بر روی کلون‌های مثبت می‌باشد. واکنش Colony PCR مانند PCR انجام می‌شود. نحوه آماده شدن DNA الگو بدین صورت است که هر تک کلونی از پلیت کشت خطی درون ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده می‌شود. مواد لازم برای انجام واکنش و برنامه دمایی PCR به ترتیب در جداول ۲-۴ و ۲-۵ ارائه شده است. در نهایت نتیجه بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی گردید.

جدول ۲-۴- مواد لازم و شرایط دمایی برای انجام Colony PCR جهت تایید کلون‌های نوترکیب حاوی سازه ژنی داربی پوئتین آلفا

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	dNTP (10mM)	۰,۸ میکرولیتر
۲	Mgcl2 (50mM)	۱ میکرولیتر
۳	PCR Buffer 10X	۲,۵ میکرولیتر
۴	<i>Taq DNA Polymerase (50u/μl)</i>	۰,۵ میکرولیتر
۵	Primer: F seq on pOptiVEC	۰,۵ میکرولیتر

	(10pmol)	
۰.۵ میکرولیتر	Primer: R DHFR (<i>ECORI</i>) (10pmol)	۶
۱ میکرولیتر	Template	۷
تا ۲۵ میکرولیتر	dH ₂ O	۸

جدول ۲-۵- برنامه دمایی برای انجام Colony PCR جهت تأیید کلون‌های حاوی سازه ژنی داربی پوئین آلفا

ردیف	نوع واکنش	دما	مدت زمان	تعداد سیکل
۱	واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت	۹۴°C	۳۰ ثانیه	۳۰
۳	اتصال پرایمر	۵۷°C	۳۰ ثانیه	۳۰
۴	طویل شدن	۷۲°C	۱ دقیقه	۳۰
۵	بسط نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

تایید ترنسفورماسیون ناقل نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha در باکتری با استفاده از برش

آنزیمی

برای تایید ترنسفورماسیون ژن نو ترکیب در ناقل استخراج شده، ناقل با آنزیم‌های محدودکننده *XhoI* و *EcoRV* که مراحل کلونینگ با آن انجام شده بود برش زده شد به این منظور مواد لازم طبق جدول ۶-۲ با هم ترکیب شدند.

جدول ۶-۲ مقدار و نوع ترکیبات موجود در واکنش برش آنزیمی ناقل بیانی نو ترکیب pOptiVEC-DPO

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pOptiVEC-DPO	۵ میکرولیتر (۱ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>XhoI</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	آنزیم <i>EcoRV</i>	۰,۵ میکرولیتر
۴	Red buffer	۲ میکرولیتر
۵	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

محصول واکنش فوق توسط الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شد.

ذخیره‌سازی کلون‌های مثبت شناسایی شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد

ابتدا کشت شبانه باکتری انجام گرفت. برای این منظور، کلونی مثبت از کشت خطی باکتریایی در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۳ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دوران ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس طبق پروتکل زیر مراحل بعدی انجام گرفت:

۱- نمونه به مدت ۱۵ دقیقه، با دوران ۳۵۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید.

۲- در این فاصله محیط کشت LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک همراه با گلیسرول استریل بر روی یخ به زیر هود منتقل شدند.

۳- ۲ میلی‌لیتر از مخلوط محیط کشت LB مایع و گلیسرول، به نسبت ۷۰ به ۳۰ درصد تهیه شد و بر روی یخ به خوبی همگن گردید.

۴- پس از اتمام سانتریفیوژ مایع رویی حذف گردید.

۵- ۲۰۰۰ میکرولیتر از مخلوط تهیه شده به فالکون اضافه شد. با پیپتاژ کردن بر روی یخ، رسوب باکتریایی در مخلوط گلیسرول و LB تهیه شده حل گردید.

۶- ۱۰۰۰ میکرولیتر از مخلوط فوق به هر کرایوویال نام گذاری شده منتقل و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد و ذخیره گردید.

تعیین توالی نوکلئوتیدهای سازه‌ی ژنی pOptiVEC-DPO

به منظور تایید صحیح بودن توالی تکثیر شده و مشخص شدن عدم وجود جهش، انجام تعیین توالی نوکلئوتیدی ضروری می‌باشد. بنابراین نمونه استخراج پلاسمید کلون انتخابی ناقل بیانی و ژن مورد نظر همراه با پرایمرهای تائید شده جهت توالی‌یابی (Sanger sequencing) به شرکت پیشگام ارسال گردید. تمامی خوانش‌ها پس از دریافت با برنامه‌های CLC Genomics و Nucleotide BLAST از بانک اطلاعاتی NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

آماده سازی وکتور نوترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha جهت ترنسفکشن به لاین سلولی

CHO-DG44

در مرحله آخر، آماده سازی پلاسمید pOptiVEC-Darbepoetin alpha جهت ترنسفکشن به لاین سلولی CHO-DG44 انجام گرفت. برای این منظور، پلاسمید نوترکیب با آنزیم *PvuII* خطی و سپس clean up شد در حجم ۸۰ میکرولیتر با غلظت ۳,۶ میکروگرم برای ترنسفکشن در ۶ml سلول CHO-DG44 آماده شد. شرایط این واکنش در جدول ۷-۲ آمده است.

جدول ۷-۲- مقدار و نوع ترکیبات مورد نیاز جهت خطی‌سازی ناقل بیانی نوترکیب pOptiVEC+Darbepoetin alpha

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pOptiVEC-DPO	۱۰ میکرولیتر (۲ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>PvuII</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	Green buffer	۲ میکرولیتر

۴	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر
---	-------------------	-----------------

تمامی مواد فوق در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.

۲-۴-۲- مراحل کلونینگ ژن داربی پوئتین آلفا در وکتور UCOE

آماده سازی ژن داربی پوئتین آلفا جهت کلون کردن داخل سازه UCOE

کشت مایع و استخراج پلاسمید PUC57

به منظور انتقال قطعه Darbepoetin alpha-IRES-DHFR به پلاسمید UCOE در ابتدا، استخراج پلاسمید pUC57 که حاوی قطعه Darbepoetin alpha-IRES-DHFR می باشد، طبق پروتکل مراحل قبلی توسط کیت High Pure Plasmid Isolation Kit از شرکت Roche انجام گرفت.

واکنش برش آنزیمی توالی داربی پوئتین آلفا از ناقل pUC57

پس از استخراج پلاسمید pUC57 جهت جداسازی قطعه داربی پوئتین آلفا از این وکتور و خارج سازی قطعه مورد نظرمان عمل Digestion یا برش آنزیمی به وسیله آنزیم های محدودالایر *NheI* و *NgoMIV* در دو مرحله طبق شرایط جداول ۲-۸ و ۲-۹ انجام شد. برش اول ابتدا به وسیله آنزیم محدودالایر *NheI* و سپس توسط آنزیم *NgoMIV* انجام شد و پس از هر مرحله Clean up با کیت High Pure PCR Product Purification Kit از شرکت Roche انجام گردید.

سپس، تمام محصول دایجست روی ژل آگارز ۱٪ جهت بررسی بیشتر برده شد.

جدول ۲-۸- مواد و مقدار ترکیبات مورد نیاز جهت برش آنزیمی ناقل pUC57

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pUC57	۱۱ میکرولیتر (۲ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>NheI</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	Tango buffer	۲ میکرولیتر
۴	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

تمام مواد فوق به در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند.

جدول ۲-۹- مواد و مقدار ترکیبات مورد نیاز جهت دومین برش آنزیمی ناقل pUC57

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید pUC57	۱۷,۵ میکرولیتر (۲ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>NgoMIV</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	Cut smart buffer	۲ میکرولیتر

۴	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر
---	-------------------	-----------------

تمام مواد فوق به در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند.

تخلیص قطعه داربی پوئتین آلفا و استخراج آن از ژل

برای به دست آوردن محصول خالص و حذف باندهای اضافه در مرحله برش آنزیمی، باند مورد نظر (قطعه داربی- پوئتین آلفا) از روی ژل برش خورده و تخلیص گردید. بدین منظور محصول ۳ واکنش برشی آماده شد و تخلیص از ژل با کیت High pure PCR product purification همانند مراحل پیشین انجام گردید.

استخراج پلاسمید UCOE و برش آنزیمی

استخراج پلاسمید UCOE طبق پروتکل مراحل قبل با کیت High Pure Plasmid Isolation Kit صورت گرفت.

واکنش برش آنزیمی ناقل UCOE

اولین برش این ناقل به وسیله آنزیم *NheI* انجام و بعد Cleanup شد، سپس برش آنزیمی با آنزیم دوم یعنی *NgoMIV* انجام و مجدد Cleanup شد. شرایط هردو برش آنزیمی به ترتیب در جداول ۲-۱۰ و ۲-۱۱ آمده است.

جدول ۲-۱۰- مواد و مقدار ترکیبات مورد نیاز جهت برش آنزیمی ناقل بیانی UCOE

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید UCOE	۴ میکرولیتر (۲ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>NheI</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	Tango buffer	۲ میکرولیتر
۴	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

تمام مواد فوق به در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند.

جدول ۲-۱۱- مقدار و نوع ترکیبات مورد نیاز جهت دومین برش آنزیمی ناقل بیانی UCOE

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید UCOE	۶ میکرولیتر
۲	آنزیم <i>NgoMIV</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	Cut smart buffer	۲ میکرولیتر
۴	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

تمام مواد فوق به در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند.

کلون سازی توالی داربی پوئتین آلفا در کلونینگ سایت وکتور UCOE

واکنش لیگاسیون و اتصال قطعه Darbepoetin alpha-IRES-DHFR و پلاسمید UCOE خطی شده تحت شرایط

جدول ۱۲-۲ انجام شد.

جدول ۱۲-۲- مواد و مقدار ترکیبات موجود در واکنش کلون سازی توالی سازه ژنی داربی پوئتین آلفا در ناقل بیانی UCOE

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید UCOE	۲ میکرولیتر
۲	قطعه داربی پوئتین آلفا	۱۰ میکرولیتر
۳	آنزیم <i>T4</i>	۱ میکرولیتر
۴	Ligation Buffer	۲ میکرولیتر
۵	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

تمامی مواد فوق به خوبی با هم مخلوط شده و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۱۶°C انکوبه شدند.

ترنسفورماسیون

ترنسفورم وکتور نوترکیب UCOE-DPO-IRES-DHFR به باکتری DH5 α طبق مراحل گفته شده در بخش‌های پیشین صورت پذیرفت. در مرحله آخر از تک کلونی‌ها کشت خطی در پلیت حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین تهیه شد.

شناسایی کلون‌های نوترکیب حاوی سازه ژنی UCOE- Darbepoetin alpha-IRES-DHFR با روش

Colony PCR

مواد لازم برای انجام واکنش و برنامه دمایی Colony PCR جهت شناسایی کلون‌های نوترکیب حاوی این سازه ژنی به ترتیب در جداول ۲-۱۳ و ۲-۱۴ آمده است. محصول این واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید.

جدول ۲-۱۳- مواد لازم برای انجام Colony PCR جهت تایید کلون‌های نوترکیب حاوی سازه ژنی داری پوئتین آلفا

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	dNTP	۰,۸ میکرولیتر
۲	Mgcl2	۱ میکرولیتر
۳	PCR Buffer	۲,۵ میکرولیتر
۴	<i>Taq DNA Polymerase</i>	۰,۵ میکرولیتر
۵	Primer:	۰,۵ میکرولیتر

	F seq on pOptiVEC	
۰.۵ میکرولیتر	Primer: R DHFR (<i>ECORI</i>)	۶
۱ میکرولیتر	Template	۷
تا ۲۵ میکرولیتر	dH ₂ O	۸

جدول ۲-۱۴- برنامه دمایی برای انجام Colony PCR جهت تأیید کلون‌های حاوی سازه ژنی داربی پوئتین آلفا

ردیف	نوع واکنش	دما	مدت زمان	تعداد سیکل
۱	واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت	۹۴°C	۳۰ ثانیه	۳۰
۳	اتصال پرایمر	۵۷°C	۳۰ ثانیه	۳۰
۴	طویل شدن	۷۲°C	۱ دقیقه	۳۰
۵	بسط نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

تایید حضور توالی سازه ژنی Darbepoetin alpha-IRES-DHFR در ناقل بیانی نوترکیب UCOE با

استفاده از واکنش برش آنزیمی

برای تایید حضور ژن Darbepoetin alpha-IRES-DHFR در ناقل نوترکیب UCOE، با آنزیم محدودکننده

NOTI برش آنزیمی انجام گردید. مواد لازم برای این واکنش طبق جدول ۲-۱۵ با هم ترکیب شدند.

جدول ۲-۱۵- مواد و مقدار ترکیبات موجود در واکنش برش آنزیمی ناقل بیانی نو ترکیب UCOE-Darbepoetin alpha

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید UCOE-DPO	۵ میکرولیتر (۱ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>NOTI</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	Orange buffer	۲ میکرولیتر
۴	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

تمامی مواد فوق در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.

ذخیره سازی کلون‌های مثبت شناسایی شده در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد

انجام این مرحله طبق مراحل گفته شده در بخش‌های پیشین صورت پذیرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدهای سازه‌ی ژنی UCOE- Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

به منظور تایید صحیح بودن توالی تکثیر شده و مشخص شدن عدم وجود جهش، انجام تعیین توالی نوکلئوتیدی ضروری می‌باشد. بنابراین نمونه استخراج پلاسمید کلون انتخابی ناقل بیانی و ژن مورد نظر همراه با پرایمرهای

تائید شده جهت توالی‌یابی (Sanger sequencing) به شرکت پیشگام ارسال گردید. تمامی خوانش‌ها پس از دریافت با برنامه‌های CLC Genomics و Nucleotide BLAST از بانک اطلاعاتی NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

آماده سازی وکتور نوترکیب جهت ترنسفکشن به لاین سلولی CHO-DG44

در مرحله آخر، آماده سازی پلاسمید UCOE- DPO-IRES-DHFR جهت ترنسفکشن به لاین سلولی-CHO-DG44 انجام گرفت. برای این منظور، پلاسمید نوترکیب با آنزیم *IsceI* خطی و سپس clean up شد در حجم ۸۰ میکرولیتر با غلظت ۳,۶ میکروگرم برای ترنسفکشن در 6ml سلول CHO-DG44 آماده شد. در جدول ۲-۱۶ مقدار و نوع ترکیبات لازم برای انجام این واکنش آورده شده است.

جدول ۲-۱۶- مواد و مقدار ترکیبات موجود در واکنش خطی سازی ناقل بیانی نوترکیب UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	پلاسمید UCOE-DPO	۱۲ میکرولیتر (۳ میکروگرم)
۲	آنزیم <i>IsceI</i>	۰,۵ میکرولیتر
۳	NEB buffer	۲ میکرولیتر
۴	تا ۲۰ میکرولیتر	dH ₂ O

تمامی مواد فوق در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.

۲-۴-۳- انتقال سازه‌های pOptiVEC- Darbepoetin alpha و UCOE- Darbepoetin

CHO- DG44 alpha -IRES-DHFR به رده سلولی

برای عمل ترنسفکشن نیاز به کشت و آماده‌سازی سلول‌های ترنسفکت نشده که از رده سلولی سلول‌های CHO-DG44 می‌باشد. نحوه کشت و نگهداری این سلول‌ها در ادامه توضیح داده شده است.

شرایط کشت سلول‌های CHO-DG44

دو محیط کشت سلولی با نام‌های CD DG44 medium و CD OptiCHO medium به ترتیب قبل و بعد از ترنسفکت جهت رشد و تکثیر سلول‌های لاین CHO-DG44 مورد استفاده قرار می‌گیرد.

محیط CD DG44 یک محیط شیمیایی تعریف شده و بدون پروتئین است که برای رشد سلول‌های تخمدان همستر چینی (CHO) فاقد لوکوس دی هیدروفلوات ردوکتاز (DHFR) و بیان پروتئین‌های نوترکیب در کشت سوسپانسیون بهینه شده است. فرمولاسیون شیمیایی CD DG44 فاقد لیزات، هیدرولیزات، پروتئین یا اجزای پپتیدی با منشاء حیوانی، گیاهی یا مصنوعی است.

– محیط CD OptiCHO™ به طور خاص برای عملکرد بالا و دستیابی به محصول بیشتر برای سلول‌های CHO نوترکیب تهیه شده است. فرمولاسیون بدون پروتئین و مواد حیوانی، ثبات بیان پروتئین را تضمین می‌کند و نیاز به غربالگری مواد خارجی را جهت بهبود روند رشد و تکثیر کاهش می‌دهد.

– محیط سلول‌های CHO-DG44 نیاز به اضافه کردن ال-گلوتامین دارد. قبل از استفاده از محیط باید به آن ال-گلوتامین اضافه شود تا جایی که غلظت ال-گلوتامین به ۸ میلی مولار برسد.

- اضافه کردن آنتی بیوتیک‌ها توصیه نمی‌شود.
- محیط CD DG44 به نور حساس است. برای گرفتن نتیجه بهتر، این محیط باید در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد و دور از نور نگهداری شود.
- محیط CD DG44 نیاز به اضافه کردن سورفکتانت جهت جلوگیری از تاثیر نیروهای شکننده در محیط کشت سوسپانسیون دارد. به همین منظور لازم است قبل از استفاده مقدار ۱۸ میلی‌لیتر در لیتر از Pluronic® F-68 در شرایط استریل به محیط اضافه شود.
- در مرحله بعد از ترنسفکشن، انتخاب کلون‌های ترنسفکت شده در محیط فاقد هایپوگزانتین- تیمیدین انجام می‌گیرد.

ذوب کردن سلول‌های CHO-DG44

سلول‌های CHO-DG44 در ویال حاوی یک میلی‌لیتر محیط دارای 1×10^7 سلول در هر میلی‌لیتر در ۹۰٪ محیط فریز و ۱۰٪ DMSO قرار دارند. فریز کردن سلول‌های DG44 باید در محیط CD DG44 دارای ۸ میلی مولار گلوتامین و ۱۸ میلی‌لیتر در لیتر Pluronic® F-68 انجام شود. جهت انجام پروسه ذوب کردن طبق پروتکل زیر اقدام می‌کنیم:

- ۱- کرایوویال حاوی سلول‌ها را از تانک نیتروژن بیرون می‌آوریم و به سرعت در کمتر از ۱ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم.
- ۲- جداره بیرونی ویال را با اتانول ۷۰٪ استریل می‌کنیم. به آرامی و به کمک یک سر سمپلر توده‌های سلولی را از هم جدا و کل محتویات کرایوویال را به ارلن حاوی محیط کشت که از قبل گرم شده اضافه می‌کنیم.
- ۳- ارلن را در انکوباتور 37°C روی شیکر اوربیتالی با دور ۱۳۰ تا ۱۳۵ rpm که دارای محیط مرطوب و CO_2 ۸٪ است، قرار می‌دهیم.

۴- بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، دانسیته سلولی و میزان زنده ماندن سلول‌ها را با استفاده از پروتکلی که در ادامه گفته شده تعیین می‌کنیم.

۵- زمانی که تعداد سلول‌ها به بیشتر از 1.2×10^6 سلول زنده در هر میلی‌لیتر رسید، سلول‌ها را پاساژ می‌دهیم.

پاساژ سلول‌های CHO-DG44

وقتی سلول‌ها به تعداد بیشتر از 1.2×10^6 سلول زنده در هر میلی‌لیتر رسیدند باید آن‌ها را مطابق با روش زیر پاساژ بدهیم:

- ۱- تعداد سلول‌های زنده و تعداد کل سلول‌ها را تعیین می‌کنیم.
 - ۲- با استفاده از دانسیته سلول‌ها در مرحله قبل، میزان لازم از سلول‌ها برای اضافه کردن در ارلن جدید به طوریکه به میزان 2×10^5 سلول زنده در هر میلی‌لیتر برسد را محاسبه می‌کنیم.
 - ۳- سلول‌ها را به ارلن حاوی محیط کشت از قبل گرم شده CD DG44 اضافه می‌کنیم.
- فلاسک را در انکوباتور 37°C روی شیکر اوربیتالی با دور ۱۳۰ تا ۱۳۵ rpm که دارای محیط مرطوب و CO_2 ۸٪ است، قرار می‌دهیم.
- نکته: بعد از ۲۵ پاساژ نیاز است که یک ویال جدید از سلول‌ها ذوب شود. برای نگهداری استوک‌های کافی از سلول‌های با پاساژ پایین، نیاز است کرایوویال‌هایی از رده DG44 در تانک نیتروژن فریز شود.

فریز کردن سلول‌های CHO-DG44 در تانک نیتروژن مایع

سلول‌های DG44 را می‌توان مستقیماً در محیط CD DG44 دارای ۱۰٪ DMSO فریز کرد.

- ۱- برای تهیه هر میلی‌لیتر محیط فریز، ۰,۹ میلی‌لیتر محیط کامل CD DG44 را با ۰,۱ میلی‌لیتر از DMSO در یک تیوپ استریل مخلوط می‌کنیم.
- ۲- این محیط را تا زمان استفاده در داخل یخ قرار می‌دهیم. محیط فریز اضافه مانده باید دور ریخته شود.
- ۳- مقدار مورد نظر از سلول‌های DG44 را در ارلن رشد می‌دهیم. زمانی که دانسیته سلول‌ها به 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر رسید آن‌ها را جمع‌آوری می‌کنیم و به میکروتیوپ استریل انتقال می‌دهیم.
- ۴- تعداد سلول‌های کل و تعداد سلول‌های زنده را تعیین می‌کنیم و محیط فریز مورد نیاز برای رسیدن دانسیته نهایی سلول‌ها به 1×10^7 سلول در هر میلی‌لیتر را محاسبه می‌کنیم.
- ۵- سلول‌ها را در دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ می‌کنیم و با دقت محیط رویی را برمی‌داریم. سلول‌ها را در حجم مناسب از محیط فریز سرد شده حل می‌کنیم.
- ۶- مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی را به هر کرایوپریال اضافه می‌کنیم.
- ۷- سلول‌ها را طبق استانداردهای موجود فریز می‌کنیم. بهترین حالت فریز کردن استفاده از دستگاه‌های اتوماتیک برای کم کردن دما به میزان 1°C در هر دقیقه است. در این پژوهش ویال‌های فریز شده را بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در -70°C درجه سانتیگراد جهت نگهداری طولانی مدت به تانک نیتروژن انتقال دادیم.

تعیین دانسیته سلولی و میزان زنده بودن سلول‌ها

- ۱- میزان کمی از سوسپانسیون سلولی را به یک تیوپ انتقال می‌دهیم.
- ۲- با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو میزان زنده بودن سلول‌ها را تعیین می‌کنیم.
- ۳- دانسیته سلولی را با استفاده از culture counter به صورت الکترونیکی یا با استفاده از هموسایتومتر و میکروسکوپ invert به صورت دستی تعیین محاسبه می‌کنیم.

معمول ترین وسیله مورد استفاده جهت انجام شمارش سلولی، لام نئوبار هموسایتومتر است که اساسا برای شمارش سلول های خونی طراحی شده است. این لام ضخیم از یک سری خطوط عمودی و افقی به صورت مشبک تشکیل شده که میانگین تعداد سلول ها در ۴ خانه که خود از ۱۶ خانه کوچکتر تشکیل یافته اند شمارش می گردد. محیط کشت حاوی سلول ها پس از پیپتینگ مناسب جهت جدا شدن کامل سلول های چسبیده به هم، با محلول کوماسی بلو (با نسبت مساوی) مخلوط شده و در زیر لامل بر روی این لام لود می شود.

تعداد سلول ها مساوی است با : میانگین تعداد سلول های شمارش شده حاصل از ۴ خانه $\times$ حجم محیط کشت حاوی سلول ها $\times$ ضریب رقت $\times 10^4$

ترنسفکشن سلول های CHO-DG44 توسط ناقل های بیانی نو ترکیب pOptiVEC-DPO و UCOE-

DPO_IRES_DHFR

ضروری است تعداد سلول های مورد نیاز جهت ترنسفکشن محاسبه شود و قبل از ترنسفکشن از سلامت سلول ها و میزان زنده بودن بالای ۹۵٪ آن ها اطمینان حاصل شود. برای دستیابی به Pool های دارای بیان بالا و داشتن امکان انتخاب بین آن ها، هر سازه در دو Pool سلولی به صورت جداگانه ترنسفکت شد. جهت جلوگیری از کاهش کارایی ترنسفکشن نیاز است قبل از رسیدن دانسیته سلول ها به دو میلیون سلول در هر میلی لیتر ترنسفکشن انجام شود. ترنسفکشن رده سلولی CHO-DG44 توسط FreeStyle™ MAX Reagent طبق پروتکل کیت و به شکل زیر انجام شد:

۱-۴۸ ساعت قبل از ترنسفکشن، سلول ها را در دانسیته 3×10^5 سلول در هر میلی لیتر در محیط کامل CD DG44 پاساژ و به انکوباتور انتقال می دهیم.

۲-۲۴ ساعت قبل از ترنسفکشن، سلول ها را در دانسیته 3×10^5 سلول در هر میلی لیتر در محیط کامل CD DG44 پاساژ و به انکوباتور انتقال می دهیم.

۳- در روز ترنسفکشن، شمارش تعداد سلول‌های زنده را انجام می‌دهیم، جهت اطمینان از نتیجه ترنسفکشن میزان سلول‌های زنده باید ۹۵ درصد کل سلول‌ها باشد.

۴- حجم سلول‌های ترنسفکت شده با توجه به مقدار پلاسמיד آماده کرده از قبل دارد. در این طرح از پلاسמיד pOptiVEC و UCOE هر کدام به اندازه ۳,۶ میکروگرم جهت انجام ترنسفکت در حجم ۶ میلی لیتر سلول (دو تا ۳ میلی لیتر در دو Well از 6Well) آماده شد.

۵- برای ۳,۶ میکروگرم پلاسמיד به ۱۲۰ میکرولیتر OptiPRO™ SFM نیاز داریم که پیش از استفاده باید گرم شود. همچنین به ۳ میکرولیتر FreeStyle نیاز داریم.

۶- در یک تیوپ ابتدا OptiPRO™ SFM را همراه با پلاسמיד ترکیب کرده و کامل پیپتاژ می‌کنیم. سپس در تیوپ دیگری ۳ میکرولیتر FreeStyle™ MAX همراه با ۱۲۰ میکرولیتر از OptiPRO™ SFM ترکیب کرده و در نهایت ترکیب این دو تیوپ را باهم مخلوط می‌کنیم.

۷- این مخلوط را ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم تا کمپلکس DNA و لیپید شکل بگیرد.

۸- به آرامی این مخلوط را به سلول‌ها اضافه می‌کنیم و ظرف حاوی سلول‌ها را به صورت دَوار به آرامی تکان می‌دهیم.

۹- پلیت 6Well را در انکوباتور ۳۷°C که دارای محیط مرطوب و CO₂ ۸٪ است، قرار می‌دهیم.

انتخاب کلون‌های سلولی ترنسفکت شده

۴۸ ساعت بعد از ترنسفکشن، انتخاب کلون‌های ترنسفکت شده CHO-DG44 در محیط اختصاصی فاقد هایپوگزانتین و تیمیدین CD OptiCHO™ صورت گرفت. به این صورت که هم‌زمان با پاساژ سلول‌ها محیط کامل CHO-DG44 با محیط CD OptiCHO™ به طور کامل تعویض شد. این پروسه به مدت ۱۸ روز تا انتخاب سلول‌های مثبت ادامه پیدا کرد.

تایید درج سازه ترنسفکت شده در ژنوم سلول CHO-DG44

استخراج DNA از سلول‌های ترنسفکت شده

DNA سلول‌های ترنسفکت شده با استفاده از کیت High Pure PCR Template preparation kit استخراج شد.

روش انجام کار به شکل زیر است:

۱- با استفاده از لام نئوبار شمارش سلولی انجام شد و حدود ۱ میلیون سلول به درون فالكون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافت.

۲- فالكون حاوی سلول‌ها با شرایط ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی حذف شد.

۳- ۱۵۰ میکرولیتر PBS هم‌دما به آن اضافه و در نهایت حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شد و رسوب کاملاً در PBS حل شد.

۴- ۲۰۰ میکرولیتر Binding Buffer به آن اضافه شد.

۵- ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه و حل گردید.

۶- نمونه به خوبی مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

۷- به تیوپ حاوی نمونه ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شد و به خوبی میکس گردید.

۸- محتویات داخل تیوپ روی فیلتر ریخته و با ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۹- پس از سانتریفیوژ فیلتر تیوپ را روی کالکشن تیوپ جدید قرار گرفت و ۵۰۰ میکرولیتر از Inhibitor removal buffer روی فیلتر ریخته شد و به شرایط قبلی به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۱۰- فیلتر تیوپ روی یک کالکشن تیوپ جدید گذاشته شد و به آن ۵۰۰ میکرولیتر Wash buffer اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه با ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۱۱- فیلتر تیوپ روی کالکشن تیوپ جدید قرار گرفت و مجدداً به آن ۵۰۰ میکرولیتر Wash buffer اضافه شد و با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید.

۱۲- فیلتر تیوپ خالی به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد.

۱۳- در مرحله آخر ۲۰۰ میکرولیتر Elution Buffer روی فیلتر ریخته شد و پس از گذشت چند دقیقه سانتریفیوژ گردید.

غلظت نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول ۱۷-۲ آمده است.

جدول ۱۷-۲- غلظت‌های DNA استخراج شده جهت بررسی درج ژن مورد نظر در ژنوم سلول

۲۶۰/۲۳۰	۲۶۰/۲۸۰	غلظت	لاین سلولی
۱,۶	۱,۹	۶۲,۷ ng/ μ l	pOptiVEC-DPO Pool1
۱,۶	۱,۹	۶۴,۸ ng/ μ l	pOptiVEC-DPO Pool2
۱,۷	۱,۹	۵۷,۸ ng/ μ l	UCOE-DPO Pool1
۱,۵	۱,۸	۵۱,۲ ng/ μ l	UCOE-DPO Pool2

PCR جهت تایید درج سازه ژنی pOptiVEC-DPO و UCOE-DPO+IRES+DHFR در ژنوم

سلول‌های ترنسفکت‌شده

برای اطمینان از درج ژنوم ناقل‌های بیانی نو ترکیب در ژنوم سلول‌های نو ترکیب، PCR برای ژن داربی پوئتین آلفا در ژنوم هر دو لاین سلولی با استفاده از دو پرایمر تائید شده جهت تکثیر قطعه‌ای از این ژن بر روی DNA استخراج شده از سلول‌های CHO DG44 ترنسفکت‌شده (دو Pool از pOptiVEC-DPO و دو Pool از UCOE-DPO-IRES-DHFR) و لاین سلولی خام ترنسفکت‌نشده انجام گرفت. مقادیر و شرایط دمایی این واکنش در جداول ۱۸-۲ و ۱۹-۲ آمده است. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

جدول ۱۸-۲- مقادیر و شرایط PCR جهت بررسی لاین‌های سلولی به دست آمده

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	dNTP (10mM)	۰,۸ میکرولیتر
۲	Mgcl ₂ (50mM)	۱ میکرولیتر
۳	10X PCR Buffer	۲,۵ میکرولیتر
۴	<i>Taq DNA Polymerase</i> (50u/μl)	۰,۵ میکرولیتر
۵	Primer: F seq on pOptiVEC (10pmol)	۰,۵ میکرولیتر
۶	Primer: R DHFR (<i>ECORI</i>) (10pmol)	۰,۵ میکرولیتر
۷	Template	۱ میکرولیتر
۸	dH ₂ O	تا ۲۵ میکرولیتر

جدول ۲-۱۹- برنامه دمایی PCR بر روی لاین‌های سلولی

ردیف	نوع واکنش	دما	مدت زمان	تعداد سیکل
۱	واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت	۹۴°C	۳۰ ثانیه	۳۰
۳	اتصال پرایمر	۵۷°C	۳۰ ثانیه	۳۰
۴	طویل شدن	۷۲°C	۱ دقیقه	۳۰
۵	بسط نهایی	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

پس از تأیید درج ژن داربی پوئتین آلفا در رده سلولی CHO-DG44 از تمام ۴ لاین سلولی به دست آمده کرایوویال-هایی با تعداد مناسبی از سلول فریز گردید.

۲-۴-۴- بررسی کیفی و کمی بیان داربی پوئتین آلفا

داربی پوئتین آلفا یک پروتئین ترشحی می‌باشد که سلول‌های CHO قادر به ترشح آن در محیط کشت مصرفی می‌باشند. پس برای بررسی کمی و کیفی داربی پوئتین آلفا نیاز به جمع آوری سوپرناتانت^{۴۴} سلولی و استخراج

^{۴۴} Supernatant

پروتئین از سلول‌ها می‌باشد. بررسی بیان پروتئین با روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد که از جمله آن‌ها بررسی کیفی توسط Real-time PCR، SDS-PAGE و Western blot و بررسی کمی توسط تکنیک الایزا^{۴۵} می‌باشد.

آماده‌سازی نمونه‌های لازم برای مرحله بررسی بیان ژن داربی پوئین آلفا

برای سنجش بیان، علاوه بر سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل بیانی نوترکیب، نیاز به ۲ نمونه کنترل می‌باشد:

۱- داروی اریتروپوئین به عنوان کنترل مثبت

۲- سلول‌های CHO ترنسفکت نشده (رده سلولی خام) به عنوان کنترل منفی

سه نکته خیلی مهم در این مرحله قابل توجه بود:

۱- تعداد سلول‌هایی که استخراج پروتئین از آنها انجام می‌گیرد باید در هر ۴ گروه کاملاً یکسان باشد (که در این مطالعه ۶ میلیون سلول در نظر گرفته شد).

۲- در جمع‌آوری محیط کشت، مدت زمان بعد از تعویض محیط کشت تا زمان جمع‌آوری آن، باید در هر ۴ گروه کاملاً یکسان باشد. (در این مطالعه برای جمع‌آوری سوپرناتانت سلولی، ۵ روز به سلول‌ها فرصت ترشح داده شد).

۳- در زمان ۵ روز به هنگام جمع‌آوری سوپرناتانت سلولی، تعداد سلول‌های موجود در هر ۴ ارلن باید حدوداً یکسان باشد.

۲-۴-۱- بررسی بیان در سطح mRNA

استخراج RNA به صورت دستی و طبق مراحل زیر انجام شد:

- ۱- ابتدا تعداد ۴ میلیون سلول از هر ۴ گروه به مدت ۵ دقیقه با 1200 g سانتریفیوژ شد.
- ۲- به رسوب سلولی 300 میکرولیتر ترايزول اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد و برای ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه گردید.
- ۳- 150 میکرولیتر از کلروفرم به میکروتیوپ حامل نمونه اضافه شد و به خوبی ورتکس و Invert گردید.
- ۴- به مدت ۱۰ دقیقه با 12000 g و دمای ۴ درجه سانتی گراد نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند.
- ۵- پس از سانتریفیوژ ۳ فاز رنگی متفاوت در میکروتیوپ مشاهده شود. فاز بالایی RNA، فاز وسط DNA و فاز پایینی پروتئین است. در این مرحله فاز بالایی، جدا و به میکروتیوپ جدید منتقل شد.
- ۶- هم حجم فاز بالایی ایزوپروپانول به نمونه اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای -20 درجه سانتی گراد انکوبه شد.
- ۷- نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با شرایط فوق سانتریفیوژ شد.
- ۸- محیط رویی کاملاً خارج شد و 500 میکرولیتر اتانول 70% سرد برای شست و شو به آن اضافه شد.
- ۹- به مدت ۵ دقیقه با 8000 g و دمای ۴ درجه سانتیگراد میکروتیوپ حاوی نمونه سانتریفیوژ شد و پس از آن محیط رویی به طور کامل خارج شد.
- ۱۰- پس از گذشت چند دقیقه 50 میکرولیتر آب عاری از RNase به رسوب داخل میکروتیوپ اضافه شد.
- ۱۱- غلظت و کیفیت نمونه با دستگاه نانودراپ بررسی شد.

تیمار RNA استخراج شده با آنزیم DNase

این مرحله با هدف حذف DNA موجود در نمونه RNA استخراج شده از لاین‌های سلولی ترنسفکت شده طبق مواد و مقادیر جدول ۲-۲۰ انجام شد.

جدول ۲-۲۰ مواد و مقادیر مورد استفاده جهت تیمار نمونه RNA

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	نمونه RNA	۶,۵ میکرولیتر (۳ میکروگرم)
۲	10X DNaseI Buffer	۲ میکرولیتر
۳	DNaseI (1u/μl)	۲ میکرولیتر
۴	EDTA (50mM)	۲ میکرولیتر
۵	dH ₂ O	تا ۲۰ میکرولیتر

۱- نمونه آماده شده با تمام مواد (به جز EDTA) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

۲- پس از آن ۲ میکرولیتر EDTA به آن اضافه شد.

۳- میکروتیوپ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

۴- غلظت نمونه نهایی با دستگاه نانودراپ خوانده شد.

سنتز cDNA

برای سنتز cDNA بر اساس جذب خوانده شده از RNA استخراجی مقدار ۱ میکروگرم از نمونه برداشته شد. همزمان برای بررسی صحت سنتز cDNA و همچنین تأیید خلوص RNA استخراجی و عدم وجود DNA ژنومی دو واکنش RT^+ و RT^- در نظر گرفته شد. بدین صورت که در واکنش‌های RT^- از آنزیم رونوشت بردار معکوس استفاده نمی‌شود. برای انجام واکنش مواد لازم طبق جدول ۲-۲۱ اضافه می‌شود. نمونه‌ها ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد و سپس مواد جدول ۲-۲۲ به آن‌ها اضافه شد.

جدول ۲-۲۱-مواد لازم برای سنتز مرحله اول cDNA

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	نمونه RNA	۷,۳ میکرولیتر (۳ میکروگرم)
۲	Oligo (dT) primer	۲ میکرولیتر
۳	Nuclease free water	تا ۱۲ میکرولیتر

جدول ۲-۲۲-مواد لازم برای سنتز مرحله دوم cDNA

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم
۱	5X Reaction Buffer	۴ میکرولیتر
۲	RiboLock RNase Inhibitor (20u/μl)	۱ میکرولیتر
۳	dNTP Mix (10mM)	۲ میکرولیتر

۱ میکرولیتر	<i>Aid Reverse Revert Transcriptase (200u/μl)</i>	۴
تا ۲۰ میکرولیتر	Nuclease free water	۵

با استفاده از برنامه دمایی جدول ۲-۲۳ سنتز cDNA تکمیل شد.

جدول ۲-۲۳- برنامه دمایی مورد استفاده برای سنتز cDNA

زمان	دما	ردیف
۶۰ دقیقه	۴۲ درجه سانتی گراد	۱
۱۰ دقیقه	۷۰ درجه سانتی گراد	۲

تایید صحت سنتز cDNA

در مرحله بعد، جهت اطمینان از صحت cDNA سنتز شده واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن داربی پوئتین آلفا بر روی نمونه‌های RT⁺ و RT⁻ انجام شد. برای انجام واکنش PCR بر روی cDNA سنتز شده از مواد و برنامه دمایی که در جداول ۲-۲۴ و ۲-۲۵ ذکر شده است، استفاده شد.

جدول ۲-۲۴- مواد مورد نیاز جهت واکنش RT-PCR

مقادیر لازم	نام ماده	ردیف
۱۲,۵ میکرولیتر	Master Mix	۱
۰,۵ میکرولیتر	Primer:	۵

	F Real EPO (10pmol)	
۰.۵ میکرولیتر	Primer: R DHFR (<i>ECORI</i>) (10pmol)	۶
2 میکرولیتر	Template	۷
تا ۲۵ میکرولیتر	dH ₂ O	۸

جدول ۲-۲۵- برنامه دمایی جهت واکنش RT-PCR

ردیف	نوع واکنش	دما	مدت زمان	تعداد سیکل
۱	واسرشت اولیه	۹۴°C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت	۹۴°C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمر	۵۷°C	۳۰ ثانیه	۳۵
۴	طویل شدن	۷۲°C	۱ دقیقه	۳۵
۵	بسط نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا توسط واکنش Real-time PCR

در طراحی پرایمرهای این تست از cDNA ژن داربی پوئتین استفاده شد. علاوه بر رعایت مواردی که در طراحی پرایمرهای PCR رعایت می شود برای طراحی پرایمر واکنش Real-Time PCR موارد زیر نیز باید رعایت گردد:

۱- در محدوده ۶۰ درجه پرایمر به توالی متصل گردد و اختلاف دمای موجود بین دو پرایمر طراحی شده بیشتر از یک درجه نباشد.

۲- طول هر دو توالی طراحی شده تقریباً یکسان و در حدود ۱۷-۲۲ نوکلئوتید باشد.

۳- درصد GC در هر دو توالی در حد امکان یکسان و بین ۴۵-۵۰ درصد باشد.

۴- طول توالی تکثیر شده بین ۷۵ تا ۲۰۰ نوکلئوتید باشد.

در این تست استخر سلولی که دارای CT بالاتر و بیان کمتر بود به عنوان مرجع در نظر گرفته شد و بیان بقیه لاین‌های سلولی با این لاین مقایسه شد.

لیست مواد و برنامه دمایی واکنش qPCR در جداول ۲-۲۶ و ۲-۲۷ ذکر شده است. برای بررسی میزان بیان از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد و ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.

جدول ۲-۲۶- مواد و مقادیر استفاده شده در واکنش Real-time PCR

ردیف	نام ماده	مقدار
۱	SYBER Green	۵ میکرولیتر
۲	Forward primer (10pmol/ μ l)	۱ میکرولیتر
۳	Reverse primer (10pmol/ μ l)	۱ میکرولیتر
۵	cDNA (50 ng)	۱ میکرولیتر
۴	dH2o	تا ۲۰ میکرولیتر

ردیف	نوع واکنش	دما	مدت زمان	تعداد سیکل
۱	دمای واسرشت اولیه	۹۵ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	۱
۲	دمای واسرشت	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۰ ثانیه	۴۰
۳	دمای اتصال پرایمر	۶۰ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	
۴	دمای طولیل شدن	۷۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	
۵	دمای بسط نهایی	۷۲ درجه سانتی گراد	۱۰ ثانیه	۱

جدول ۲-۲۷- برنامه دمایی Real-time PCR

۲-۴-۴-۲- بررسی کیفی و کمی بیان در سطح پروتئین

در این مرحله بیان پروتئین در سطح کیفی با SDS-PAGE و Western blot بررسی می‌شود و بررسی کمی این پروتئین با تکنیک الایزا خواهد بود.

تغلیظ سوپرناتانت سلولی با فیلتر

طبق اطلاعات فصل اول وزن مولکولی داربی پوئین آلفا ۳۷ کیلو دالتون می‌باشد. بنابراین برای انجام تغلیظ سوپرناتانت سلولی از فیلتر Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices با poreهایی به اندازه 10k استفاده شد. اندازه این Poreها باعث می‌شود تا در نهایت پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون جدا سازی شوند.

ترتیب مراحل به شرح زیر است:

۱- بر روی فیلتر تا جایگاه دارای علامت آب مقطر ریخته شد.

۲- فالكون حاوی فیلتر داخل سانتریفیوژ گذاشته و در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۴۵۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۳- آب مقطر بالا و زیر فیلتر با استفاده از سمپلر خارج شد و نمونه سوپرناتانت سلولی بر روی فیلتر ریخته شد.

۴- سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۴۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید.

۵- محلول رویی فیلتر حاوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون می‌باشد.

۶- جهت نگه داری فیلتر پس از اتمام کار بار دیگر فیلتر، با آب مقطر طبق مرحله ۱ و ۲ شست و شو داده شد.

۷- آب مقطر خارج شد و تا محل علامت گذاری شده روی فیلتر اتانول ۲۰٪ ریخته شد. همچنین داخل فالكون و زیر فیلتر نیز اتانول ۲۰٪ ریخته شد.

۸- فالكون حاوی فیلتر در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

استخراج پروتئین از سلول

برای این منظور از سلول‌های CHO ترنسفکت‌شده با ناقل بیانی نو ترکیب و سلول‌های ترنسفکت‌نشده به عنوان کنترل استفاده شد. سلول‌های استفاده شده برای این منظور باید از نظر تعداد و شرایط کشت در شرایط مشابه جمع‌آوری شوند. استخراج پروتئین با استفاده از کیت Qproteome Mammalian Protein Prep Kit انجام شد که در ادامه به مراحل آن اشاره می‌شود.

۱- پس از شمارش سلول‌ها محیط کشت حاوی تعداد 6×10^6 cell/ml سلول با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۲- محیط کشت رویی برداشته شد و به رسوب سلولی ۵ میلی لیتر PBS سرد اضافه شد و پیپتاژ انجام شد.

۳- محلول در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۴۵۰ یا ۲۰۸۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۴-مراحل ۲ و ۳ یکبار دیگر تکرار شد.

۵-به رسوب سلولی حاصل، ۴۰۰ میکرولیتر PBS سرد اضافه کرده و رسوب به خوبی در آن حل شد.

۶- ۱۰ میکرولیتر protease inhibitor و ۲ میکرولیتر بنزونوکلئاز اضافه شد.

۷-محلول حاصل به مدت ۲ ساعت در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت.

۸-پس از آن ویال از فریزر خارج شد و در ظرف یخ روی شیکر به مدت ۴۰ دقیقه قرار گرفت تا یخ آن به آرامی ذوب شود.

۹-مرحله ۶ و ۷ بار دیگر جهت فریز و دفریز تکرار شد.

۱۰-در نهایت محلول حاصل برای ۱۴ الی ۱۶ ساعت در فریزر قرار داده شد.

۱۱-پس از آن برای ذوب بلورهای یخ تشکیل شده ویال حاوی محلول استخراج در ظرف یخ بر روی شیکر قرار گرفت.

۱۲-در انتها نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد.

۱۳-مایع رویی که حاوی پروتئین استخراج شده از سلول‌ها می‌باشد، جدا شده و به ویال جدید منتقل شد.

۱۴ جذب نمونه‌های پروتئینی در طول موج ۲۸۰ نانومتر با دستگاه نانودراپ خوانش شد.

جهت انجام تست SDS-PAGE نمونه‌های پروتئینی استخراج شده با استفاده از فیلتر تغلیظ شدند.

SDS-PAGE

یک روش کم هزینه، سریع و تکرارپذیر در مطالعه پروتئین‌ها است. قابلیت تفکیک‌کنندگی بسیار بالای روش SDS-PAGE عمدتاً ناشی از وجود سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ویژگی مناسب ژل پلی‌اکریل‌آمید در غربال پروتئین‌های مختلف است. SDS با اتصال به پروتئین‌ها بار طبیعی آن‌ها را می‌پوشاند و بار منفی با تراکم تقریباً مشابهی در این مولکول‌ها ظاهر می‌سازد. جداسازی پروتئین‌ها در این شرایط وابسته به اندازه مولکولی و غلظت ژل پلی‌اکریل‌آمید است. با توجه به اندازه منافذ ژل، حرکت پروتئین‌های کوچک‌تر با مزاحمت کمتر و حرکت پروتئین‌های بزرگ‌تر با مزاحمت بیشتری همراه است. مسافت طی شده توسط پروتئین‌ها در پایان الکتروفورز با وزن مولکولی آن‌ها تناسب دارد. این موضوع اساس تعیین وزن مولکولی در روش SDS-PAGE را تشکیل می‌دهد.

آماده سازی نمونه جهت انجام تست SDS-PAGE

جهت آماده‌سازی نمونه برای SDS-PAGE، Sample buffer 5X با نسبت معینی به نمونه افزوده شد، سپس نمونه برای مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از خنک شدن Spin شد و برای انتقال به ژل آماده شد. در این شرایط پروتئین‌ها به واسطه اثر SDS ای که در بافر وجود دارد کاملاً واسرشت می‌گردند. پیوندهای دی‌سولفیدی توسط مواد تیول دار مانند ۲-مرکاپتو اتانول که در بافر وجود دارد احیا شده و در نهایت باعث جدا شدن زیرواحدهای پروتئینی می‌شود. در نتیجه امکان اتصال SDS به تمام ساختمان پروتئین فراهم می‌شود. مقدار SDS در بافر نمونه بایستی چندین برابر مقدار پروتئین باشد (حداقل ۳ به ۱)، زیرا در صورت اشباع نشدن پروتئین‌ها با SDS، حرکت الکتروفورزی و وزن مولکولی آن‌ها با هم تناسبی ندارد. بدین لحاظ رعایت نسبت وزن SDS به پروتئین، بخصوص در محلول‌های با غلظت بالای پروتئین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

تهیه ژل SDS-PAGE

ژل مورد استفاده در SDS-PAGE ۲ ژل با استفاده از ۲ محلول جداگانه تهیه می‌باشد. تفاوت اصلی دو محلول در غلظت آکریل‌آمید می‌باشد. ژل بالا Stacking (ژل متراکم‌کننده) و ژل پایین Resolving (ژل جداکننده) نام دارد که دارای غلظت و تراکم بالاتری می‌باشد. مواد و مقادیر لازم برای تهیه ژل‌های ۱۲ درصد Resolving و Stacking به ترتیب در جدول‌های ۲-۲۸ و ۲-۲۹ آمده است:

جدول ۲-۲۸-مقدار و نوع ترکیبات موجود در ساخت ژل Resolving

ردیف	نام ماده	مقادیر لازم ژل ۱۲ درصد (۵ ml)
۱	آب مقطر	۱/۶
۲	مخلوط آکریل - بیس آکریل‌آمید با غلظت ۳۰ درصد	۲/۰
۳	Tris - Base ۱/۵ مولار (pH=۸/۸)	۱/۳
۴	SDS با غلظت ۱۰ درصد	۰/۰۵
۵	آمونیم‌پرسولفات با غلظت ۱۰ درصد	۰/۰۵
۶	TEMED	۰/۰۰۲

جدول ۲-۲۹-مقدار و نوع ترکیبات موجود در ساخت ژل Stacking

ردیف	نوع ماده	مقادیر لازم به ازای ژل ۵ درصد (۲ml)
۱	آب مقطر	۱/۴
۲	مخلوط آکریل - بیس آکریل‌آمید با غلظت ۳۰ درصد	۰/۳۳

۰/۲۵	۵ Tris - Base. مولار (pH = ۶/۸)	۳
۰/۰۲	SDS با غلظت ۱۰ درصد	۴
۰/۰۲	آمونیم پرسولفات با غلظت ۱۰ درصد	۵
۰/۰۰۲	TEMED	۶

برای ساخت ژل، صفحات شیشه ای کاملاً تمیز و با چند گیره محکم شد و به صورت عمودی روی یک سطح صاف قرار گرفت (ضخامت ژل ۱ میلی متر در نظر گرفته شد). اجزای ژل پایین در یک ظرف مناسب مخلوط شد و پس از هم زدن به سرعت و با دقت در قالب شیشه ای تا ارتفاع مناسب ریخته شد، به طوری که حدود ۳ سانتی متر فضا برای ژل بالا باقی ماند. حدود ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر به آرامی از کناره شیشه روی سطح ژل ریخته شد، به نحوی که با ژل مخلوط نگردد. این کار به منظور صاف شدن سطح ژل و جلوگیری از تماس هوا با آن است. انعقاد ژل پایین معمولاً ۱۵-۴۵ دقیقه طول می کشد. بعد از انعقاد ژل پایین، محلول ژل بالا (ژل متراکم کننده) تهیه شد، غلظت این ژل معمولاً ۵ درصد است. آب روی ژل پایین کاملاً تخلیه و محلول ژل بالا سریعاً تا ارتفاع مناسب روی ژل پایین ریخته شد. سپس شانه در ژل بالا قرار گرفت، ژل بالا معمولاً در کمتر از ۱۵ دقیقه منعقد می شود.

بارگذاری نمونه ها روی ژل SDS-PAGE

پس از آماده سازی نمونه ها که پیش از این توضیح داده شد آن ها به ترتیب و با حجم مناسب و یکسان در چاهک ها لود می شوند. پس از لود نمونه ها بر روی ژل همراه با نشانگر وزن مولکولی، این ژل در تانک الکتروفورز حاوی Running Buffer قرار داده شد. ابتدا با ولتاژ ۸۰ و پس از ورود نمونه ها به ژل پایین ولتاژ به ۱۲۰ تغییر کرد. با رسیدن رنگ نشانگر به انتهای ژل، جریان برق قطع و قالب شیشه ای از تانک الکتروفورز جدا شد.

پس از آن، ژل به مدت یک ساعت در رنگ کوماسی بلو به منظور مشاهده باندهای پروتئینی قرار گرفت. سپس جهت از بین رفتن رنگ اضافی زمینه، ژل در آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد جوشانده شد و با آب مقطر دو مرتبه شست و شو داده شد. پس از طی این مراحل باندهای پروتئینی به تفکیک وزن مولکولی بر روی ژل قابل مشاهده هستند.

وسترن بلاتینگ

وسترن بلاتینگ روشی است که برای تشخیص و آنالیز پروتئین‌ها استفاده می‌شود. این روش یک آزمایش تاییدی و شامل سه مرحله‌ی اصلی زیر است:

مرحله اول: تفکیک پروتئین‌ها توسط الکتروفورز نمونه در ژل آکریل آمید

مرحله دوم: انتقال پروتئین به کاغذ پلی‌وینیل دی‌فلوراید (PVDF^{۴۶})

مرحله سوم: شناسایی پروتئین اختصاصی

پروتئین موجود در نمونه تحت جریان الکتریکی که در محیط ایجاد می‌شود و بر اساس اندازه پروتئین‌ها از یکدیگر جدا شده و باندهایی را روی ژل ایجاد می‌کنند. سپس نوارهای ایجاد شده از نمونه و کنترل به یک کاغذ PVDF از طریق تماس غشا با ژل انتقال می‌یابد. در نهایت برای آشکارسازی پروتئین‌هایی که به کاغذ اتصال پیدا کرده‌اند، از آنتی بادی نشاندار ضد پروتئین مورد نظر استفاده می‌شود.

⁴⁶ Polyvinylidene difluoride

مراحل انجام وسترن بلاتینگ

- ۱- ابتدا ژل SDS-PAGE و الکتروفورز نمونه‌ها انجام شد.
- ۲- برای انتقال باندهای پروتئینی از کاغذ PVDF استفاده شد. این کاغذ به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در متانول، ۳۰ ثانیه در آب مقطر و چند دقیقه در Transfer Buffer قرار داده شد.
- ۳- پس از فعال شدن PVDF از قطب منفی به سمت قطب مثبت ساندویچ وسترن آماده شد. به ترتیب ابتدا یک لایه ابر، سپس کاغذ صافی، ژل SDS-PAGE، کاغذ PVDF، کاغذ صافی، یک لایه ابر قرار گرفت. (توجه شود که هرکدام از لایه‌ها قبل از استفاده توسط بافر انتقال کاملاً خیس شد).
- ۴- این ساندویچ درون یک تانک مخصوص حاوی بافر انتقال قرار گرفت و تانک به منبع جریان برق متصل شد و با ولتاژ ۱۷ به مدت ۱۶ ساعت الکتروفورز انجام شد. طی این مدت پروتئین‌ها از ژل به کاغذ PVDF منتقل شدند. پس از آن، محلول بلوکه‌کننده، آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه اختصاصی و محلول‌های شست و شو، به طور جداگانه به کاغذ PVDF اضافه شد.
- ۵- جهت بلوکه کردن ممبران PVDF به مدت ۲ ساعت در ظرف حاوی Skim milk بر روی شیکر قرار داده شد.
- ۶- در مرحله بعد سطح ممبران با یک میکروگرم آنتی‌بادی اولیه با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و رقت ۱/۱۰۰۰ در حجم ۱۰ میلی‌لیتر TBST پوشانده شد و به مدت ۱ ساعت و سی دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت.
- ۷- شست و شو آنتی‌بادی اولیه ممبران سه مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در TBST بر روی شیکر انجام شد.
- ۸- پس از شست و شوی آنتی‌بادی اولیه، به ممبران آنتی‌بادی ثانویه Anti-RABBIT با رقت ۱/۳۵۰۰۰۰ در محلول TBST به مدت ۱ ساعت قرار داده شد.
- ۹- پس از آن ممبران PVDF را ۴ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با TBST شستشو داده شد.

۱۰- در انتها روی ممبران را با محلول ECL پوشانده و به وسیله دستگاه Gel doc عکسبرداری انجام شد.

الایزا (ELISA^{۴۷})

برای انجام این تست از کیت DuoSet ELISA Human Erythropoietin استفاده شد. به دلیل بالاتر بودن بیان پروتئین داربی پوئتین آلفا از میزان ماکزیمم سنجش این کیت، نمونه‌های سوپرناتانت سلولی ۱ به ۲۰۰ با محلول Reagent Diluent رقیق شدند.

۱- برای شروع کار تمام مواد به دمای محیط رسیدند.

۲- روز اول Capture Ab داخل چاهک‌ها Coat شد. برای این کار از Working آن با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به تعداد چاهک‌ها و حجم ۱۰۰ میکرولیتر این ماده رقیق شود.

۳- چاهک‌های Coat شده به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق گذاشته شدند.

۴- شست و شوی چاهک‌ها ۳ مرتبه با Wash Buffer و برای هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر انجام شد.

۵- پلیت حاوی چاهک‌ها با محلول Reagent Diluent به مدت ۱ ساعت بلاک گردید. حجم هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر بود.

۶- ۳ مرتبه شست و شو طبق مرحله ۴ انجام شد.

۷- نمونه سوپرناتانت سلولی و پروتئین استخراج شده سلول همراه با نمونه کنترل منفی، نمونه داروی اریتروپوئتین و استانداردهای داخل کیت هر کدام در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌ها لود شدند و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت.

^{۴۷} Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

۸-۳ بار شست و شو طبق مراحل فوق انجام شد.

۹- در هر چاهک از محلول Detection Ab به میزان ۱۰۰ میکرولیتر لود شد و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.

۱۰-۳ بار شست و شو طبق مراحل فوق انجام شد.

۱۱- در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از Streptavidin-HRP لود شد و ۲۰ دقیقه در اتاق تاریک و در دمای اتاق انکوبه شد.

۱۲-۳ بار شست و شو طبق مراحل فوق انجام شد.

۱۳-۱۰۰ میکرولیتر از محلول A و B که از قبل (۱۵ دقیقه قبل) آماده شده بود به چاهک‌ها اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در اتاق تاریک انکوبه شد.

۱۴-۵۰ میکرولیتر از محلول Stop به چاهک‌ها اضافه شد.

۱۵- خوانش جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader انجام گرفت.

با استفاده از میانگین جذب‌های حاصل از نمونه‌های استاندارد، منحنی استاندارد رسم شد و غلظت پروتئین داربی پوئتین آلفا برای هر نمونه از روی معادله حاصل از نمودار برحسب mIU/ml محاسبه شد.

۲-۵- ساخت سازه‌های ژنی دارای ژن گزارشگر EGFP، انتقال سازه‌ها به داخل

سلول، غربالگری سلول‌های دارای بیان بالای ژن داربی پوئتین آلفا با استفاده از FACS و

بررسی بیان ژن

۲-۵-۱- مراحل کلونینگ ژن داربی پوئتین آلفا به همراه توالی‌های LoxP و EGFP در

وکتور pOptiVEC

۲-۵-۱-۱- کلونینگ توالی‌های IRES-EGFP درون وکتور pKO-DTA-LoxP (pKO-DTA-)

(LIGL

آماده‌سازی وکتور pKO-DTA-LIGL

در طراحی سازه‌ی ژنی نهایی این قسمت پژوهش، توالی IRES-EGFP در بین دو جایگاه *LoxP* قرار گرفته

است. به همین جهت، قطعه‌ی IRES-EGFP از روی وکتور pIRES2-EGFP تکثیر و در وکتور pKO-DTA-

LoxP همسانه‌سازی^{۴۸} گردید. در این پروژه وکتور pKO-DTA-LoxP پس از دریافت توالی *IRES-EGFP* با نام

pKO-DTA-LIGL مورد استفاده قرار گرفته است. مراحل آماده‌سازی این وکتور به شرح زیر می‌باشد.

^{۴۸} Cloned



شکل ۲-۱- تصویر شماتیک وکتور pKO-DTA-LIGL

تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP

به منظور تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP، واکنش PCR طبق شرایط زیر بر روی وکتور pIRES2-EGFP گذاشته شد.

جدول ۲-۳- مواد مورد نیاز در واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۰/۳ μL (۰/۰۵ μg)
۲	F IRES/EGFP Primer (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R IRES/EGFP Primer (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	dNTP (10 mM)	۱ μL
۵	MgCl ₂ (25 mM)	۱ μL

۲/۵ µL	10X <i>AQ90</i> Buffer (20 mM MgCl ₂)	۶
۰/۵ µL	<i>AQ90</i> High fidelity DNA Polymerase (2 U/µL)	۷
۱۸/۷ µL	dH ₂ O	۸
۲۵ µL	حجم نهایی	

جدول ۲-۳۱- شرایط دمایی واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۵ °C	۴ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۸ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۹۰ ثانیه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۳ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش طبق مراحل ذکر شده بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

خالص‌سازی قطعه‌ی IRES-EGFP از ژل آگارز

باتوجه به اینکه واکنش PCR انجام شده بر روی قطعه‌ی IRES-EGFP دارای باند غیراختصاصی بود،

خالص‌سازی این قطعه از ژل آگارز با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification از شرکت Roche صورت گرفت.

جهت تایید قطعه‌ی تخلیص شده از ژل بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

واکنش هضم آنزیمی قطعه‌ی IRES-EGFP

شرایط واکنش هضم آنزیمی انجام شده بر روی قطعه‌ی IRES-EGFP به شرح زیر می‌باشد.

جدول ۲-۳۲- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی بر روی قطعه‌ی IRES-EGFP تخلیص شده از ژل آگارز.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (100 ng/ μ L)	۱۰ μ L (۱ μ g)
۲	<i>NheI</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	<i>XbaI</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۴	10X Buffer Tango (with BSA)	۲ μ L
۵	dH ₂ O	۷ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۳۲ به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C و پس از آن جهت غیرفعال شدن آنزیم، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 65°C قرار گرفت.

خالص‌سازی قطعه‌ی IRES-EGFP هضم‌شده با آنزیم *NheI* و *XhoI*

تخلیص قطعه‌ی IRES-EGFP از بافر و آنزیم استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی با استفاده از کیت

High Pure PCR Product Purification صورت گرفت.

پس از تخلیص، در نهایت محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LoxP

واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LoxP با آنزیم‌های *NheI* و *XbaI* جهت خارج کردن قطعه‌ی موجود میان توالی‌های LoxP و آماده‌سازی وکتور جهت دریافت قطعه‌ی جدید، با شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۳۳- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی بر روی وکتور pKO-DTA-LoxP.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (181.8 ng/ μ L)	۱۱ μ L (۲ μ g)
۲	<i>NheI</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	<i>XbaI</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۴	10X Buffer Tango (with BSA)	۲ μ L
۵	dH ₂ O	۵/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۳۳ به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ °C و پس از آن جهت غیرفعال شدن آنزیم، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C قرار گرفت. در نهایت محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

خالص سازی وکتور pKO-DTA-LoxP هضم شده با آنزیم *NheI* و *XbaI* از ژل آگارز

باتوجه به اینکه سایز قطعه‌ی خارج شده از وکتور pKO-DTA-LoxP در واکنش هضم آنزیمی، ۱۸۷۶ bp بود، حذف این قطعه از ساختار اصلی^{۴۹} وکتور با استفاده از تخلیص توسط ژل آگارز انجام شد. سپس محصول تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود گردید.

واکنش دفسفریلاسیون وکتور pKO-DTA-LoxP تخلیص شده از ژل آگارز

در صورتی که واکنش هضم آنزیمی بر روی وکتور، توسط یک آنزیم و یا دو آنزیمی که پس از برش، جایگاه اتصال مشابهی را ایجاد کنند، انجام گیرد، نرخ اتصال مجدد دو سر وکتور به یکدیگر حین واکنش الحاق^{۵۰} افزایش می‌یابد. به منظور جلوگیری از این اتفاق، واکنش دفسفریلاسیون که در طی آن فسفات سر ۵' حذف می‌گردد بر روی وکتور خطی شده انجام می‌گیرد.

دو آنزیم *NheI* و *XbaI* که واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LoxP با آن‌ها صورت گرفت، پس از برش DNA دو رشته، انتهای چسبنده‌ی مشابهی را ایجاد می‌کنند، به همین جهت واکنش دفسفریلاسیون بر روی وکتور خالص شده از ژل آگارز، پس از واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم ذکر شده، مطابق شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۳۴- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش دفسفریلاسیون بر روی وکتور pKO-DTA-LoxP خالص شده از ژل آگارز.

مقادیر	نام ماده	ردیف

^{۴۹} Back bone

^{۵۰} Ligation

۶ μL (۱ μg)	Template (166.6 ng/ μL)	۱
۱ μL	<i>CIAP</i> (1 U/ μL)	۲
۲ μL	10X Dephosphorylation Buffer	۳
۱۱ μL	dH ₂ O	۴
۲۰ μL	حجم نهایی	

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۳۴ به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 37°C قرار گرفت.

خالص‌سازی محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور pKO-DTA-LoxP خطی‌شده

جهت حذف آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش دفسفریلاسیون وکتور خطی pKO-DTA-LoxP، محصول این واکنش تخلیص گردید. در نهایت نمونه‌ی خالص‌سازی شده جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

واکنش الحاق وکتور pKO-DTA-LoxP و قطعه‌ی IRES-EGFP

مرحله‌ی نهایی در تهیه‌ی پلاسمید نو ترکیب، الحاق قطعه‌ی DNA مورد نظر و وکتور خطی‌شده می‌باشد. این امر توسط اتصال واحدهای قندی دو قطعه صورت می‌گیرد. واکنش الحاق قطعه‌ی IRES-EGFP و وکتور pKO-DTA-LoxP با در نظر گرفتن غلظت این قطعات بر روی ژل آگارز و سائز آن‌ها، مطابق شرایط زیر انجام شد.

جدول ۲-۳۵- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش الحاق وکتور pKO-DTA-LoxP و قطعه‌ی IRES-EGFP.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (3695 bp)	۱/۵ μL
۲	Insert (1307 bp)	۱۲/۵ μL
۳	<i>T4 DNA Ligase</i> (5 U/ μL)	۱ μL
۴	10X T4 DNA Ligase Buffer	۲ μL
۵	dH ₂ O	۳ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۳۵ به مدت ۱۶ ساعت در دمای 16°C قرار گرفت.

ترنسفورماسیون وکتور pKO-DTA-LIGL

وکتور pKO-DTA-LIGL به درون باکتری مستعدشده ترنسفورم شد.

تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری با استفاده از روش Colony PCR

شرایط واکنش Colony PCR گذاشته شده بر روی کلونی‌های رشد یافته به شرح زیر می‌باشد.

جدول ۲-۳۶- مواد مورد نیاز در واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۲ μL
۲	F IRES/EGFP (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R IRES/EGFP (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl_2)	۱۲/۵ μL
۵	dH_2O	۹/۵ μL
	حجم نهایی	۲۵ μL

جدول ۲-۳۷- شرایط دمایی واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۴ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۸ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۴۵ ثانیه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۳ دقیقه	۱

سپس محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود گردید.

تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری با استفاده از روش هضم آنزیمی

در ابتدا استخراج پلاسمید از کلون‌های مثبت در واکنش Colony PCR با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation از شرکت Roche، صورت گرفت. سپس واکنش هضم آنزیمی جهت تایید وجود قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور -LoxP pKO-DTA و همچنین تعیین جهت قطعه‌ی درج‌شده، بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های مثبت واکنش Colony PCR، با شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۳۸- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (113.6 ng/ μ L)	۴/۴ μ L (۰/۵ μ g)
۲	<i>HindIII</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	10X Buffer R (with BSA)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۱۳/۱ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۳۸ به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و پس از آن جهت غیرفعال شدن آنزیم، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ °C قرار گرفت. در نهایت محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور pKO-DTA-LIGL

گام بعدی در تایید کلون‌های دریافت‌کننده‌ی وکتور مورد نظر پس از انجام واکنش‌های Colony PCR و هضم آنزیمی، تعیین توالی قطعه‌ی درج شده به روش سَنگَر می‌باشد. یکی از کلون‌های مثبت وکتور pKO-DTA-LIGL به منظور تعیین توالی با پرایمرهای ذکر شده در جدول زیر به شرکت پیشگام ارسال گردید.

جدول ۲-۳۹- پرایمرهای استفاده شده به منظور تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور pKO-DTA-LoxP.

ردیف	نام پرایمر
۱	For IRES/EGFP
۲	Rev Seq 3
۳	For Seq 4
۴	Rev Seq 4

ذخیره‌سازی کلون تایید شده دارای وکتور pKO-DTA-LIGL

پس از بررسی صحت توالی سازه با استفاده از روش توالی‌یابی سَنگَر، به منظور ذخیره‌سازی و امکان استفاده طولانی مدت از باکتری حاوی پلاسمید تایید شده از کلون‌های مثبت فریز تهیه گردید.

۲-۱-۵-۲- کلونینگ توالی ژن Darbepoetin alfa درون وکتور pKO-DTA-LoxP (pKO-DTA-)

LIGL و آماده‌سازی وکتور pKO-DLIGL

در این پژوهش وکتور pKO-DTA-LoxP دارای توالی Darbepoetin alfa، IRES، EGFP با نام pKO-

DLIGL مورد استفاده قرار گرفته است. همسانه‌سازی قطعه‌ی Darbepoetin alfa در وکتور pKO-DTA-LIGL

و آماده‌سازی وکتور pKO-DLIGL طبق مراحل زیر صورت گرفت.



شکل ۲-۲- تصویر شماتیک وکتور pKO-DLIGL.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 دارای ژن داربی پوئتین آلفا

به منظور خارج کردن ژن داربی پوئتین آلفا، از وکتور pUC57، دو آنزیم *SacI* و *XhoI* مورد استفاده قرار گرفتند. بافر مناسب جهت انجام هم‌زمان دو واکنش هضم آنزیمی^{۵۱} با دو آنزیم ذکر شده، بافر 10X Buffer Tango می‌باشد، با این تفاوت که فعالیت حداکثری آنزیم *SacI* در غلظت ۱X و آنزیم *XhoI* در غلظت ۲X این بافر اتفاق می‌افتد. به همین دلیل ابتدا آنزیم *SacI* به ویال اضافه و پس از گذشت زمان مناسب جهت هضم آنزیمی، آنزیم *XhoI* نیز به ویال اضافه گردید. شرایط انجام این واکنش بر روی وکتور pUC57 به شرح زیر می‌باشد.

جدول ۲-۴۰- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی بر روی وکتور pUC57 حاوی قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (200 ng/μL)	۵ μL (۱ μg)
۲	<i>SacI</i> (10 U/μL)	۱ μL
۳	10X Buffer Tango (with BSA)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۱۲ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۳۹ به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت و پس از آن طبق شرایط زیر آنزیم *XhoI* و بافر Tango جهت ایجاد شرایط مناسب برای برش قطعه‌ی مورد نظر به ویال اضافه گردید.

^{۵۱} Double Digestion

جدول ۲-۴۱- مواد اضافه شده به واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۵	<i>XhoI</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۶	10X Buffer Tango (with BSA)	۲/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۳/۵ μ L

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جداول شماره‌ی ۲-۴۰ و ۲-۴۱ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. پس از آن محصول دو واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

خالص‌سازی قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا هضم‌شده با آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* از ژل آگارز

جهت خالص‌سازی قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا از ساختار اصلی وکتور pUC57، محصول دو واکنش هضم آنزیمی از ژل تخلیص گردید. پس از بررسی کیفیت قطعه‌ی تخلیص‌شده بر روی ژل آگارز، محصول به منظور انجام واکنش الحاق آماده شد.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LIGL

واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LIGL طبق شرایط زیر با دو آنزیم *SacI* و *XhoI* انجام شد.

جدول ۲-۴۲- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LIGL.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (234.1 ng/μL)	۴/۲۷ μL (۱ μg)
۲	<i>SacI</i> (10 U/μL)	۱ μL
۳	10X Buffer Tango (with BSA)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۱۲/۷۳ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۴۲ به مدت ۳ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت و پس از آن طبق شرایط زیر آنزیم *XhoI* و بافر Tango جهت ایجاد شرایط مناسب برای برش قطعه‌ی مورد نظر به ویال اضافه گردید.

جدول ۲-۴۳- مواد اضافه شده به واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LIGL.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۵	<i>XhoI</i> (10 U/μL)	۱ μL
۶	10X Buffer Tango (with BSA)	۲/۵ μL
	حجم نهایی	۲۳/۵ μL

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول ۲-۴۲ و ۲-۴۳ به مدت ۲ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت. پس از آن محصول دو واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

خالص سازی وکتور pKO-DTA-LIGL هضم شده با آنزیم های *SacI* و *XhoI* از ژل آگارز

پس از هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LIGL با دو آنزیم *SacI* و *XhoI*، قطعه‌ی ۱۳۶۸ bp از این وکتور خارج شد. به منظور خالص سازی ساختار اصلی وکتور از قطعه‌ی خارج شده، محصول واکنش هضم آنزیمی طبق پروتکل از ژل آگارز تخلص گردید. پس از بررسی کیفیت قطعه‌ی تخلیص شده از ژل بر روی ژل آگارز ۱ درصد، محصول به منظور واکنش الحاق آماده گردید.

واکنش الحاق وکتور pKO-DTA-LIGL و قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا

واکنش الحاق وکتور pKO-DTA-LIGL و قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا، با در نظر گرفتن غلظت مشاهده شده این قطعات بر روی ژل آگارز و سائز آن‌ها، طبق شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۴۴- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش الحاق وکتور pKO-DTA-LIGL و قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (3657 bp)	۱ µL
۲	Insert (603 bp)	۱۵ µL
۳	<i>T4 DNA Ligase</i> (5 U/µL)	۱ µL
۴	10X <i>T4 DNA Ligase</i> Buffer	۲ µL

۱ μL	dH_2O	۵
۲۰ μL	حجم نهایی	

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره ۲-۴۴ به مدت ۱۶ ساعت در دمای 16°C قرار گرفت.

ترنسفورماسیون وکتور pKO-DLIGL

میزان $15 \mu\text{L}$ از محصول واکنش الحاق وکتور pKO-DTA-LIGL و قطعه‌ی داربی پوئین آلفا به باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5 α ، ترنسفورم شد.

تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری با استفاده از روش Colony PCR

جهت تایید کلون‌های رشد کرده بر روی پلیت، پس از تهیه‌ی Template با شرایط زیر واکنش Colony PCR گذاشته شد.

جدول ۲-۴۵- مواد مورد نیاز در واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری.

مقادیر	نام ماده	ردیف
۲ μL	Template	۱
۰/۵ μL	F Aranesp (10 pmol)	۲

۰/۵ µL	R Seq On pOptiVEC (10 pmol)	۳
۱۲/۵ µL	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl ₂)	۴
۹/۵ µL	dH ₂ O	۵
۲۵ µL	حجم نهایی	

جدول ۲-۴۶- شرایط دمایی واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۴ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۷ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۱ دقیقه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری با استفاده از روش هضم آنزیمی

به منظور تایید حضور قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا در وکتور pKO-DTA-LIGL، واکنش هضم آنزیمی بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های مثبت واکنش Colony PCR طبق پروتکل، با شرایط زیر انجام گرفت.

جدول ۲-۴۷- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (139 ng/ μ L)	$7/19 \mu$ L (۱ μ g)
۲	<i>SacI</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۳	10X Buffer Tango (with BSA)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	$12/73 \mu$ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۴۷ به مدت ۳ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت و پس از آن طبق شرایط زیر آنزیم *XhoI* و بافر Tango جهت ایجاد شرایط مناسب برای برش قطعه‌ی مورد نظر به ویال اضافه گردید.

جدول ۲-۴۸- مواد اضافه شده به واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۵	<i>XhoI</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۶	10X Buffer Tango (with BSA)	$2/5 \mu$ L
	حجم نهایی	$23/5 \mu$ L

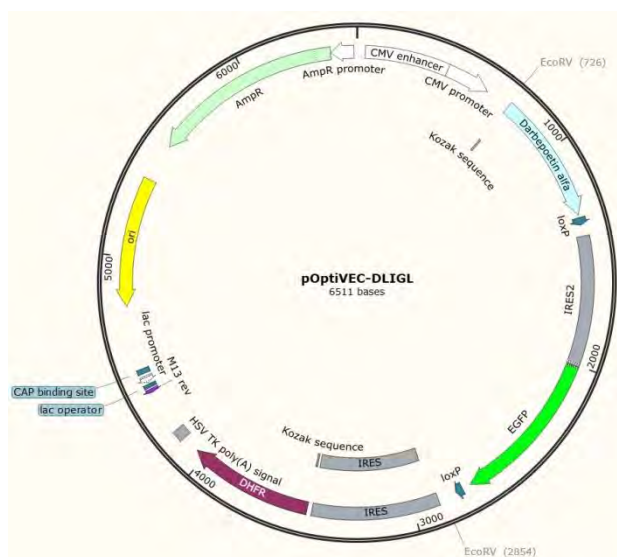
در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جداول شماره‌ی ۲-۴۷ و ۲-۴۸ به مدت ۲ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت و سپس محصول دو واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

ذخیره‌سازی کلون تاییدشده دارای وکتور pKO-DLIGL

پس از تایید حضور قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا در وکتور pKO-DTA-LIGL با استفاده از دو روش ذکر شده، باکتری حاوی پلاسمید تاییدشده ذخیره‌سازی گردید.

آماده‌سازی وکتور pOptiVEC-DLIGL

در این پژوهش وکتور pOptiVEC حاوی توالی LoxP، Darbepoetin alfa، IRES-EGFP، LoxP با نام pOptiVEC-DLIGL مورد استفاده قرار گرفته است. آماده‌سازی این وکتور طبق مراحل زیر صورت گرفت.



شکل ۲-۳- تصویر شماتیک وکتور pOptiVEC-DLIGL.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL

از وکتور pKO-DLIGL به عنوان الگو، جهت تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP استفاده گردید به همین دلیل به منظور جلوگیری از ایجاد باندهای غیراختصاصی در طی واکنش PCR، ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی وکتور pKO-DLIGL با دو آنزیم *EagI* و *SacI* که در دو طرف قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP دارای جایگاه شناسایی و برش می‌باشند، طبق شرایط زیر انجام گرفت.

جدول ۲-۴۹- شرایط واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL جهت حذف باندهای غیراختصاصی.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (116.6 ng/ μ L)	۶ μ L (۰/۷ μ g)
۲	<i>EagI</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	<i>SacI</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۴	10X Buffer (Unique Eco521)	۲ μ L
۵	dH ₂ O	۱۳/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۴۹ به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار و سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP

در طراحی مولکولی انجام شده به منظور همسانه‌سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP در وکتور pOptiVEC، تک آنزیم *EcoRV* انتخاب گردید. به همین دلیل در طی طراحی پرایمر به منظور تکثیر این قطعه، جایگاه شناسایی آنزیم *EcoRV* در سمت ۵' پرایمر قرار گرفت. جهت تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP طبق شرایط زیر بر روی محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL با آنزیم‌های *EagI* و *SacI* واکنش PCR گذاشته شد.

جدول ۲-۵۰- مواد مورد نیاز در واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۱ μL (۰/۰۵ μg)
۲	F DLIGL <i>EcoRV</i> (10 pmol)	۰/۸ μL
۳	R DLIGL <i>EcoRV</i> (10 pmol)	۰/۸ μL
۴	dNTP (10 mM)	۰/۸ μL
۵	MgCl ₂ (25 mM)	۰/۳ μL
۶	10X <i>AQ90</i> Buffer (20 mM MgCl ₂)	۲/۵ μL
۷	<i>AQ90</i> High fidelity DNA Polymerase (2 U/μL)	۰/۳ μL
۸	dH ₂ O	۱۸/۵ μL
	حجم نهایی	۲۵ μL

جدول ۲-۰- شرایط دمایی واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۵ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۶۰ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۲ دقیقه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۷ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

خالص‌سازی محصول واکنش PCR قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP

به منظور خالص‌سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP تکثیر شده طی واکنش PCR، محصول این واکنش تخلیص گردید و بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. در نهایت قطعه به منظور انجام واکنش الحاق آماده گردید.

واکنش هضم آنزیمی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP تخلیص شده

به منظور هضم آنزیمی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP تکثیر شده طی واکنش PCR، بر روی این محصول تخلیص شده، واکنش هضم آنزیمی طبق شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۵۲- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (116.6 ng/ μ L)	۶ μ L (۰/۷ μ g)
۲	<i>EcoRV</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	10X Buffer R (with BSA)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۱۱ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۵۲ به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفت.

خالص‌سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP هضم‌شده با آنزیم *EcoRV*

جهت تخلیص قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP و حذف آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی، خالص‌سازی این قطعه انجام گردید. پس از بررسی نمونه‌ی تخلیص شده بر روی ژل آگارز ۱٪، قطعه به منظور انجام واکنش الحاق آماده شد.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC

وکتور pOptiVEC از باکتری استخراج و سپس واکنش هضم آنزیمی با شرایط زیر بر روی نمونه‌ی استخراج شده انجام گردید.

جدول ۲-۵۳- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (70 ng/μL)	۱۰ μL (۰/۷ μg)
۲	<i>EcoRV</i> (10 U/μL)	۰/۵ μL
۳	10X Buffer R (with BSA)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۷/۵ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۵۳ به مدت ۱۶ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت.

خالص‌سازی وکتور pOptiVEC خطی‌شده با آنزیم *EcoRV*

تخلیص وکتور pOptiVEC خطی‌شده از آنزیم و بافر واکنش هضم آنزیمی، با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification از شرکت Roche صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

واکنش دفسفریلاسیون وکتور pOptiVEC خطی‌شده

باتوجه به در نظر گرفتن تک آنزیم *EcoRV* به منظور همسانه‌سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP- IRES-LoxP در وکتور pOptiVEC، جهت جلوگیری از اتصال دو سر وکتور حین واکنش الحاق، دفسفریلاسیون وکتور خطی‌شده‌ی pOptiVEC با شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۵۴- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش دفسفریلاسیون وکتور pOptiVEC خطی شده.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (100 ng/ μ L)	۱۰ μ L (۱ μ g)
۲	CIAP (1 U/ μ L)	۱ μ L
۳	10X Dephosphorylation Buffer	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۷ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۵۴ به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 50°C قرار گرفت.

خالص‌سازی محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور pOptiVEC خطی شده

جهت حذف آنزیم و بافر واکنش دفسفریلاسیون وکتور خطی pOptiVEC، محصول این واکنش تخلیص گردید. سپس نمونه‌ی خالص‌سازی شده به منظور بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. در نهایت وکتور جهت انجام واکنش الحاق آماده گردید.

واکنش الحاق وکتور pOptiVEC و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP

واکنش الحاق وکتور pOptiVEC و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP با در نظر گرفتن غلظت مشاهده شده این قطعات بر روی ژل آگارز و سائز آن‌ها، طبق شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۵۵- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش الحاق وکتور pOptiVEC و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (4383 bp)	۴ μ L
۲	Insert (2134 bp)	۳ μ L
۳	<i>T4 DNA Ligase</i> (5 U/ μ L)	۱ μ L
۴	10X <i>T4 DNA Ligase Buffer</i>	۲ μ L
۵	dH ₂ O	۱۰ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۵۵ به مدت ۱۶ ساعت در دمای °C ۱۶ قرار گرفت.

تهیه‌ی باکتری حاوی وکتور pOptiVEC-DLIGL

تهیه، تایید و ذخیره‌سازی باکتری حاوی وکتور pOptiVEC-DLIGL طبق مراحل زیر صورت گرفت.

ترنسفورماسیون وکتور pOptiVEC-DLIGL

میزان ۱۵ μ L از محصول واکنش الحاق وکتور pOptiVEC و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP

به باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5 α ترنسفورم شد.

تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری با استفاده از روش Colony PCR

به منظور تایید کلون‌های رشد کرده بر روی پلیت، پس از تهیه‌ی Template، واکنش Colony PCR با شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۵۶- مواد مورد نیاز در واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۲ μL
۲	F DPO/DHFR (<i>NgoMIV</i>) (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	Rev Seq 3 (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl_2)	۱۲/۵ μL
۵	dH ₂ O	۹/۵ μL
	حجم نهایی	۲۵ μL

جدول ۲-۵۷- شرایط دمایی واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۶ °C	۳۰ ثانیه	

۴	تکثیر	۷۲ °C	۹۰ ثانیه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری با استفاده از روش هضم آنزیمی

جهت تایید وجود قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP در وکتور pOptiVEC، استخراج پلاسمید از کلون‌های مثبت واکنش Colony PCR انجام و سپس واکنش هضم آنزیمی بر روی نمونه‌ها طبق شرایط زیر با دو آنزیم *XhoI* و *EcoRV* به ترتیب به منظور بررسی جهت قطعه‌ی همسانه‌سازی شده و تایید درج کامل آن صورت گرفت.

جدول ۲-۵۸- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (120 ng/μL)	۵ μL (۰/۶ μg)
۲	<i>XhoI</i> (10 U/μL)	۰/۵ μL
۳	10X Buffer R (with BSA)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۱۲/۵ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

جدول ۵۹-۲- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (120 ng/ μ L)	۵ μ L (۰/۶ μ g)
۲	<i>EcoRV</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	10X Buffer R (with BSA)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۱۲/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

سپس ویال‌های حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۵۸-۲ و ۵۹-۲ به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار گرفت و سپس محصول واکنش‌های هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند.

تعیین توالی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP در وکتور pOptiVEC

از باکتری حاوی وکتور pOptiVEC-DLIGL، دو کلونی که طی واکنش Colony PCR و هضم آنزیمی تایید شدند، جهت تعیین توالی به روش سَنگر با پرایمرهای ذکر شده در جدول زیر به شرکت پیشگام ارسال گردید.

جدول ۲-۶۰- پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین توالی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP در وکتور pOptiVEC.

ردیف	نام پرایمر
۱	F Pro CMV
۲	F Real EPO
۳	For Seq 3
۴	For Seq 6
۵	R IRES/EGFP
۶	Rev Seq 3

ذخیره‌سازی کلون تاییدشده دارای وکتور pOptiVEC-DLIGL

پس از بررسی صحت توالی سازه و عاری بودن آن از جهش با استفاده از روش توالی‌یابی سنگر، ذخیره‌سازی هر دو کلون انجام شد.

۲-۵-۲- مراحل کلونینگ ژن داربی پوئتین آلفا به همراه توالی‌های LoxP و EGFP در

وکتور UCOE

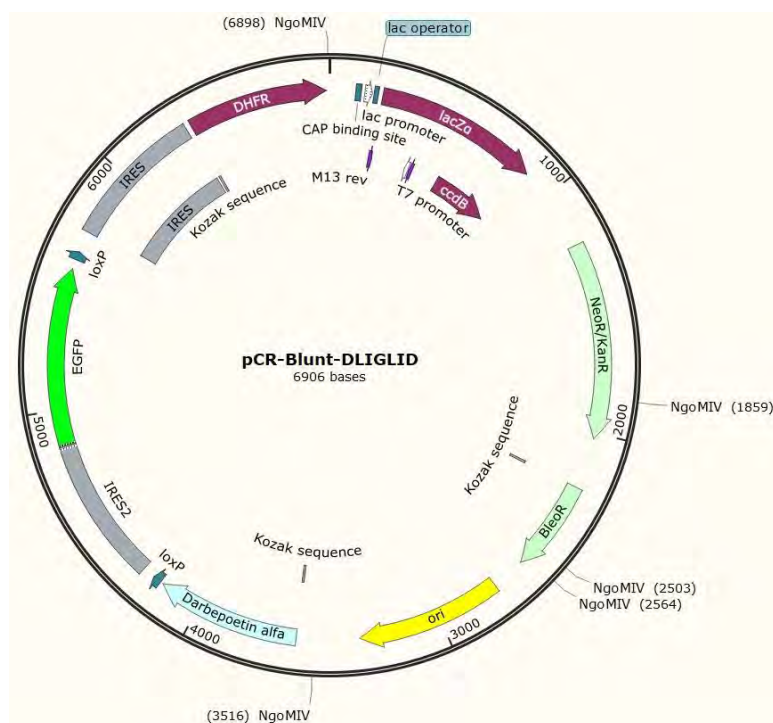
آماده‌سازی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID

کیت Zero Blunt PCR Cloning به منظور همسانه‌سازی قطعات PCR تکثیر شده با استفاده از آنزیم‌های

پلیمرازی که انتهای صاف^{۵۲} ایجاد می‌کنند طراحی شده است. با توجه به اینکه جهت تکثیر توالی Darbepoetin

^{۵۲} Blunt

واکنش DHFR، IRES، EGFP، LoxP، IRES، LoxP، alfa از آنزیم *AQ90* استفاده می‌گردد، این قطعه پس از واکنش PCR، در وکتور pCR Blunt که به عنوان وکتور حدواسط انتخاب گردید، وارد شد. در این پژوهش وکتور pCR™-Blunt حاوی توالی‌های مذکور با نام pCR™-Blunt-DLIGLID مورد استفاده قرار گرفته است. مراحل آماده سازی این وکتور به شرح زیر می‌باشد.



شکل ۲-۴- تصویر شماتیک وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL

باتوجه به اینکه در تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR، وکتور pOptiVEC-DLIGL به عنوان الگو استفاده می‌گردد، به منظور جلوگیری از ظهور باندهای غیراختصاصی در طی

واکنش PCR، ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی وکتور pOptiVEC-DLIGL طبق شرایط زیر با آنزیم *Sall* که در دو طرف قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR در این وکتور دارای جایگاه شناسایی و برش می‌باشد، صورت گرفت.

جدول ۲-۶۱- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL به منظور حذف باندهای غیراختصاصی.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (133.3 ng/ μ L)	$7/5 \mu$ L (۱ μ g)
۲	<i>Sall</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۳	10X Buffer O (With BSA)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	$9/5 \mu$ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۶۱ به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت و سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

به منظور تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR، واکنش PCR بر روی محصول هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL طبق شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۶۲-۲- مواد مورد نیاز در واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۰/۵ μL (۰/۰۵ μg)
۲	F DPO/DHFR (<i>NgoMIV</i>) (10 pmol)	۰/۸ μL
۳	R DPO/DHFR (<i>NgoMIV</i>) (10 pmol)	۰/۸ μL
۴	dNTP (10 mM)	۰/۸ μL
۵	MgCl ₂ (25 mM)	۰/۳ μL
۶	10X <i>AQ90</i> Buffer (20 mM MgCl ₂)	۲/۵ μL
۷	<i>AQ90</i> High fidelity DNA Polymerase (2 U/ μL)	۰/۳ μL
۸	dH ₂ O	۱۹ μL
	حجم نهایی	۲۵ μL

جدول ۶۳-۲- شرایط دمایی واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۵ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۵ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۶۳ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۳ دقیقه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

خالص سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR تکثیر شده با واکنش

PCR از ژل آگارز

به منظور حذف باندهای غیراختصاصی ایجاد شده طی واکنش PCR تکثیر قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR، باند مورد نظر از ژل آگارز خالص سازی شد. سپس محصول تخلیص شده جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری گردید.

واکنش الحاق وکتور pCR™-Blunt و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

واکنش الحاق وکتور pCR™-Blunt و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR طبق میزان ذکر شده در پروتکل وکتور و با در نظر گرفتن غلظت مشاهده شده این قطعات بر روی ژل آگارز و سائز آن‌ها، با شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۱- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش الحاق وکتور pCR™-Blunt و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (3512 bp)	۱ µL
۲	Insert (3376 bp)	۵ µL

۱ µL	<i>T4 DNA Ligase</i> (5 U/µL)	۳
۲ µL	10X <i>T4 DNA Ligase</i> Buffer	۴
۱ µL	dH ₂ O	۵
۱۰ µL	حجم نهایی	

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۶۴ به مدت ۱ ساعت در دمای °C ۲۵ قرار گرفت.

تهیه باکتری حاوی وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID

تهیه، تایید و ذخیره‌سازی باکتری حاوی وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID، طبق مراحل زیر صورت گرفت.

ترنسفورماسیون وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID

میزان ۱۰ µL از محصول واکنش الحاق وکتور pCRTM-Blunt و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-

IRES-LoxP-IRES-DHFR به باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5α ترنسفورم شد.

تایید حضور وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID در باکتری با استفاده از روش Colony PCR

به منظور تایید کلون‌های رشد کرده بر روی پلیت، پس از تهیه‌ی Template، واکنش Colony PCR با

شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۶۶- مواد مورد نیاز در واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۲ μ L
۲	F DPO/DHFR (<i>NgoMIV</i>) (10 pmol)	۰/۵ μ L
۳	Rev Seq DPO (10 pmol)	۰/۵ μ L
۴	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl ₂)	۱۲/۵ μ L
۵	dH ₂ O	۹/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۵ μ L

جدول ۲-۶۶- شرایط دمایی واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID در باکتری.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۶ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۴۵ ثانیه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

تایید حضور وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID در باکتری با استفاده از روش هضم آنزیمی

به منظور تایید وجود قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR در وکتور pCR™-Blunt، استخراج پلاسمید از کلون‌های مثبت واکنش Colony PCR انجام و سپس واکنش هضم آنزیمی بر روی نمونه‌ها، طبق شرایط زیر با آنزیم *NgoMIV* جهت تایید خروج کامل قطعه‌ی مورد نظر صورت گرفت.

جدول ۲-۶۷- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (120 ng/μL)	۵ μL (۰/۶ μg)
۲	<i>NgoMIV</i> (10 U/μL)	۰/۵ μL
۳	rCutSmart™ Buffer (10X)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۱۲/۵ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۶۷ به مدت ۴ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت و سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

ذخیره‌سازی کلون تاییده شده دارای وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID

پس از تایید حضور وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID با استفاده از دو روش ذکر شده در باکتری، کلون مورد نظر ذخیره سازی گردید.

آماده‌سازی وکتور UCOE-DLIGLID

در این پژوهش وکتور UCOE حاوی توالی IRES، LoxP، EGFP، IRES، LoxP، Darbepoetin alfa با نام DHFR UCOE-DLIGLID مورد استفاده قرار گرفته است. مراحل آماده‌سازی این وکتور به شرح زیر می‌باشد.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID

به منظور خارج کردن قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR از وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID، واکنش هضم آنزیمی بر روی این وکتور با شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۱- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID به منظور خارج کردن قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (254.2 ng/ μ L)	۱۱/۸ μ L (۳ μ g)
۲	<i>NgoMIV</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۳	rCutSmart TM Buffer (10X)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۵/۲ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۶۸ به مدت ۱۶ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت و سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

خالص‌سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR هضم‌شده با آنزیم *NgoMIV* از ژل آگارز

قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR که طی واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* از وکتور pCR™-Blunt خارج شد، از ژل آگارز خالص‌سازی گردید. سپس محصول تخلیص‌شده به منظور بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE

وکتور UCOE از باکتری استخراج و سپس واکنش هضم آنزیمی بر روی پلاسمید استخراج‌شده مطابق شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۶۹- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (200 ng/μL)	۱۰ μL (۲ μg)
۲	<i>NgoMIV</i> (10 U/μL)	۰/۷۵ μL
۳	rCutSmart™ Buffer (10X)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۵/۷۵ μL

حجم نهایی	۲۰ μL
-----------	------------------

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۶۹ به مدت ۱۶ ساعت در دمای 37°C قرار گرفت. در نهایت محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید.

خالص‌سازی وکتور UCOE خطی‌شده با آنزیم *NgoMIV*

تخلیص وکتور خطی‌شده‌ی UCOE از آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی، با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification از شرکت Roche صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

واکنش دفسفریلاسیون وکتور UCOE خطی‌شده

باتوجه به اینکه همسانه‌سازی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR در وکتور UCOE با تک آنزیم *NgoMIV* طراحی شده بود، به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور حین واکنش الحاق، دفسفریلاسیون این وکتور با شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۷۰- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش دفسفریلاسیون وکتور UCOE خطی‌شده.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (100 ng/ μL)	۱۰ μL (۱ μg)

۱ μL	<i>CIAP</i> (1 U/ μL)	۲
۲ μL	10X Dephosphorylation Buffer	۳
۷ μL	dH ₂ O	۴
۲۰ μL	حجم نهایی	

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۷۰ به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار گرفت.

خالص‌سازی محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور UCOE خطی شده

به منظور حذف آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش دفسفریلاسیون وکتور خطی UCOE، محصول این واکنش تخلیص گردید. سپس نمونه‌ی خالص‌سازی شده جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

واکنش الحاق وکتور UCOE و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

واکنش الحاق وکتور UCOE و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR با در نظر گرفتن غلظت مشاهده شده این قطعات بر روی ژل آگارز و سائز آن‌ها، طبق شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۷۱- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش الحاق وکتور UCOE و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (10895 bp)	۱۳ μL
۲	Insert (3376 bp)	۴ μL
۳	<i>T4 DNA Ligase</i> (5 U/ μL)	۱ μL

۲ μ L	10X T4 DNA Ligase Buffer	۴
۲۰ μ L	حجم نهایی	

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۷۱ به مدت ۱۶ ساعت در دمای 16°C قرار گرفت.

تهیه‌ی باکتری حاوی وکتور UCOE-DLIGLID

تهیه، تایید و ذخیره‌سازی باکتری حاوی وکتور UCOE-DLIGLID، طبق مراحل زیر صورت گرفت.

ترنسفورماسیون وکتور UCOE-DLIGLID

میزان $15\ \mu\text{L}$ از محصول واکنش الحاق وکتور UCOE و قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES- LoxP-IRES-DHFR، به باکتری *E. coli* سویه‌ی DH5 α ترنسفورم شد.

تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری با استفاده از روش Colony PCR

به منظور تایید کلون‌های رشد کرده بر روی پلیت، پس از تهیه‌ی Template، واکنش Colony PCR با شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۰- مواد مورد نیاز در واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۲ μL
۲	F Pro CMV (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R Seq DPO (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl_2)	۱۲/۵ μL
۵	dH ₂ O	۹/۵ μL
	حجم نهایی	۲۵ μL

جدول ۲-۷۳- شرایط دمایی واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۸ °C	۳۰ ثانیه	
۴	تکثیر	۷۲ °C	۳۰ ثانیه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری با استفاده از روش هضم آنزیمی

به منظور تایید وجود قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR در وکتور UCOE، استخراج پلاسمید از کلون‌های مثبت واکنش Colony PCR انجام و سپس واکنش هضم آنزیمی بر روی نمونه‌ها، طبق شرایط زیر با آنزیم *NotI* و *NgoMIV* به ترتیب به منظور بررسی جهت قطعه‌ی همسانه‌سازی شده و تایید درج کامل آن صورت گرفت.

جدول ۲-۷۴- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (240 ng/ μ L)	۲/۵ μ L (۰/۶ μ g)
۲	<i>NotI</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	10X Buffer O (with BSA)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۱۵ μ L
	حجم نهایی	۲۰ μ L

جدول ۲-۷۵- شرایط واکنش هضم آنزیمی جهت تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (240 ng/ μ L)	۲/۵ μ L (۰/۶ μ g)
۲	<i>NgoMIV</i> (10 U/ μ L)	۰/۵ μ L
۳	rCutSmart™ Buffer (10X)	۲ μ L
۴	dH ₂ O	۱۵ μ L

حجم نهایی	۲۰ μ L
-----------	------------

در نهایت ویال‌های حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۷۴ و ۲-۷۵ به مدت ۴ ساعت در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۳۷ قرار گرفتند و سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند.

تعیین توالی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR در وکتور UCOE

از باکتری حاوی وکتور UCOE-DLIGLID، دو کلونی که طی واکنش Colony PCR و هضم آنزیمی تایید شدند، جهت تعیین توالی به روش سنگر با پرایمرهای ذکر شده در جدول زیر به شرکت پیشگام ارسال گردید.

جدول ۲-۷۶- پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین توالی قطعه‌ی DPO-LoxP-IRES-EGFP-IRES-LoxP-IRES-DHFR در وکتور UCOE.

ردیف	نام پرایمر
۱	DR- F Seq
۲	F Real EPO
۳	F Seq DHFR
۴	For Seq 6
۵	R DPO/DHFR
۶	Rev IRES/EGFP
۷	Rev Seq 3
۸	Rev Seq DPO

ذخیره‌سازی کلون تایید شده‌ی دارای وکتور UCOE-DLIGLID

پس از بررسی صحت توالی سازه و عاری بودن آن از جهش با استفاده از روش توالی‌یابی سنگر، ذخیره‌سازی هر دو کلون انجام شد.

۲-۵-۳- انتقال سازه‌های pOptiVEC- Darbepoetin alpha- LoxP- EGFP- LoxP و

UCOE- Darbepoetin alpha- LoxP- EGFP- LoxP -IRES-DHFR به رده سلولی

CHO- DG44

در این بخش ابتدا به خلاصه‌ی مراحل انجام شده جهت تهیه‌ی لاین سلولی پایدار و سپس به توضیح کامل هر کدام می‌پردازیم.

خلاصه‌ی مراحل تهیه‌ی لاین سلولی CHO DG44 نو ترکیب به صورت پایدار

چکیده‌ی مراحل انجام شده به منظور تهیه‌ی لاین سلولی نو ترکیب پایدار به شرح زیر می‌باشد.

۱. آماده‌سازی وکتورهای pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID جهت ترنسفکت به سلول

CHO DG44

۲. آماده‌سازی سلول CHO DG44 جهت انجام ترنسفکشن

۳. تهیه لاین سلولی پایدار از وکتور pOptiVEC-DLIGL در سلول CHO DG44 و ذخیره‌سازی آن

۴. تهیه لاین سلولی پایدار از وکتور UCOE-DLIGLID در سلول CHO DG44 و ذخیره‌سازی آن

آماده‌سازی وکتورهای pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGL جهت انجام ترنسفکشن

به منظور تولید لاین سلولی پایدار، درج سازه‌ی حاوی ژن مورد نظر درون ژنوم سلول هدف ضروری می‌باشد. خطی کردن وکتور، بدون ایجاد اختلال در ژن هدف و یا باقی عناصر موجود بر روی سازه، شانس درج آن را درون ژنوم سلول هدف افزایش می‌دهد. در این بخش به مراحل آماده‌سازی و خطی کردن سازه‌های pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGL جهت ترنسکفت به سلول CHO DG44 می‌پردازیم.

واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL

ابتدا وکتور pOptiVEC-DLIGL با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation از شرکت Roche، طبق پروتکل ذکر شده از باکتری استخراج گردید. سپس واکنش هضم آنزیمی بر روی پلاسمید، با شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۷۷- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (240 ng/ μ L)	۲۵ μ L (۶ μ g)
۲	<i>PvuI</i> (10 U/ μ L)	۱ μ L
۳	NEBuffer™ r3.1 (10X)	۵ μ L
۴	dH ₂ O	۱۹ μ L
	حجم نهایی	۵۰ μ L

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۷۷ به مدت ۱۶ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت، سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

خالص‌سازی وکتور pOptiVEC-DLIGL خطی‌شده با آنزیم *PvuI*

تخلیص وکتور خطی pOptiVEC-DLIGL از آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی، با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification از شرکت Roche صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE-DLIGLID

وکتور UCOE-DLIGLID با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation شرکت Roche از باکتری استخراج، سپس واکنش هضم آنزیمی با شرایط زیر بر روی این پلاسمید صورت گرفت.

جدول ۲-۰۰- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE-DLIGLID.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Vector (315.7 ng/μL)	۹/۵ μL (۳ μg)
۲	<i>I-SceI</i> (10 U/μL)	۱ μL
۳	rCutSmart™ Buffer (10X)	۲ μL
۴	dH ₂ O	۷/۵ μL
	حجم نهایی	۵۰ μL

در نهایت ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۷۸ به مدت ۱۶ ساعت در دمای °C ۳۷ قرار گرفت. سپس محصول واکنش هضم آنزیمی جهت بررسی، بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

خالص‌سازی وکتور UCOE-DLIGLID خطی‌شده با آنزیم *I-SceI*

تخلیص وکتور خطی‌شده‌ی UCOE-DLIGLID از آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی، با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification از شرکت Roche صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید.

آماده‌سازی سلول CHO DG44 جهت انجام ترنسفکشن

به منظور انتقال سازه‌ی آماده شده به سلول CHO DG44، ابتدا سلول‌ها را ذوب و تا زمان دستیابی به درصد زنده‌مانی^{۵۳} بالای ۹۵٪، در حجم مناسب پاساژ داده شدند. سپس ترنسکفت سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL و سازه‌ی UCOE-DLIGLID به سلول CHO DG44 در حجم ۳ mL، طبق پروتکل ذکر شده انجام شد.

غربالگری سلول‌های نو ترکیب

با توجه به اینکه در هر دو سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID ژن کد کننده‌ی DHFR وجود دارد، به منظور غربالگری سلول‌های نو ترکیب از محیط کشت انتخابی، که تنها سلول‌هایی که وکتور مورد

^{۵۳} Viability

نظر ما را دریافت کرده‌اند توانایی رشد در آن را دارند، استفاده شده است. محیط انتخابی استفاده شده در این پژوهش CD OptiCHO™ می‌باشد. غربالگری سلول‌های CHO DG44 ترنسفکت شده با سازه‌های مذکور، در مدت دو هفته هر ۳ تا ۴ روز یکبار تعویض محیط، با در نظر گرفتن شرایط سلول، طبق پروتکل که در قسمتهای قبلی به آن اشاره شده است، صورت گرفت.

تایید درج سازه درون ژنوم سلول CHO DG44 و تهیه‌ی فریز سلولی

اولین مرحله پس از دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۰٪ از سلول‌های نو ترکیب، تایید درج سازه درون ژنوم سلول هدف می‌باشد. در نهایت پس از تایید، به منظور ذخیره‌سازی و نگهداری طولانی مدت از لاین سلولی، فریز تهیه می‌گردد. در این بخش به مراحل تایید درج وکتورها درون ژنوم سلول CHO DG44 و همچنین تهیه فریز سلولی از آن‌ها می‌پردازیم.

تایید درج سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول CHO DG44 به کمک ارزیابی بیان ژن EGFP

با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

در سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL قطعه‌ی EGFP وجود داشته و در صورت درج این وکتور درون ژنوم سلول CHO DG44 و سنتز این پروتئین، سلول‌های هدف زیر میکروسکوپ فلورسنت به رنگ سبز دیده می‌شوند. در ابتدا به منظور تایید اولیه‌ی درج سازه، سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور pOptiVEC-DLIGL با استفاده از این میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

تایید درج سازهی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول CHO DG44 به کمک ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از فلوسایتومتری

در سازهی pOptiVEC-DLIGL، ژن EGFP نیز همسانه‌سازی شده و در سلول‌های ترنسفکت شده با این وکتور، پروتئین EGFP سنتز می‌گردد. از این ویژگی می‌توان به منظور تایید درج وکتورها در ژنوم سلول و همچنین اطمینان حاصل کردن از بیان این پروتئین در تمامی سلول‌ها استفاده نمود. آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام فلوسایتومتری به صورت زیر انجام گرفت.

۱. ابتدا لاین سلولی ترنسفکت شده و همچنین سلول‌های CHO DG44 ترنسفکت نشده جهت استفاده به عنوان کنترل منفی، شمارش و درصد زنده‌مانی آن‌ها محاسبه گردید.
۲. تعویض محیط سلول‌ها با چگالی اولیه $10^6 \text{ cell/mL} \times 0.2$ در محیط متناسب با آن‌ها انجام گرفت.
۳. پس از گذشت ۳ روز، سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو شمارش شدند.
۴. میزان $10^6 \times 0.2$ تا $10^6 \times 0.3$ سلول به Test Tube منتقل و سپس به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید.
۵. مایع رویی را دور ریخته و سپس رسوب در $500 \mu\text{L}$ از $\text{PBS}^{\Delta\phi}$ حل و Test Tube طبق شرایط ذکر شده در مرحله‌ی ۴ سانتریفیوژ شد.
۶. مایع رویی را دور ریخته و رسوب در $200 \mu\text{L}$ از PBS حل گردید.
۷. درنهایت سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

^{Δφ} Phosphate buffer saline

تایید درج سازهی pOptiVEC-DLIGL در سطح ژنوم سلول

به منظور تایید درج وکتور pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول CHO DG44، ابتدا DNA این لاین سلولی با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation از شرکت Roche استخراج گردید. سپس واکنش PCR بر روی DNA استخراج شده از لاین سلولی وکتور pOptiVEC-DLIGL، جهت تایید درج این وکتور در ژنوم سلول CHO DG44 طبق شرایط زیر انجام گرفت.

جدول ۲-۷۹- مواد مورد نیاز در واکنش PCR جهت تایید درج سازهی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول CHO DG44

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (66 ng/ μ L)	۳ μ L (۰/۲ μ g)
۲	F Real DPO (10 pmol)	۰/۵ μ L
۳	R Real DPO (10 pmol)	۰/۵ μ L
۴	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl ₂)	۱۲/۵ μ L
۵	dH ₂ O	۸/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۵ μ L

جدول ۲-۸۰- شرایط دمایی واکنش PCR جهت تایید درج سازهی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول CHO DG44

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۴۵ ثانیه	۳۵

	۳۰ ثانیه	۵۸ °C	اتصال پرایمرها	۳
	۳۰ ثانیه	۷۲ °C	تکثیر	۴
۱	۳ دقیقه	۷۲ °C	تکثیر نهایی	۵

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

تایید درج سازهی UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول CHO DG44 به کمک ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت

وکتور UCOE-DLIGLID دارای ژن EGFP می‌باشد. به همین دلیل جهت تایید اولیه درج سازه درون ژنوم سلول هدف، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

تایید درج سازهی UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول CHO DG44 به کمک ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از فلوسایتومتری

در سازهی UCOE-DLIGLID، ژن EGFP نیز همسانه‌سازی شده و در سلول‌های ترنسفکت شده با این وکتور، پروتئین EGFP سنتز می‌گردد. از این ویژگی می‌توان به منظور تایید درج وکتورها در ژنوم سلول و همچنین اطمینان حاصل کردن از بیان این پروتئین در تمامی سلول‌ها استفاده نمود. آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام تست فلوسایتومتری صورت گرفت.

تایید درج سازهی UCOE-DLIGLID در سطح ژنوم سلول

به منظور تایید درج وکتور UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول CHO DG44، ابتدا DNA این لاین سلولی به استفاده از کیت از کیت High Pure PCR Template Preparation از شرکت Roche استخراج گردید. سپس واکنش PCR طبق شرایط زیر بر روی DNA استخراج شده گذاشته شد.

جدول ۲-۸۱- مواد مورد نیاز در واکنش PCR جهت تایید درج سازهی UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول CHO DG44

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template (66 ng/ μ L)	۳ μ L (۰/۲ μ g)
۲	F Real DPO (10 pmol)	۰/۵ μ L
۳	R Real DPO (10 pmol)	۰/۵ μ L
۴	Taq 2x Master Mix Red (1.5 mM MgCl ₂)	۱۲/۵ μ L
۵	dH ₂ O	۸/۵ μ L
	حجم نهایی	۲۵ μ L

جدول ۲-۸۲- شرایط دمایی واکنش PCR جهت تایید درج سازهی UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول CHO DG44

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۴ °C	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۴ °C	۴۵ ثانیه	۳۵
۳	اتصال پرایمرها	۵۸ °C	۳۰ ثانیه	

۴	تکثیر	۷۲ °C	۳۰ ثانیه	
۵	تکثیر نهایی	۷۲ °C	۳ دقیقه	۱

در نهایت محصول واکنش PCR جهت بررسی بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد.

تهیه‌ی فریز از دو لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID

پس از تایید درج سازه‌ها درون ژنوم سلول CHO DG44، به منظور ذخیره‌سازی و نگهداری طولانی مدت، از هر دو لاین سلولی طبق مراحل زیر فریز تهیه گردید.

۲-۵-۴- جداسازی سلول‌ها با استفاده از روش FACS

بطور کلی جداسازی سلول‌های مورد نظر با استفاده از روش FACS نسبت به روش‌هایی همانند limiting dilution و یا جداسازی با استفاده از میکروسکوپ، راهی سریع و ایمن جهت رسیدن به هدف نهایی می‌باشد. در سازه‌های ساخته شده در این پژوهش، توالی ژن EGFP با استفاده از IRES پس از توالی ژن داربی پوئتین آلفا همسانه‌سازی شده است. باتوجه به اینکه هر دو ژن تحت یک پروموتور CMV قرار داشته، با بررسی میزان بیان پروتئین EGFP و جداسازی سلول‌هایی که این پروتئین را به میزان بیشتری سنتز کرده‌اند، می‌توان به لاین سلولی دارای بیان بالاتری از پروتئین داربی پوئتین آلفا دست پیدا نمود.

در این بخش به مراحل انجام شده جهت جداسازی سلول‌های دارای بیان بالای پروتئین EGFP در دو لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID با استفاده از روش FACS می‌پردازیم.

خلاصه‌ی جداسازی سلول‌ها با استفاده از روش FACS

چکیده‌ی مراحل انجام شده به منظور جداسازی سلول‌های دارای بیان بالا از ژن EGFP با استفاده از روش FACS به شرح زیر می‌باشد.

۱. تهیه‌ی محیط کشت Cloning

۲. جداسازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL دارای بیان بالا از ژن EGFP با استفاده از روش FACS

۳. کشت و تهیه‌ی فریز از سلول‌های pOptiVEC-DLIGL جداسازی‌شده

۴. جداسازی سلول‌های UCOE-DLIGLID دارای بیان بالا از ژن EGFP با استفاده از روش FACS

۵. کشت و تهیه‌ی فریز از سلول‌های UCOE-DLIGLID جداسازی‌شده

آماده‌سازی محیط کشت Cloning

در طی فرایند جداسازی با استفاده از روش FACS، شرایط نگهداری و تعداد سلول‌ها متفاوت از شرایط ایده‌آل بوده، به همین جهت به محیطی غنی برای تامین انواع نیازهای سلول و جلوگیری از وارد شدن هرگونه شوک به آن نیاز است. محیط کشت Cloning از لحاظ ترکیبات کاملاً مشخص بوده و با توجه به مواد غنی موجود در آن، به منظور بهبود شرایط سلول پس از فرایند جداسازی از این محیط استفاده می‌گردد. مواد مورد نیاز جهت تهیه‌ی ۱۰۰ mL محیط کشت Cloning و مقادیر آن‌ها در جدول شماره‌ی ۲-۷۲ ذکر شده است.

جدول ۲-۸۳- مواد مورد نیاز جهت تهیه‌ی ۱۰۰ mL محیط کشت Cloning و مقادیر آن‌ها.

ردیف	نام ماده	میزان مورد نیاز
۱	CD FortiCHO™ Medium	۸۶ mL

۳ mL	L-glutamin (200 mM)	۲
10 mL	Conditional medium	۳
1 mL	HT ^{۵۵} supplement (100X)	۴

در ادامه به مراحل انجام شده جهت تهیهی محیط Conditional و همچنین محلول HT می‌پردازیم.

تهیهی محیط Conditional

مراحل انجام شده به منظور تهیهی محیط کشت Conditional به شرح زیر می‌باشد.

۱. ابتدا ویال حاوی سلول CHO DG44 ترنسکفت شده با وکتور pOptiVEC که ژنی در آن همسانه‌سازی

نشده در محیط کامل OptiCHO™ CD ذوب گردید.

۲. تا زمان دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۵٪، براساس شرایط سلول، پاساژ و یا تعویض محیط صورت گرفت.

۳. پس از دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۵٪، تعویض محیط سلول‌ها با چگالی اولیهی 10^6 cell/mL

در ۰/۳ در ۳۰ mL محیط کشت کامل CD OptiCHO™ در ارلن با حجم ۱۰۰ mL صورت گرفت.

۴. پس از گذشت ۵ روز محیط کشت حاوی سلول به فالكون ۵۰ mL منتقل و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید.

۵. محیط رویی به فالكون ۵۰ mL منتقل و از فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ ، عبور داده شد.

^{۵۵} Hypoxanthine thymidine

۶. محیط فیلتر شده به چند فالكون ۱۵ mL منتقل و سپس در فریزر °C ۷۰- ذخیره‌سازی گردید.

تهیه‌ی محلول HT با غلظت ۱۰۰X

باتوجه به اینکه هر دو ماده‌ی هیپوگزانتین و تیمیدین به صورت پودر در دسترس بود، تهیه‌ی ۱۰ mL محلول از این دو ماده طبق مراحل زیر صورت گرفت.

۱. میزان mg ۱۳/۶ از پودر هیپوگزانتین و mg ۳/۸ از تیمیدین با استفاده از ترازو وزن و به فالكون ۱۵ mL منتقل گردید.

۲. میزان ۱۰ mL آب مقطر به فالكون اضافه و سپس فالكون به آرامی تکان داده شد تا هر دو ماده در آب حل گردند.

۳. به منظور حل شدن کامل پودر هیپوگزانتین و تیمیدین در آب مقطر، فالكون حاوی محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۷۰ قرار گرفت.

۴. محلول را از فیلتر ۰/۲ μm عبور داده و سپس به ویال‌های ۱/۵ mL منتقل گردید.

۵. ویال حاوی محلول HT به فریزر °C ۲۰- منتقل شد.

جداسازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL با استفاده از روش FACS و کشت آن‌ها

جداسازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL با استفاده از روش FACS و همچنین کشت آن‌ها، طبق مراحل زیر صورت گرفت.

آماده‌سازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL جهت جداسازی

آماده‌سازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL جهت فرایند جداسازی سلول‌های دارای بیان بالا از ژن EGFP با استفاده از روش FACS، طبق مراحل زیر انجام شد.

۱. ابتدا ویال حاوی سلول هتروژن pOptiVEC-DLIGL به منظور کشت و جداسازی و همچنین یک ویال از لاین سلولی وکتور pOptiVEC که ژنی در آن همسانه‌سازی نشده به عنوان نمونه‌ی کنترل، در محیط کامل CD OptiCHO™ ذوب گردید.

۲. پس از گذشت ۲ تا ۳ پاساژ و یا تعویض محیط و دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۵٪، تعویض محیط سلول‌ها با چگالی اولیه‌ی $1 \times 10^6 \text{ cell/mL}$ در $0.2 \times 6 \text{ mL}$ محیط کامل CD OptiCHO™ طبق پروتکل انجام شد.

۳. در روز جداسازی، ابتدا براساس جدول شماره‌ی -، میزان مواد مورد نیاز به منظور تهیه‌ی 4 mL محیط کشت Cloning محاسبه و در فالكون 15 mL با یکدیگر ترکیب شدند. فالكون حاوی محیط به منظور گرم شدن، حداقل به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور با شرایط دمایی 37°C ، میزان ۸ درصد CO_2 و رطوبت ۸۵٪ قرار گرفت. از این فالكون جهت جمع‌آوری سلول‌های جداسازی شده استفاده شد.

۴. سپس سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو شمارش و درصد زنده‌مانی آن‌ها محاسبه گردید. پس از بررسی وضعیت سلول و اطمینان حاصل کردن از شرایط مناسب آن‌ها جهت انجام فرایند جداسازی، به منظور آماده‌سازی نمونه برای تنظیم اولیه‌ی دستگاه FACS، از لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL و کنترل، میزان 0.2×10^6 تا 0.3×10^6 سلول به Test Tube منتقل و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور 1200 rpm سانتریفیوژ گردید.

۵. مایع رویی را دور ریخته و رسوب سلولی هر Test Tube در $200 \mu\text{L}$ محیط کامل از پیش گرم شده‌ی CD DG44 حل گردید.

۶. سپس به منظور آماده‌سازی نمونه‌ی اصلی، میزان 1×10^6 سلول به فالكون ۱۵ mL منتقل و فالكون به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.

۷. مایع رویی را دور ریخته و سپس رسوب سلولی در ۱/۵ mL محیط کامل از پیش گرم شده‌ی CD DG44 حل گردید.

۸. محیط کشت حاوی سلول که در مرحله‌ی ۷ آماده گردید جهت جداسازی و حذف کلمپ سلولی از فیلتر $30 \mu\text{m}$ عبور داده شد.

جداسازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL دارای بیان بالا از ژن EGFP

در ابتدا دستگاه با استفاده از نمونه‌های کنترلی که در Test Tube تهیه گردید تنظیم شد. به منظور حفظ شرایط مناسب سلول برای رشد و جلوگیری از اینکه سلول‌ها زمان زیادی را خارج از انکوباتور و شرایط نامناسب زیست سپری کنند، در هر سری جداسازی میزان 1×10^6 سلول به دستگاه داده شد.

کشت و تهیه‌ی فریز از سلول‌های pOptiVEC-DLIGL جداسازی شده

پس از فرایند جداسازی، مراحل انجام شده تا زمان دستیابی به تعداد مناسب سلول به منظور کشت در حجم بالاتر و همچنین تهیه‌ی فریز از آن‌ها به شرح زیر می‌باشد.

۱. در هر سری جداسازی، سلول‌ها در فالكون ۱۵ mL حاوی ۴ mL محیط کشت Cloning جمع‌آوری شدند.

۲. فالكون حاوی سلول‌های جداسازی شده، به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ شد.

۳. مایع رویی را دور ریخته و رسوب در $200 \mu\text{L}$ از محیط Cloning حل و به ظرف ۴۸ خانه منتقل گردید.

۴. وضعیت لاین سلولی پس از گذشت دو روز از زمان جداسازی با استفاده از میکروسکوپ نوری Invert بررسی گردید.

۵. شرایط سلول‌ها روزانه با استفاده از میکروسکوپ نوری Invert بررسی و متناسب با آن، هر دو تا سه روز یکبار تعویض محیط و یا پاساژ با میزان مناسبی از محیط کشت Cloning انجام و در صورت لزوم به ظرف‌های بزرگتری منتقل شدند.

۶. پس دستیابی به تعداد مناسبی سلول جهت کشت در ظرف ۶ خانه، شمارش و سپس به منظور حذف محیط Cloning، تعویض محیط آن‌ها با محیط کامل CD OptiCHO™ صورت گرفت.

۷. پس از دستیابی به تعداد سلول‌ها مورد نظر، به منظور نگهداری طولانی مدت آن‌ها، فریز تهیه گردید.

جداسازی سلول‌های UCOE-DLIGLID با استفاده از روش FACS

جداسازی سلول‌های UCOE-DLIGLID با استفاده از روش FACS و همچنین کشت آن‌ها، طبق مراحل زیر صورت گرفت.

آماده‌سازی سلول‌های UCOE-DLIGLID جهت جداسازی

آماده‌سازی سلول‌های UCOE-DLIGLID جهت فرایند جداسازی سلول‌های دارای بیان بالا از ژن EGFP با استفاده از روش FACS، انجام گرفت.

جداسازی سلول‌های UCOE-DLIGLID دارای بیان بالا از ژن EGFP

ابتدا دستگاه با استفاده از نمونه‌های کنترلی که در Test Tube تهیه گردید تنظیم شد. به منظور حفظ شرایط مناسب سلول برای رشد و جلوگیری از اینکه سلول‌ها زمان زیادی را خارج از انکوباتور و شرایط نامناسب زیست سپری کنند، در هر سری جداسازی میزان 1×10^6 سلول به دستگاه داده شد.

کشت و تهیه‌ی فریز از سلول‌های UCOE-DLIGLID جداسازی شده

پس از جداسازی سلول‌ها با استفاده از روش FACS، مراحل انجام شده به منظور دستیابی به تعداد مناسب سلول جهت کشت در حجم بالاتر و همچنین تهیه‌ی فریز از آن‌ها، انجام شد.

۲-۵-۵- بررسی بیان در سطح RNA و پروتئین

در این بخش به مراحل تست‌های انجام شده جهت تایید و بررسی بیان ژن داربی پوئین آلفا و EGFP در سطح ترانسکریپت و پروتئین و همچنین ارتباط سطح بیان این دو مولکول در شش لاین سلولی مورد نظر می‌پردازیم. در جدول زیر اسامی لاین‌های سلولی مورد بررسی ذکر شده است.

جدول ۲-۸۲- اسامی و اطلاعات شش لاین سلولی مورد بررسی در این پژوهش.

ردیف	نام رده‌ی سلولی	توالی درج شده در آن	سلول جداسازی شده با	درصد
	هتروژن		FACS	جداسازی شده
	pOptiVEC-DLIGL		pOptiVEC-DLIGL 10%	۱۰٪

۶٪	pOptiVEC-DLIGL 6%	DPO-LoxP-IRES-EGFP-LoxP		۱
۳۰٪	UCOE-DLIGLID 30%	DPO-LoxP-IRES-EGFP-LoxP-IRES-	UCOE-DLIGLID	۲
۱۰٪	UCOE-DLIGLID 10%	DHFR		

چکیده‌ی مراحل انجام شده به منظور بررسی بیان ژن داربی پوئین آلفا و EGFP در سطح RNA و پروتئین به شرح زیر می‌باشد.

۱. نمونه‌برداری از شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-

DLIGLID

۲. انجام تست Real Time PCR به منظور بررسی میزان بیان ژن داربی پوئین آلفا در سطح RNA

۳. انجام تست Real Time PCR به منظور بررسی میزان بیان ژن EGFP در سطح RNA

۴. انجام تست فلوسایتومتری به منظور بررسی میزان سنتز پروتئین EGFP

۵. انجام تست Western Blot به منظور بررسی میزان سنتز پروتئین داربی پوئین آلفا

۶. انجام تست الایزا به منظور بررسی کمی میزان بیان پروتئین داربی پوئین آلفا

نمونه‌برداری از لاین‌های سلولی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID

به منظور بررسی میزان بیان ژن داربی پوئین آلفا و EGFP در سطح RNA و پروتئین، نمونه‌برداری از

رسوب و محیط کشت سلولی در دو لاین هتروژن pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و چهار لاین

جداسازی شده‌ی 10% pOptiVEC-DLIGL، 6% pOptiVEC-DLIGL، 30% UCOE-DLIGLID، UCOE- DLIGLID 10% مطابق مراحل زیر صورت گرفت.

۱. ابتدا یک ویال از هر شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE- DLIGLID به منظور کشت و برداشت نمونه، طبق مراحل ذکر شده در بخش ۲-۴-۳-۱ در محیط کامل CD OptiCHO™ ذوب گردید.

۲. پس از گذشت ۲ تا ۳ پاساژ و یا تعویض محیط و دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۵٪، تعویض محیط سلول‌ها با چگالی اولیه‌ی 10^6 cell/mL در $0.3 \times 5 \text{ mL}$ محیط CD OptiCHO™ کامل طبق پروتکل بخش ۲-۴-۳-۴ انجام شد.

۳. پس از گذشت ۵ روز، شمارش سلولی مطابق مراحل بخش ۲-۴-۳-۲ انجام گرفت.

۴. به منظور تهیه‌ی نمونه جهت استخراج RNA و پروتئین، به ترتیب میزان 3×10^6 و 6×10^6 سلول به ویال‌های $1/5 \text{ mL}$ و باقی سلول‌ها به فالكون 15 mL منتقل گردید.

۵. ویال و فالكون حاوی سلول، به مدت ۵ دقیقه و با دور 2000 rpm سانتریفیوژ شدند.

۶. مایع رویی رسوب (محیط کشت سلول) به ویال‌های $1/5 \text{ mL}$ منتقل گردید.

۷. ویال و فالكون حاوی رسوب سلولی متعلق به هر لاین، به فریزر 70°C منتقل شد.

۸. ویال حاوی محیط کشت سلول متعلق به هر لاین، به فریزر 20°C منتقل شد.

تست Real Time PCR

پس از تایید درج سازه درون ژنوم سلول هدف، بررسی بیان ژن مورد نظر در سطح mRNA صورت می‌گیرد. در این بخش ابتدا به مراحل انجام شده به منظور آماده‌سازی نمونه‌های cDNA لاین‌های سلولی pOptiVEC- DLIGL و UCOE-DLIGLID و سپس شرایط تست Real Time PCR صورت گرفته می‌پردازیم.

استخراج RNA از لاین‌های سلولی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID

استخراج RNA از نمونه‌ی رسوب سلولی دو لاین هتروژن pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و چهار لاین جداسازی‌شده‌ی 10% pOptiVEC-DLIGL، 6% pOptiVEC-DLIGL و 30% UCOE-DLIGLID، با استفاده از کیت NucleoSpin RNA از شرکت MN صورت گرفت.

تیمار نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول با آنزیم *DNase*

به منظور حذف کامل DNA موجود در نمونه‌های RNA استخراج شده از شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی-شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID، تیمار این نمونه‌ها با استفاده از آنزیم *DNase* طبق شرایط زیر انجام شد.

جدول ۲-۸۵- مواد مورد نیاز جهت تیمار نمونه‌های RNA استخراج شده از شش لاین سلولی با آنزیم *DNase*.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	RNA	۳ µg
۲	<i>DNase I</i> (1 U/µL)	۲ µL
۳	10X Reaction Buffer with MgCl ₂	۲ µL
۴	dH ₂ O	مابقی تا حجم ۲۰ µL

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۸۵ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ قرار گرفت، سپس به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، میزان ۲ μL از EDTA 50 mM به ویال اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۶۵ قرار داده شد. در نهایت کمیت و کیفیت نمونه‌های RNA تیمار شده با آنزیم *DNaseI* با استفاده از دستگاه NanoDrop مورد بررسی قرار گرفت.

سنتز cDNA از نمونه‌های RNA تیمار شده با آنزیم *DNase*

به منظور تهیه‌ی Template واکنش Real Time PCR، سنتز cDNA از نمونه‌های RNA تیمار شده با آنزیم *DNase* از شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID با استفاده از کیت RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis از شرکت Thermo Scientific طبق شرایط زیر صورت گرفت.

جدول ۲-۸۶- مواد مورد نیاز در واکنش سنتز cDNA از نمونه‌های RNA تیمار شده شش لاین سلولی.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Treated RNA	۱ μg
۲	Oligo(dT) Primer (0.2 μg/μL)	۱ μL
۳	dH ₂ O	مابقی تا حجم ۱۲ μL

ویال حاوی مواد ذکر شده در جدول شماره‌ی ۲-۸۶ به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۶۵ قرار گرفت، سپس بر روی یخ منتقل و مواد جدول شماره‌ی ۲-۸۷ به آن اضافه گردید.

جدول ۲-۸۷- مواد اضافه شده به واکنش سنتز cDNA از نمونه های RNA تیمار شده شش لاین سلولی.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۴	5X Reaction Buffer	۴ µg
۵	RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	۲ µL
۶	10 mM dNTP Mix	۱ µL
۷	RevertAid H Minus M-MuLV <i>Reverse Trascriptase</i> (200 U/µL)	۱ µL
	حجم نهایی	۲۰ µL

سپس ویال به مدت ۶۰ دقیقه در دمای °C ۴۲ و به منظور غیرفعال شدن آنزیم، ۱۰ دقیقه در دمای °C ۷۰ قرار گرفت. در نهایت نمونه های cDNA به منظور استفاده در تست Real Time PCR آماده شدند.

تست Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا در سطح ترانسکرپت

به منظور بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا در سطح RNA و همچنین مقایسه ی شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی شده ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID، تست Real Time PCR بر روی نمونه های cDNA تهیه شده از آنها با پرایمرهای اختصاصی ژن هدف و ژن Housekeeping مطابق شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۸۸- مواد مورد نیاز در واکنش Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن داربی پوئین آلفا.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۱ μL (۱۰ ng)
۲	F Real DPO (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R Real DPO (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	RealQ Plus 2x Master Mix Green	۵ μL
۵	dH ₂ O	۱۳ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

جدول ۲-۸۹- مواد مورد نیاز در واکنش Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن داربی پوئین آلفا.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۱ μL (۱۰ ng)
۲	F Real GAPDH (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R Real GAPDH (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	RealQ Plus 2x Master Mix Green	۵ μL
۵	dH ₂ O	۱۳ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

جدول ۲-۹۰- شرایط دمایی واکنش Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن داربی پوئین آلفا.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۵ °C	۱۰ دقیقه	۱

۴۰	۱۵ ثانیه	۹۵ °C	واسرشت DNA	۲
	۱ دقیقه	۶۰ °C	اتصال پرایمرها و تکثیر	۳
۱	۱۵ ثانیه	۹۵ °C	رسم نمودار دمای ذوب	۴
	۱ دقیقه	۶۰ °C		
	۱۵ ثانیه	افزایش مرحله‌ای دما هر بار به میزان ۰/۳ °C تا دستیابی به دمای ۹۵ °C		

تست Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن EGFP در سطح ترانسکریپت

به منظور بررسی بیان ژن EGFP در سطح RNA و همچنین مقایسه‌ی شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID، تست Real Time PCR بر روی نمونه‌های cDNA تهیه شده از آن‌ها با پرایمرهای اختصاصی ژن هدف و ژن Housekeeping مطابق شرایط زیر گذاشته شد.

جدول ۲-۹۱- مواد مورد نیاز در واکنش Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن EGFP.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۱ μL (۱۰ ng)
۲	F Real EGFP (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R Real EGFP (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	RealQ Plus 2x Master Mix Green	۵ μL
۵	dH ₂ O	۱۳ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

جدول ۲-۹۲- مواد مورد نیاز در واکنش Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن EGFP.

ردیف	نام ماده	مقادیر
۱	Template	۱ μL (۱۰ ng)
۲	F Real GAPDH (10 pmol)	۰/۵ μL
۳	R Real GAPDH (10 pmol)	۰/۵ μL
۴	RealQ Plus 2x Master Mix Green	۵ μL
۵	dH ₂ O	۱۳ μL
	حجم نهایی	۲۰ μL

جدول ۲-۹۳- شرایط دمایی واکنش Real Time PCR جهت بررسی میزان بیان ژن EGFP.

ردیف	مرحله	دما	زمان	تعداد تکرار
۱	واسرشت اولیه DNA	۹۵ °C	۱۰ دقیقه	۱
۲	واسرشت DNA	۹۵ °C	۱۵ ثانیه	۴۰
۳	اتصال پرایمرها و تکثیر	۶۰ °C	۱ دقیقه	
۴	رسم نمودار دمای ذوب	۹۵ °C	۱۵ ثانیه	۱
		۶۰ °C	۱ دقیقه	
		افزایش مرحله‌ای دما هر بار به میزان ۰/۳ °C تا دستیابی به دمای ۹۵ °C	۱۵ ثانیه	

آزمایش فلوسایتومتری

آماده‌سازی نمونه‌های دو لاین هتروژن pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و چهار لاین جداسازی‌شده‌ی ۱۰% pOptiVEC-DLIGL، ۶% pOptiVEC-DLIGL، ۳۰% UCOE-DLIGLID، و UCOE-

DLIGLID 10%، به منظور بررسی بیان ژن EGFP در سطح پروتئین و همچنین مقایسه‌ی آن‌ها با استفاده از فلوسایتومتری، صورت گرفت.

وسترن بلاتینگ

به منظور بررسی بیان ژن داربی پوئین آلفا در سطح پروتئین، تست وسترن بلات بر روی نمونه‌های پروتئین استخراج‌شده از رسوب سلولی و همچنین محیط کشت سلول صورت گرفت. در این بخش به مراحل انجام شده جهت استخراج پروتئین از نمونه‌های رسوب دو لاین هتروژن pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و چهار لاین جداسازی‌شده‌ی 10% pOptiVEC-DLIGL، 6% pOptiVEC-DLIGL، 30% UCOE-DLIGLID، 10% UCOE-DLIGLID، بررسی کیفیت پروتئین‌های استخراج‌شده و محیط کشت سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE و همچنین شرایط تست وسترن بلات انجام‌شده می‌پردازیم.

استخراج پروتئین از رسوب سلولی لاین‌های pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID

استخراج پروتئین از نمونه‌ی رسوب سلولی دو لاین هتروژن pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و چهار لاین جداسازی‌شده‌ی 10% pOptiVEC-DLIGL، 6% pOptiVEC-DLIGL، 30% UCOE-DLIGLID، با استفاده از کیت Qproteom Mammalian Protein Prep از شرکت QIAGEN صورت گرفت.

تغلیظ نمونه‌های محیط کشت سلولی لاین‌های pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID

تغلیظ نمونه‌های محیط کشت سلولی جمع‌آوری شده از هر شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID با استفاده از فیلتر ۱۰ kDa طبق مراحل زیر صورت گرفت.

۱. ابتدا به منظور فعال‌سازی فیلتر تغلیظ کننده، آب مقطر بر روی آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه، با دور g ۴۵۰۰ و دمای 4°C سانتریفیوژ شد.

۲. پس از خارج کردن آب مقطر از لوله، از نمونه‌های محیط کشت جمع‌آوری شده‌ی هر لاین سلولی مطابق شرایط ذکر شده در بخش ۲-۴-۴، یک ویال از فریزر 20°C - خارج و پس از ذوب شدن، بر روی فیلتر منتقل گردید. سپس مطابق مرحله‌ی ۱ سانتریفیوژ صورت گرفت.

۳. محلول جمع‌شده بالای فیلتر، محیط کشت سلولی تغلیظ شده و فاقد پروتئین‌های کوچکتر از ۱۰ kDa می‌باشد. این محلول به ویال ۱/۵ mL جدید منتقل شد.

۴. به منظور غیرفعال‌سازی فیلتر، آب مقطر به آن اضافه و مطابق مرحله‌ی ۱ سانتریفیوژ انجام گرفت.

۵. به منظور نگهداری طولانی مدت فیلتر، پس از خارج کردن آب مقطر، اتانول ۲۰٪ به لوله اضافه و سپس به یخچال با دمای 4°C منتقل شد.

تست SDS-PAGE نمونه‌های پروتئین استخراج شده pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID

تست SDS-PAGE روشی است که در طی آن پروتئین‌ها ساختار فضایی چهارم خود را از دست داده و براساس سایز مولکولی از یکدیگر تفکیک می‌گردند. مراحل تست SDS-PAGE صورت گرفته به منظور بررسی کیفیت پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID طبق پروتکل ذکر شد در قسمت‌های قبل انجام شد.

آزمایش SDS-PAGE نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده لاین‌های pOptiVEC-DLIGL و

UCOE-DLIGLID

با توجه به اینکه پروتئین داربی‌پوئین آلفا ترشحی بوده، تست SDS-PAGE به منظور بررسی کیفیت پروتئین‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده از شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID صورت گرفت.

شناسایی پروتئین داربی‌پوئین آلفا با استفاده از تست وسترن بلات در نمونه‌های پروتئین استخراج شده

به منظور بررسی میزان بیان ژن داربی‌پوئین آلفا در سطح پروتئین، تست وسترن بلات بر روی نمونه‌های پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID صورت گرفت.

شناسایی پروتئین داربی‌پوئین آلفا با استفاده از تست وسترن بلات در نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده

با توجه به اینکه پروتئین داربی‌پوئین آلفا ترشحی بوده، تست وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان این ژن در سطح پروتئین و ترشح آن به محیط کشت و همچنین مقایسه‌ی شدت بیان، بر روی نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده از شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID با غلظت ۴۸/۵ mg/mL صورت گرفت.

الایزا

به منظور بررسی میزان پروتئین استخراج شده از سوپ و رسوب سلولی شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID طبق پروتکل ذکر شد در قسمت‌های قبل واکنش الایزا انجام شد.

فصل سوم

نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از ساخت سازه‌های ژنی pOptiVEC- Darbepoetin alpha و

UCOE- Darbepoetin alpha -IRES-DHFR، انتقال آن‌ها به داخل سلول و بررسی

بیان داربی پوئتین آلفا

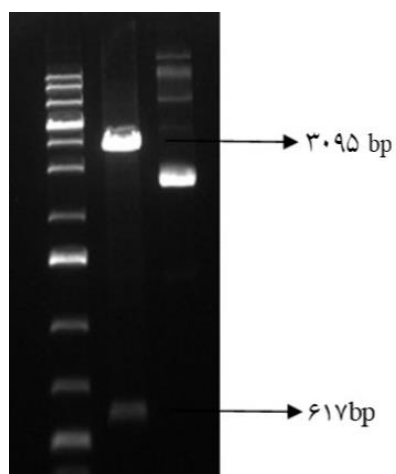
۳-۱-۱- کلون سازی قطعه داربی پوئتین آلفا در ناقل pOptiVEC

واکنش برش آنزیمی توالی داربی پوئتین آلفا از ناقل pUC57

برش آنزیمی قطعه داربی پوئتین آلفا از ناقل pUC57 به وسیله آنزیم‌های محدودالایر *XhoI* و *EcoRV* انجام

شد. پس از انجام این واکنش قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا به طول ۶۱۷ bp خارج می‌گردد. نتایج حاصل از این واکنش

در شکل ۳-۱ آمده است.



شکل ۳-۱- نتایج حاصل از برش آنزیمی داربی پوئتین آلفا از ناقل pUC57

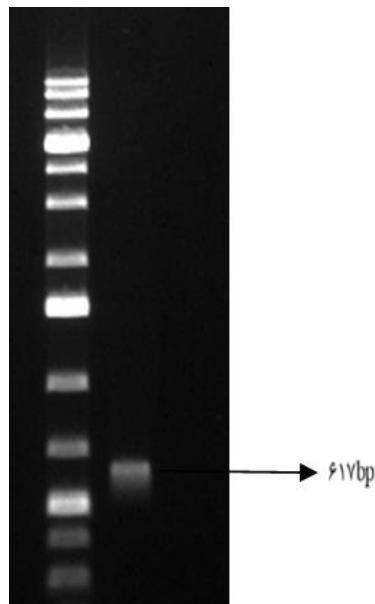
ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: محصول واکنش برش آنزیمی (قطعه داربی پوئتین آلفا)

ستون ۳: ناقل pUC57 دایجست نشده

تخلیص قطعه داربی پوئتین آلفا و استخراج آن از ژل

محتویات ۵ میکروتیوب حاصل از واکنش برش آنزیمی یکی شد. سپس Loading Dye و کل محصول واکنش برش آنزیمی به ترتیب به نسبت ۱ به ۶ با هم مخلوط شدند. ران و برش باند مورد نظر از روی ژل انجام شد و در ادامه خالص سازی باند مورد نظر از روی ژل توسط کیت High pure PCR product purification kit انجام گرفت. نمونه تخلیص شده حاوی ژن مورد نظر است که برای تایید بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. قرارگیری تک باند محصول تخلیص شده در جایگاه درست ۶۱۷ جفت بازی نشان دهنده صحت مرحله تخلیص و حذف کامل باندهای غیر اختصاصی می باشد. در ادامه این محصول در ناقل بیانی pOptiVEC کلون خواهد شد. نتیجه حاصل از تخلیص قطعه داربی پوئتین آلفا در شکل ۲-۳ نشان داده شده است. واکنش برش آنزیمی و کتور pOptiVEC

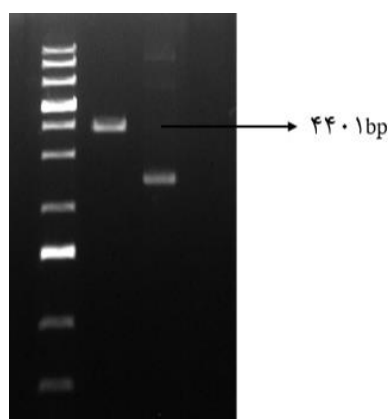


شکل ۲-۳- نتیجه حاصل از تخلیص قطعه داربی پوئتین آلفا از ژل

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: محصول واکنش برش آنزیمی (قطعه داربی پوئتین آلفا)

برای استخراج ناقل بیانی از باکتری‌های استوک شده حاوی این ناقل کشت مایع انجام شد. سپس تمامی مراحل استخراج پلاسمید از باکتری‌های کشت داده شده با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit انجام گرفت. سرانجام برش آنزیمی ناقل pOptiVEC به وسیله دو آنزیم *XhoI* و *EcoRV* که قطعه داربی-پوئین آلفا را با آن‌ها Digest کرده بودیم، انجام شد. و پس از شست و شو و حذف بافرهای اضافی با کیت High Pure PCR Product Purification Kit بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه حاصل از این واکنش در شکل ۳-۳ آمده است.



شکل ۳-۳- نتیجه حاصل از برش آنزیمی ناقل pOptiVEC

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: محصول واکنش برش آنزیمی ناقل pOptiVEC

ستون ۳: ناقل pOptiVEC دایجست نشده

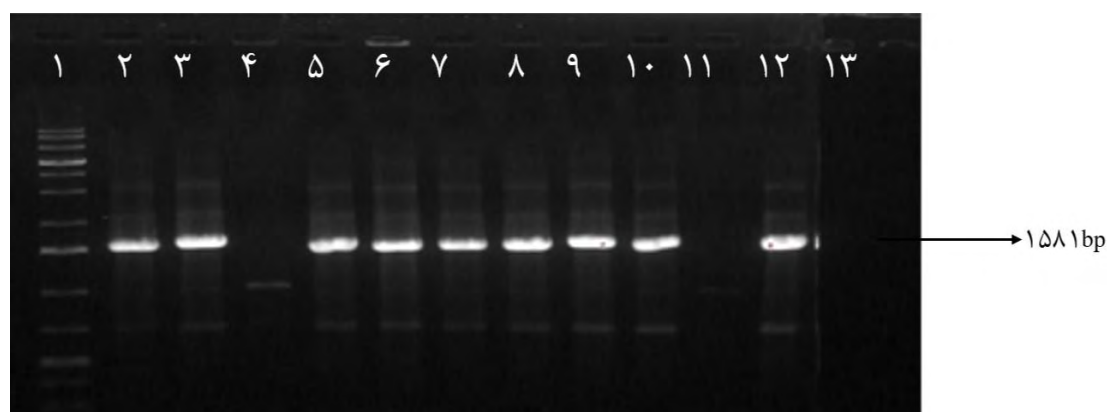
تائید ترنسفورماسیون ناقل نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin در باکتری با استفاده از Colony PCR

Colony PCR برای تائید نو ترکیب بودن چند کلون از کلون‌های ترنسفکت شده می‌باشد. بر روی ۱۱ کلون

با استفاده از دو پرایمر با نام‌های F seq on pOptiVEC و R DHFR (*ECORI*)، PCR گذاشته شد. نمونه‌های

حاصل از واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. دو کلون شماره ۱ و ۲ جهت ادامه مراحل تائیدی مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج حاصل از بررسی تائید ترنسفورماسیون کلون‌های نو ترکیب با استفاده از Colony PCR در شکل ۳-۴ آمده است.



شکل ۳-۴- محصول Colony PCR بر روی کلون‌های ترنسفورم شده با ناقل pOptiVEC-DPO

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲ تا ۱۲: کلون‌های ۱ تا ۱۱ ترنسفورم شده با ناقل pOptiVEC-Darbepoetin

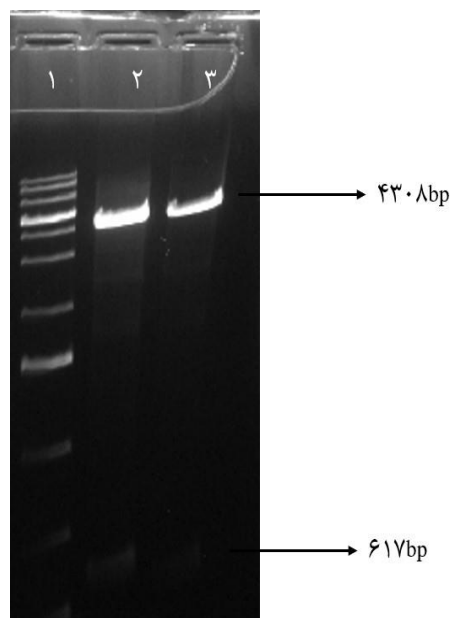
ستون ۱۳: کنترل منفی

تائید ترنسفورماسیون ناقل نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha در باکتری با استفاده از برش آنزیمی

دو کلون از کلون‌هایی که توسط واکنش PCR تایید شدند، با استفاده از High Pure Plasmid Isolation

Kit استخراج شدند و سپس با آنزیم‌های کلونینگ، *XhoI* و *EcoRV* بر روی آن‌ها واکنش هضم آنزیمی انجام

شد. در این واکنش پس از برش آنزیمی ۲ قطعه خواهیم داشت، قطعه اول ژن داربی پوئتین آلفا با سایز ۶۱۷ جفت باز و قطعه دوم ناقل خطی شده به طول ۴۳۰۸ جفت باز خواهد بود. نتیجه بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد (شکل ۳-۵).



شکل ۳-۵- تأیید ترنسفورماسیون کلون‌های انتخابی دارای سازه pOptiVEC-DPO به وسیله برش آنزیمی

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: ناقل خطی شده به وسیله برش آنزیمی (کلون شماره ۱)

ستون ۳: ناقل خطی شده به وسیله برش آنزیمی (کلون شماره ۲)

تعیین توالی نوکلئوتیدهای سازه ژنی pOptiVEC-Darbepoetin alpha

بعد از انجام واکنش برش آنزیمی و اطمینان از نو ترکیب بودن ناقل، برای اطمینان از این که توالی سازه ژنی pOptiVEC-Darbepoetin alpha در طی مراحل مختلف دچار تغییر و جهش نشده باشد لازم است تا تعیین

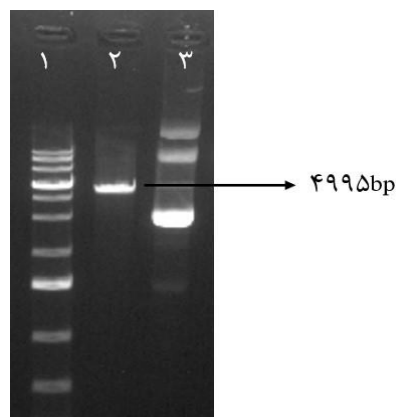
توالی گردد. جهت انجام تعیین توالی به استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse که بتوانند قطعه ژنی را بعد از خوانش پوشش دهند، نیاز داریم. توالی و پرایمرها جهت سنتز به شرکت پیشگام ارسال شدند. تمامی خوانش‌ها پس از دریافت با برنامه CLC Genomics و برنامه Nucleotide Blast از بانک NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه به دست آمده هیچ‌گونه جهش در توالی ژن داربی‌پوئین آلفا را نشان نداد. پرایمرهای ارسال شده جهت تعیین توالی در جدول ۱-۳ آمده است.

جدول ۱-۳- پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین توالی کلون‌های نوترکیب دارای pOptiVEC-DPO

ردیف	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال
۱	F Real EPO-FH	5'TGAGCACTGTAGCCTGAACG3'	۶۰ درجه سانتی‌گراد
۲	F seq on pOptiVEC	5'ACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA3'	۶۰,۴ درجه سانتی‌گراد
۳	Rev Seq DPO	5' ACCTCAGTCCAGACACGG3'	۵۸,۲ درجه سانتی‌گراد

آماده سازی وکتور نوترکیب pOptiVEC-DPO جهت ترنسفکشن به لاین سلولی CHO-DG44

استخراج ناقل pOptiVEC-Darbepoetin alpha با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit انجام شد و واکنش هضم آنزیمی برای خطی کردن ناقل نوترکیب با آنزیم *PvuII* انجام و نتیجه بر روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۳-۶).



شکل ۳-۶- محصول استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی pOptiVEC-DPO

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

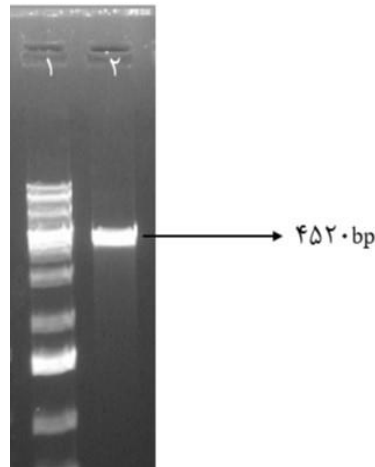
ستون ۲: ناقل نوترکیب خطی شده pOptiVEC-DPO به وسیله برش آنزیمی با آنزیم *PvuII*

ستون ۳: محصول استخراج پلاسمید pOptiVEC-DPO

۳-۱-۲- کلون سازی قطعه Darbepoetin alpha-IRES-DHFR در ناقل بیانی UCOE

واکنش برش آنزیمی توالی داربی پوئتین آلفا از ناقل pUC57

در ابتدا، استخراج پلاسمید pUC57 حاوی قطعه سنتز شده DPO-IRES-DHFR توسط کیت High Pure Plasmid Isolation Kit از شرکت Roche انجام گرفت. برش آنزیمی به وسیله آنزیم‌های محدودالایر *NheI* و *NgoMIV* در دو مرحله انجام شد. برش اول ابتدا به وسیله آنزیم محدودالایر *NheI* و سپس توسط آنزیم *NgoMIV* و پس از هر مرحله Clean up با کیت High Pure PCR Product Purification Kit انجام شد. پس از برش با آنزیم اول قطعه با ۴۵۲۰ جفت باز و پس از برش دوم ۲ قطعه با ۲۷۰۹ و ۱۸۱۱ جفت باز خواهیم داشت. تمام محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۱٪ جهت بررسی بیشتر برده شد (شکل ۳-۷ و ۳-۸).



شکل ۳-۷- نتیجه حاصل از هضم آنزیمی ناقل pUC57-DPO-IRES-DHFR به وسیله آنزیم *NheI*

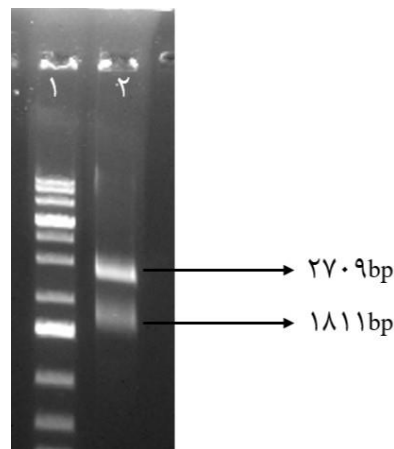
ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: محصول هضم آنزیمی pUC57-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

استخراج و

تخلیص

قطعه



شکل ۳-۸- نتیجه حاصل از هضم آنزیمی ناقل pUC57-DPO-IRES-DHFR به وسیله آنزیم

NgoMIV

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

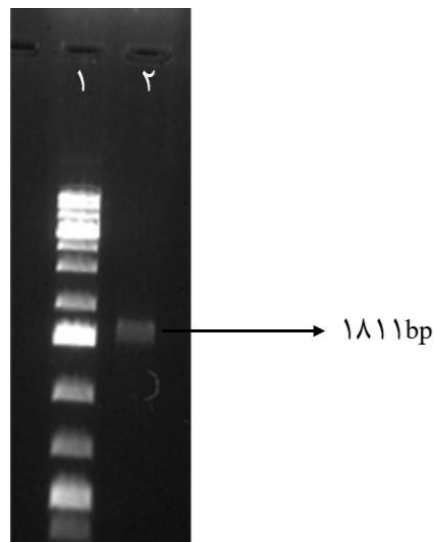
Darbepoetin alpha-IRES-DHFR از ژل

برای به دست آوردن محصول خالص و حذف باندهای اضافه در مرحله برش آنزیمی، باند مورد نظر از روی

ژل برش خورد و تخلیص گردید. بدین منظور محصول ۳ واکنش برشی آماده و ترکیب شد سپس Loading Dye

و کل محصول واکنش برش آنزیمی به ترتیب به نسبت ۱ به ۶ با هم مخلوط شدند. ران و برش باند مورد نظر از

روی ژل انجام شد و در ادامه خالص سازی باند مورد نظر از روی ژل توسط کیت High pure PCR product purification kit انجام گرفت. نمونه تخلیص شده حاوی ژن مورد با اندازه ۱۸۱۱ جفت باز می باشد که برای تایید بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید (شکل ۳-۹).



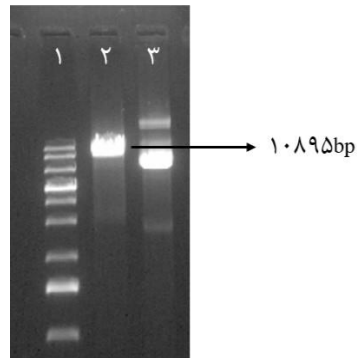
شکل ۳-۹- نتیجه حاصل از تخلیص قطعه Darbepoetin alpha-IRES-DHFR از ژل

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: محصول استخراج و تخلیص Darbepoetin alpha-IRES-DHFR از ژل

واکنش برش آنزیمی ناقل UCOE

اولین برش این ناقل بیانی به وسیله آنزیم *NheI* انجام و بعد Cleanup شد، سپس برش آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* انجام و مجدد Cleanup شد. نتایج حاصل از این هضم آنزیمی قبل از Clean up در شکل ۳-۱۰ و نتایج حاصل از برش آنزیمی دوم پس از Clean up در شکل ۳-۱۱ آورده شده است.

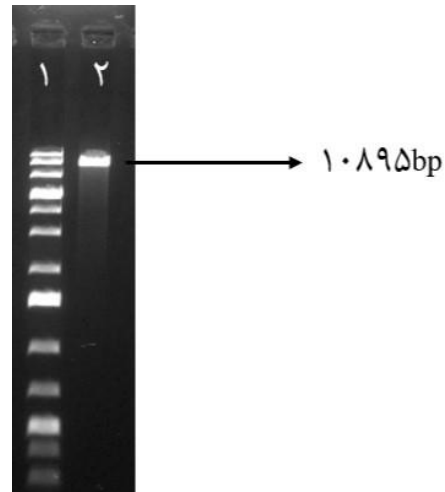


شکل ۳-۱۰- نتیجه حاصل از هضم آنزیمی ناقل UCOE با آنزیم *NheI*

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: ناقل UCOE، محصول هضم آنزیمی در مرحله اول با آنزیم *NheI*

ستون ۳: محصول استخراج پلاسمید UCOE



شکل ۳-۱۱- نتیجه حاصل از هضم آنزیمی ناقل UCOE با آنزیم *NgoMIV*

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: ناقل UCOE، محصول هضم آنزیمی در مرحله دوم با آنزیم *NgoMIV*

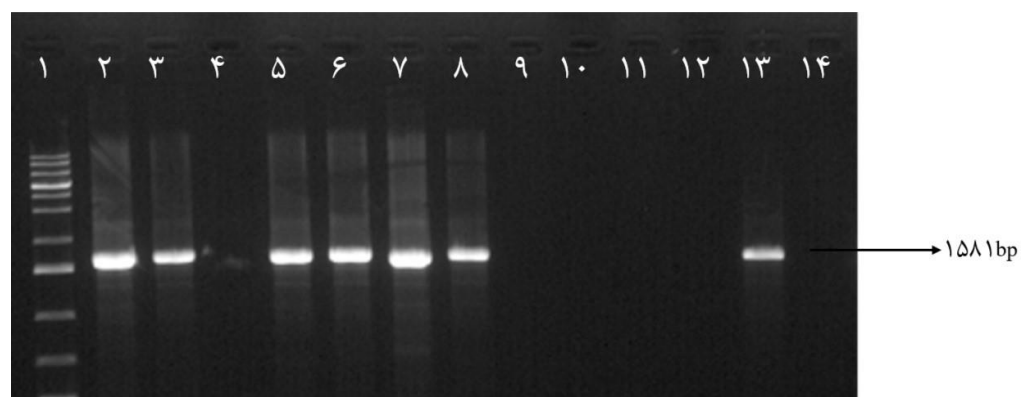
تائید ترنسفورماسیون ناقل نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin در باکتری با استفاده از Colony PCR

Colony PCR برای تائید نو ترکیب بودن چند کلون از کلون‌های ترنسفکت شده می‌باشد. بر روی ۱۱ کلون

با استفاده از دو پرایمر با نام‌های F seq on pOptiVEC و R DHFR (*ECORI*) PCR گذاشته شد. نمونه‌های حاصل از واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. دو کلون جهت ادامه مراحل تائیدی مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج حاصل از بررسی تائید ترنسفورماسیون کلون‌های نو ترکیب با استفاده از Colony PCR در شکل ۳-۳-

۱۲ آمده است.



شکل ۳-۱۲- آنالیز محصول Colony PCR بر روی کلون‌های ترنسفورم شده با ناقل UCOE-Darbepoetin-IRES-DHFR

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

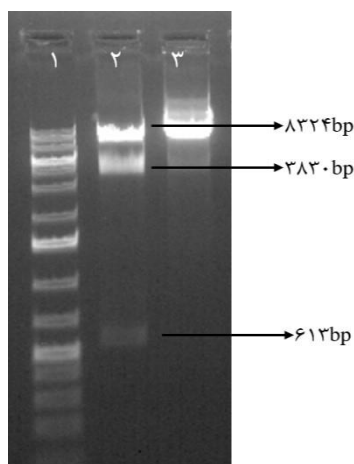
ستون ۲ تا ۱۳: کلون‌های ۸۰ تا ۹۱ ترنسفورم شده با ناقل UCOE-Darbepoetin-IRES-DHFR

ستون ۱۴: کنترل منفی

تایید حضور توالی سازه ژنی Darbepoetin alpha-IRES-DHFR در ناقل بیانی نو ترکیب UCOE با

استفاده از واکنش برش آنزیمی

دو کلون از کلون‌هایی که توسط واکنش PCR تایید شدند، با استفاده از High Pure Plasmid Isolation Kit استخراج شدند و سپس با آنزیم *NOTI* بر روی آن‌ها واکنش هضم آنزیمی انجام شد. به دلیل ۲ مرحله‌ای بودن استفاده از آنزیم‌های مرحله کلونینگ، آنزیم *NOTI* که دارای ۲ جایگاه ژنی بر روی سازه UCOE-DPO-IRES-DHFR می‌باشد جهت انجام این واکنش انتخاب شد. پس از برش آنزیمی با این آنزیم ۳ قطعه به سائز ۸۳۲۴، ۳۸۳۰ و ۶۱۳ جفت باز خواهیم داشت. نتیجه بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد (شکل ۳-۱۳).



شکل ۳-۱۳- تایید ترنسفورماسیون کلون‌های انتخابی دارای سازه UCOE-DPO-IRES-DHFR به وسیله برش آنزیمی با آنزیم *NOTI*

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: ناقل خطی شده دارای ۳ باند به وسیله برش آنزیمی

ستون ۳: محصول استخراج پلاسمید UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

تعیین توالی نوکلئوتیدهای سازه ژنی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

بعد از انجام واکنش برش آنزیمی و اطمینان از نوترکیب بودن ناقل، برای اطمینان از این که توالی سازه ژنی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR در طی مراحل مختلف دچار تغییر و جهش نشده باشد لازم است تا تعیین توالی گردد. جهت انجام تعیین توالی به استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse که بتوانند قطعه ژنی را بعد از خوانش پوشش دهند، نیاز داریم. توالی و پرایمرها جهت سنتز به شرکت پیشگام ارسال شدند. تمامی خوانش‌ها پس از دریافت با برنامه CLC Genomics و برنامه Nucleotide Blast از بانک NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. نتیجه به دست آمده هیچ‌گونه جهش در توالی ژن داربی‌پوئتین آلفا قطعه IRES و DHFR را نشان نداد. پرایمرهای ارسال شده جهت تعیین توالی در جدول ۳-۲ آمده است.

جدول ۳-۲- پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین توالی کلون‌های نوترکیب دارای UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

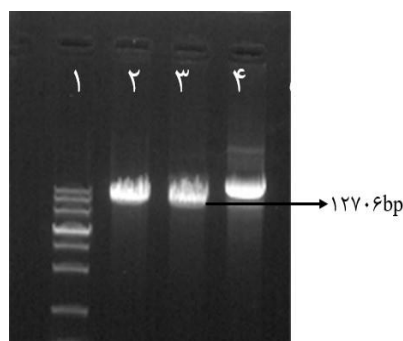
ردیف	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال
۱	F Real EPO-FH	5' TGAGCACTGTAGCCTGAACG 3'	۶۰ درجه سانتی‌گرا
۲	For Seq 3 (800)-HJ	5' GCAACTTCCTGAGGGGCAAG 3'	۶۰,۴ درجه سانتی‌گراد
۳	Rev Seq DPO	5' ACCTCAGTCCAGACACGG 3'	۵۸,۲ درجه سانتی‌گراد
۴	For Seq 4 (1472)-HJ	5' GAGGTTAAAAAACGTCTAGGCC 3'	۵۸ درجه سانتی‌گراد

۶۲٫۶	5'CGGGAATTCGTTTTAGTCTTTCTTCTCG 3'	R DHFR (EcoRI)	۵
درجه سانتی گراد			

آماده سازی ناقل نو ترکیب UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR جهت ترنسفکشن به لاین

سلولی CHO-DG44

استخراج ناقل UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit انجام شد و واکنش هضم آنزیمی برای خطی کردن ناقل نو ترکیب با آنزیم *IsceI* انجام و نتیجه بر روی ژل آگارز بررسی شد (شکل ۳-۱۴).



شکل ۳-۱۴- محصول استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی سازه ژنی UCOE-DPO-IRES-DHFR

ستون ۱: نشانگر مولکولی GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: ناقل نو ترکیب خطی شده UCOE-DPO-IRES-DHFR به وسیله برش آنزیمی با آنزیم *IsceI*

ستون ۳: ناقل نو ترکیب خطی شده UCOE-DPO-IRES-DHFR به وسیله برش آنزیمی با آنزیم *IsceI*

ستون ۴: محصول استخراج پلاسمید

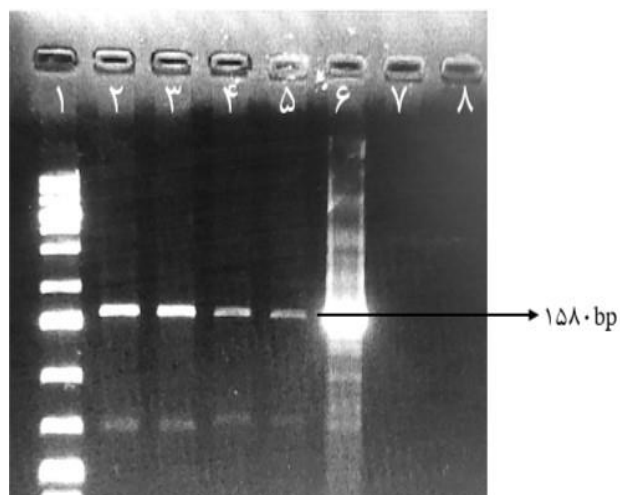
۳-۱-۳- تایید درج ناقل بیانی نو ترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha و UCOE-

CHO-DG44 در ژنوم رده‌ی سلولی Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

مشاهده باند مورد نظر در جایگاه صحیح و نیز عدم وجود این باند در محصول PCR با استفاده از DNA

استخراج شده از سلول‌های ترنسفکت نشده، درج سازه ژنی را در ژنوم سلول‌های CHO تایید می‌کند. نتایج حاصل

از PCR جهت تایید درج دو سازه نو ترکیب در ژنوم سلول‌های CHO-DG44 در شکل ۳-۱۵ آمده است.



شکل ۳-۱۵- نتایج حاصل از PCR جهت تأیید درج توالی سازه‌های ژنی pOptiVEC-DPO و UCOE-DPO-IRES-DHFR

ستون ۱: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲: محصول PCR با استفاده از DNAی استخراج شده از سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل pOptiVEC-DPO (Pool1)

ستون ۳: محصول PCR با استفاده از DNAی استخراج شده از سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل pOptiVEC-DPO (Pool2)

ستون ۴: محصول PCR با استفاده از DNAی استخراج شده از سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل UCOE-DPO-IRES-DHFR (Pool1)

ستون ۵: محصول PCR با استفاده از DNAی استخراج شده از سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل UCOE-DPO-IRES-DHFR (Pool2)

ستون ۶: محصول PCR بر روی پلاسمید نوترکیب UCOE-DPO-IRES-DHFR به عنوان کنترل مثبت

ستون ۷: محصول PCR با استفاده از DNAی استخراج شده از سلول‌های CHO ترنسفکت نشده

ستون ۸: کنترل منفی PCR

۳-۱-۴- بررسی بیان در سطح ترنسکرپت و پروتئین

بررسی میزان بیان ژن در سطح ترنسکرپت با استفاده از Real-time PCR

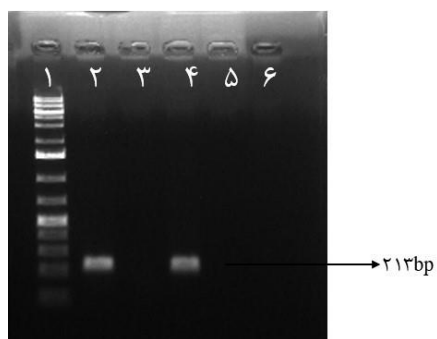
تایید صحت cDNA سنتز شده با استفاده از PCR

استخراج RNA از ۴ استخر سلولی به دست آمده با روش دستی انجام شد. غلظت RNA استخراج شده در جدول ۳-۳ آمده است.

جدول ۳-۳- غلظت RNA استخراج شده از سلول‌های ترنسفکت شده

ردیف	نام نمونه	غلظت (نانوگرم/میکرولیتتر)
۱	pOptiVEC-Darbepoetin alpha (Pool1)	۸۲۶
۲	pOptiVEC-Darbepoetin alpha (Pool2)	۸۸۹
۳	UCOE-Darbepoetin alpha-IRES- DHFR (Pool1)	۱۰۴۳
۴	UCOE-Darbepoetin alpha-IRES- DHFR (Pool2)	۵۰۷

پس از استخراج RNA روی تمام نمونه‌ها واکنش DNase Treatment انجام شد و پس از آن سنتز cDNA با کیت RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit انجام شد. برای بررسی دقیق‌تر cDNA استخراج شده جهت نداشتن آلودگی به DNA واکنش PCR با پرایمرهای F Real EPO و Rev Seq DPO گذاشته شد. (شکل ۳-۱۶ و ۳-۱۷)



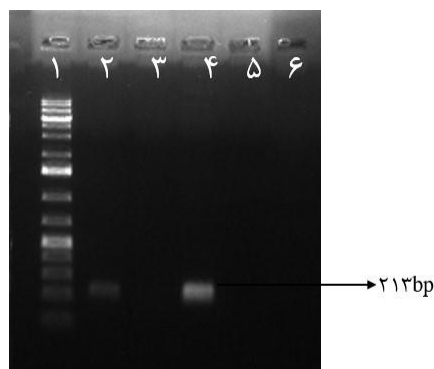
شکل ۳-۱۶- تأیید سنتز cDNA با استفاده از PCR

ستون ۱: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲ و ۴: محصول PCR روی نمونه‌های RT^{+} (UCOE-DPO Pool1 و UCOE- DPO-Pool2)

ستون ۳ و ۵: محصول PCR روی نمونه‌های RT^{-} (UCOE-DPO Pool1 و UCOE- DPO-Pool2)

ستون ۶: کنترل منفی



شکل ۳-۱۷ - تأیید سنتز cDNA با استفاده از PCR

ستون ۱: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ستون ۲ و ۴: محصول PCR روی نمونه‌های RT^{+} (pOptiVEC-DPO Pool2 و pOptiVEC-DPO Pool1)

ستون ۳ و ۵: محصول PCR روی نمونه‌های RT^{-} (pOptiVEC-DPO Pool2 و pOptiVEC-DPO Pool1)

حاصل از

نتایج

بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا در سلول‌های CHO-DG44 ترنسفکت شده توسط واکنش qPCR

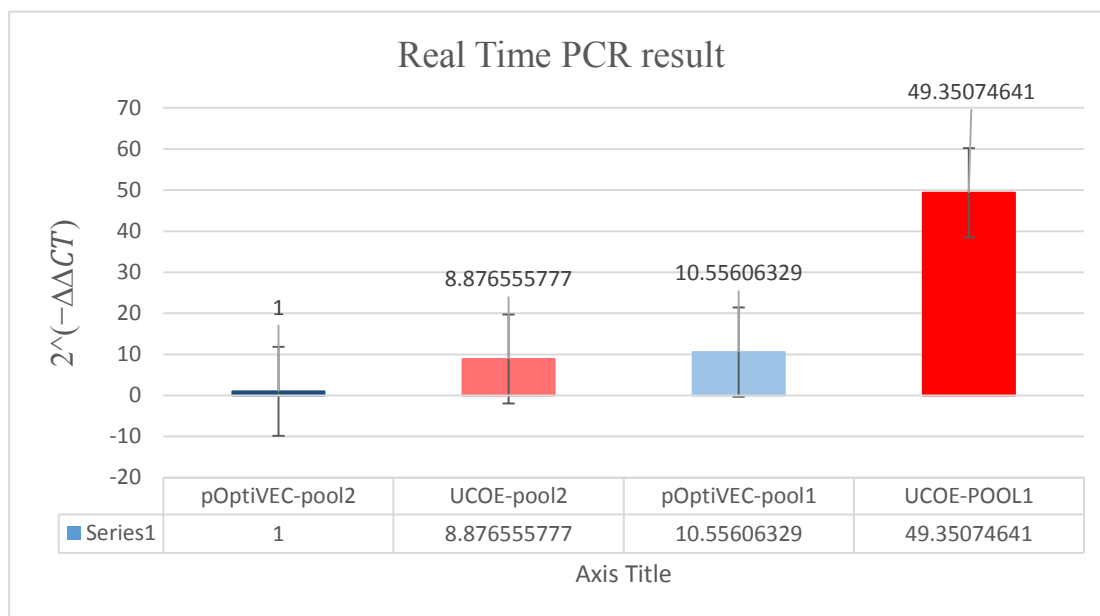
واکنش Real-time PCR با استفاده از cDNA بدست آمده گذاشته شد. آنالیز نتایج حاصل از qPCR

نشان می‌داد که بیان لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin alpha Pool2 از بین ۴ لاین به دست آمده پایین‌تر

می‌باشد و پس از آن بیان لاین‌های سلولی pOptiVEC-UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool2 و pOptiVEC-

Darbepoetin alpha Pool1 و UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool1 به ترتیب افزایش داشته

است. نتایج حاصل qPCR در نمودار ۳-۱ آمده است.



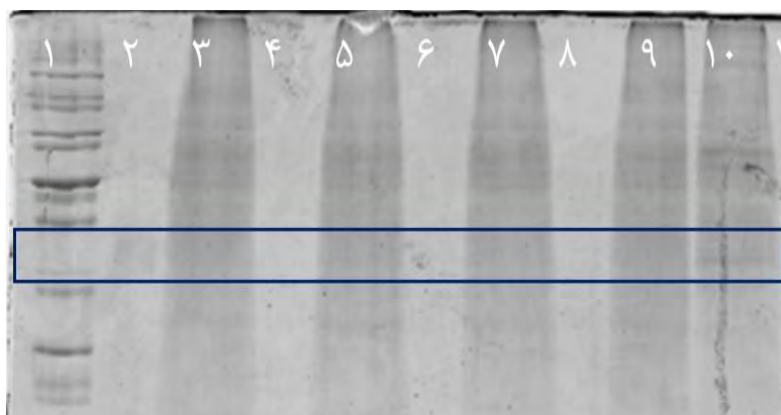
نمودار ۱-۳-نمودار میزان بیان mRNA ژن داربی پوئتین آلفا در سلول‌های CHO-DG44 ترنسفکت شده

بررسی پروتئین داربی پوئتین آلفا موجود در سوپرناتانت و رسوب سلولی با استفاده از روش

SDS-PAGE

پروتئین استخراج شده از سوپرناتانت و رسوب سلولی حاصل از سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل بیانی نوترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha و سلول‌های CHO ترنسفکت شده با ناقل بیانی نوترکیب UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR همراه با سلول‌های CHO-DG44 ترنسفکت نشده با این ناقل‌ها به عنوان کنترل منفی و داروی اریتروپوئتین با نام تجاری سیناپوئتین به عنوان کنترل مثبت بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شدند. برای تغلیظ پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت سلولی از فیلتر آمیکون استفاده شد. نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری گردید سپس با استفاده از کوماسی بلو رنگ‌آمیزی گردید. بعد از رنگ‌بری باندهای مورد نظر قابل مشاهده بودند. شدت رنگ و پهنای باندهای ظاهر شده بر روی ژل SDS-PAGE نشان دهنده این است که در هر ژل پروتئین‌های استخراجی بارگذاری شده دارای غلظتی مشابه با

یکدیگرند. تفکیک باندها از یکدیگر نشان دهنده عدم تخریب یا دناتوره شدن می‌باشد. پس نمونه‌های آماده شده با همین غلظت برای استفاده در مراحل بعد مناسب می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی پروتئین داربی‌پوئین آلفا موجود در سوپرناتانت و رسوب سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE در شکل‌های ۳-۱۸ و ۳-۱۹ آمده است.



شکل ۳-۱۸- بررسی پروتئین داربی‌پوئین آلفا موجود در سوپرناتانت سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE

ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (PageRuler Unstained Protein Ladder)

ستون ۲: کنترل مثبت داروی اریتروپوئین (سیناپوئین)

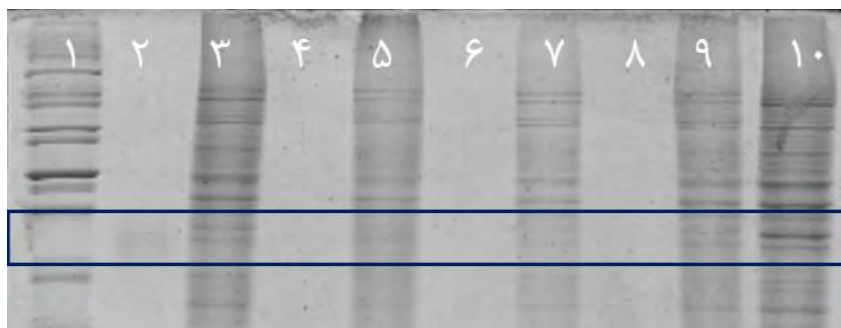
ستون ۳: سوپرناتانت لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin Pool1

ستون ۵: سوپرناتانت لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin pool2

ستون ۷: سوپرناتانت لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool1

ستون ۹: سوپرناتانت لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

ستون ۱۰: سوپرناتانت لاین سلولی CHO-DG44 ترنسفکت نشده



شکل ۳-۱۹- بررسی پروتئین دارویی پوئتین آلفا موجود در رسوب سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE

ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (PageRuler Unstained Protein Ladder)

ستون ۲: کنترل مثبت داروی اریتروپوئتین (سیناپوئتین)

ستون ۳: رسوب سلولی لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin Pool1

ستون ۵: رسوب سلولی لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin pool2

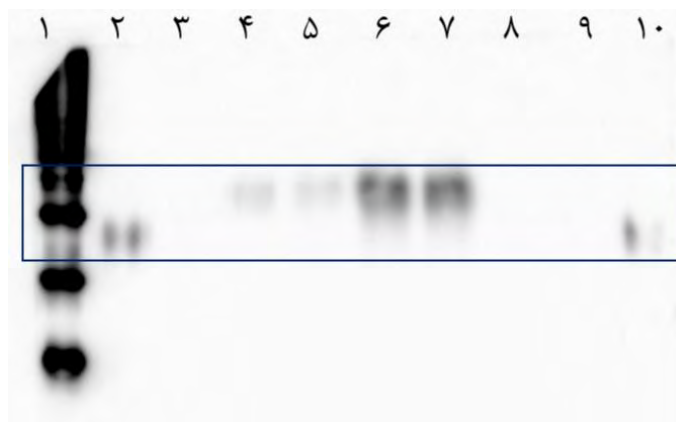
ستون ۷: رسوب سلولی لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool1

ستون ۹: رسوب سلولی لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR

ستون ۱۰: رسوب سلولی لاین سلولی CHO-DG44 ترنسفکت نشده

بررسی بیان پروتئین داربی پوئین آلفا با استفاده از تکنیک وسترن بلائینگ

میزان ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد بارگذاری گردید، پس از آن باندهای موجود در ژل به کاغذ PVDF انتقال یافت. آنتی‌بادی مونوکلونال 4297-4955 به عنوان آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی پلی‌کلونال A0545 به عنوان آنتی‌بادی ثانویه برای شناسایی داربی پوئین آلفا مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه GelDoc تصویر آن گرفته شد. وزن مولکولی داربی پوئین آلفا در ناحیه ۴۵-۳۵ کیلو دالتون گزارش شده است. که در اینجا باندها در محل مورد نظر مشاهده گردید. عدم مشاهده باند مربوطه در نمونه پروتئین کنترل منفی و هم‌راستایی باند مورد نظر با باند نمونه پروتئین کنترل و داروی اریتروپوئین (کنترل مثبت) تصدیق کننده این می‌باشد که باند مورد نظر مربوط به داربی پوئین آلفا می‌باشد. بنابراین از بیان داربی پوئین آلفا و ترشح آن توسط سلول‌های CHO اطمینان حاصل گردید. نتایج حاصل از بررسی بیان پروتئین داربی پوئین آلفا در سوپرناتانت و رسوب سلولی، با استفاده از تکنیک وسترن بلائینگ در شکل ۳-۲۲ و ۳-۲۳ آمده است.



شکل ۳-۲۰- نتایج حاصل از بررسی بیان پروتئین داربی پوئتین آلفا در سوپرناتانت سلولی با استفاده از روش وسترن بلاتینگ

ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (MagicMark™XP Western Protein Standard)

ستون ۲: کنترل مثبت (داروی سیناپوئتین)

ستون ۴: سوپرناتانت لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin Pool1

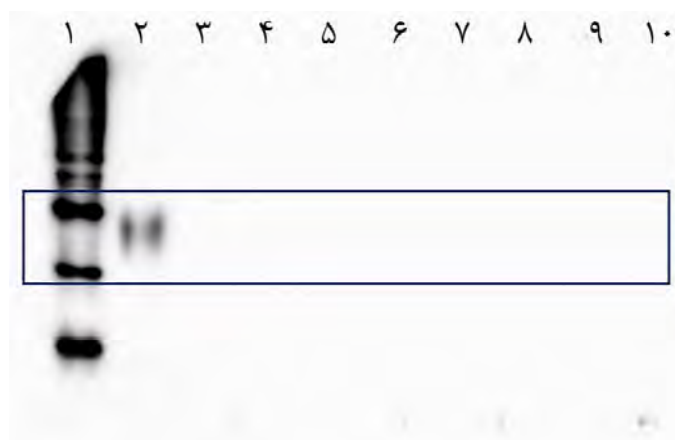
ستون ۵: سوپرناتانت لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin Pool2

ستون ۶: سوپرناتانت لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool1

ستون ۷: سوپرناتانت لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool2

ستون ۸: کنترل منفی (سوپرناتانت سلول CHO-DG44 ترنسفکت نشده)

ستون ۱۰: کنترل مثبت (داروی پی دی پوئتین)



شکل ۳-۲۱- نتایج حاصل از بررسی بیان پروتئین داربی پوئتین آلفا در رسوب سلولی با استفاده از روش وسترن بلاتینگ

ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئین (MagicMark™XP Western Protein Standard)

ستون ۲: کنترل مثبت (داروی سیناپوئتین)

ستون ۴: رسوب لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin Pool1

ستون ۶: رسوب لاین سلولی pOptiVEC-Darbepoetin Pool2

ستون ۷: کنترل منفی (سوپرناتانت سلول CHO-DG44 ترنسفکت نشده)

ستون ۸: رسوب لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool2

ستون ۱۰: رسوب لاین سلولی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR Pool1

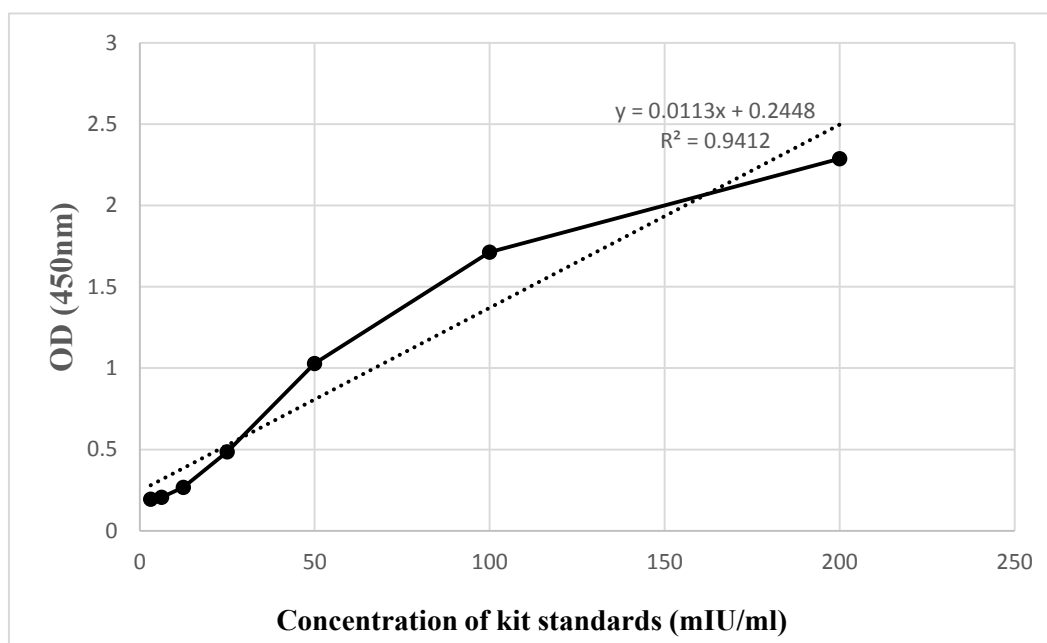
بررسی میزان بیان پروتئین داربی پوئتین آلفا تولید شده با استفاده از تکنیک الایزا

به منظور بررسی بیان پروتئین داربی پوئتین آلفا پس از رقیق سازی نمونه‌های سوپرناتانت و رسوب سلولی خوانش آن‌ها در جذب ۴۵۰ نانومتر به دست آمد. منحنی استاندارد این خوانش با استفاده از جذب‌های خوانش شده نمونه‌های استاندارد (جدول ۳-۴) به دست آمد (نمودار ۳-۴).

جدول ۳-۴- جذب‌هاب خوانش شده برای نمونه‌های استاندارد

ردیف	غلظت استاندارد (mIU/ml)	تکرار اول	تکرار دوم	میانگین
۱	۲۰۰	۲,۲۹۵	۲,۲۸۱	۲,۲۸۸
۲	۱۰۰	۱,۵۷۷	۱,۸۴۸	۱,۷۱۲۵

۱,۰۲۹	۱,۰۲۴	۱,۰۳۴	۵۰	۳
۰,۴۸۵۵	۰,۴۷۸	۰,۴۹۳	۲۵	۴
۰,۲۶۷	۰,۳۰۷	۰,۲۲۷	۱۲,۵	۵
۰,۲۰۶۵	۰,۲۱	۰,۲۰۳	۶,۲۵	۶
۰,۱۹۴	۰,۱۸۸	۰,۲	۳,۱۳	۷



نمودار ۳-۱- منحنی استاندارد رسم شده از خوانش جذب **نمونه‌های** استاندارد کیت الایزا

غلظت داربی پوئتین آلفا در همه نمونه‌های پروتئینی (پروتئین حاصل از رده‌های سلولی مورد مطالعه، کنترل

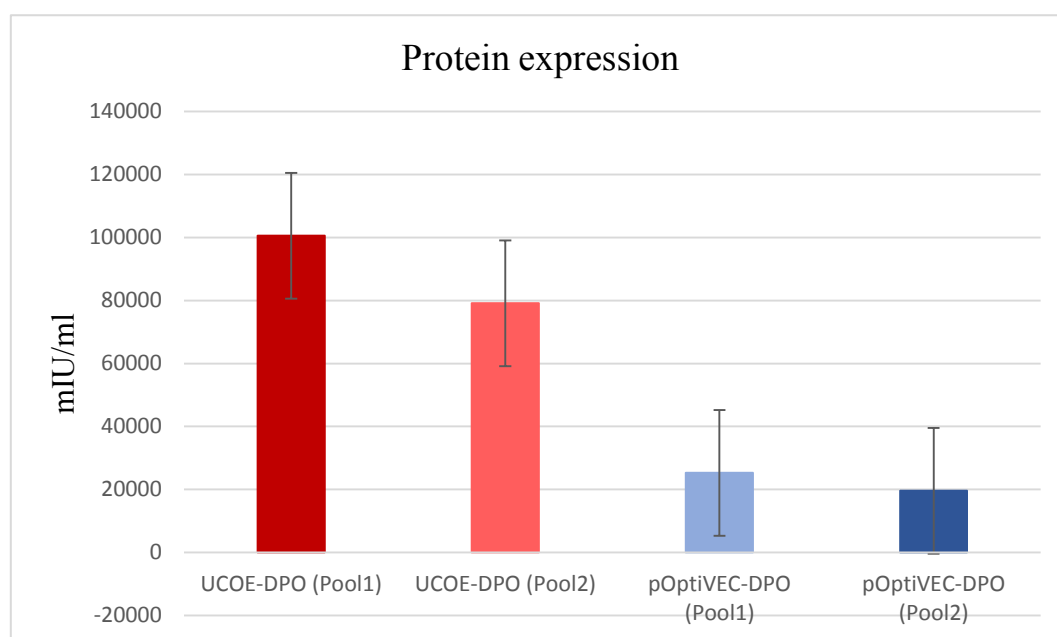
منفی) موجود در گروه سوپرناتانت و رسوب سلولی با توجه به معادله خط به دست آمده ($Y=0.0113x + 0.2448$)

از نمودار رسم شده شماره ۳-۴ محاسبه گردید. غلظت پروتئین به دست آمده از نمونه سوپرناتانت سلولی حاوی سازه نوترکیب UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR بسیار بالاتر از رده سلولی حاوی سازه نوترکیب pOptiVEC-Darbepoetin alpha است. غلظت داربی پوئتین آلفا در رسوب تمام رده‌های سلولی به دست آمده برابر با صفر است. نتایج بررسی میزان پروتئین داربی پوئتین آلفا موجود در سوپرناتانت سلولی، کنترل منفی و کنترل مثبت (داروی اریتروپوئتین) در جدول ۳-۵ و نمودار ۳-۵ آمده است.

جدول ۳-۵- میزان پروتئین داربی پوئتین آلفا در سوپرناتانت سلولی

ردیف	نام نمونه	میانگین جذب	میزان بیان پروتئین (mIU/ml)
۱	سوپرناتانت سلولی رده CHO-DG44 ترنسفکت شده با ناقل بیانی pOptiVEC-Darbepoetin alpha (Pool1)	۰,۸۱۶۵	۲۵۲۹۶
۲	سوپرناتانت سلولی رده CHO-DG44 ترنسفکت شده با ناقل بیانی pOptiVEC-Darbepoetin alpha (Pool2)	۰,۶۸۸	۱۹۶۱۰
۳	سوپرناتانت سلولی رده CHO-DG44 ترنسفکت شده با ناقل بیانی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR (Pool1)	۱,۳۸۱	۱۰۰۵۴۸

۷۹۱۳۲	۱,۱۳۹	سوپرناتانت سلولی رده CHO-DG44 ترنسفکت شده با ناقل بیانی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR (Pool2)	۴
۰	۰,۱۳۴۵	سوپرناتانت سلولی رده CHO-DG44	۵



نمودار ۳-۲- نمودار میزان بیان پروتئین داربی پوئتین آلفا در رده‌های سلولی به دست آمده

نتایج به دست آمده حاکی از آن است در بین چهار رده سلولی، کمترین میزان بیان داربی پوئتین آلفا مربوط به استخر دوم سلولی ترنسفکت شده با ناقل بیانی pOptiVEC-Darbepoetin alpha و بیشترین بیان این پروتئین با ۵ برابر افزایش مربوط به استخر اول سلولی ترنسفکت شده با ناقل بیانی UCOE-Darbepoetin alpha-IRES-DHFR است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (ANOVA) اختلاف معنی دار ($P\text{-value} < 0.05$) بین میزان تولید داربی-پوئتین آلفا در رده سلولی UCOE-Drbepoetin alpha-IRES-DHFR و رده سلولی pOptiVEC-Darbepoetin alpha را نشان می‌دهد. نتایج بررسی واریانس ANOVA در جدول ۳-۶ آمده است. باتوجه به نتایج این جدول اختلاف معنی‌دار بین کمترین و بیشترین رده سلولی بیان کننده پروتئین داربی‌پوئتین آلفا دیده می‌شود که تأیید کننده تأثیرگذاری قطعه UCOE در افزایش بیان ژن درج شده توسط این ناقل در رده سلولی CHO-DG44 می‌باشد. بین دو استخر سلولی ترنسفکت شده با ناقل بیانی UCOE-DPO نیز اختلاف معنی‌دار وجود دارد که نشان دهنده تفاوت در ترنسفکته‌ها و بیان بالاتر استخر سلولی شماره یک از این رده سلولی است. اما اختلاف معنی‌داری در بیان پروتئین داربی‌پوئتین آلفا در دو استخر سلولی ترنسفکت شده با ناقل بیانی pOptiVEC-DPO دیده نشد.

جدول ۳-۶- آنالیز نتایج الیزا در رده‌های سلولی به دست آمده توسط نرم‌افزار ایکسل و با استفاده از روش ANOVA، اختلاف کمتر از ۰,۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

ردیف	گروه‌های مقایسه شده	<i>P-value</i>	اختلاف
۱	رده سلولی UCOE-DPO (Pool1) با رده سلولی pOptiVEC-DPO (Pool2)	۰,۰۰۲۲	معنی‌دار
۲	رده سلولی UCOE-DPO (Pool1) با رده سلولی pOptiVEC-DPO (Pool1)	۰,۰۰۳۲	معنی‌دار
۳	رده سلولی UCOE-DPO (Pool2) با رده سلولی pOptiVEC-DPO (Pool1)	۰,۰۰۱۷	معنی‌دار
۴	رده سلولی UCOE-DPO (Pool2) با رده سلولی pOptiVEC-DPO (Pool2)	۰,۰۰۰۴	معنی‌دار
۵	رده سلولی UCOE-DPO (Pool1) با رده سلولی UCOE-DPO (Pool2)	۰,۰۳۵	معنی‌دار
۶	رده سلولی pOptiVEC-DPO (Pool1) با رده سلولی pOptiVEC-DPO (Pool2)	۰,۲۳۰	بی‌معنی

۳-۲- نتایج حاصل از ساخت سازه‌های ژنی دارای ژن گزارشگر EGFP، انتقال سازه‌ها به داخل سلول، غربالگری سلول‌های دارای بیان بالای ژن داربی‌پوئین آلفا با استفاده از FACS و بررسی بیان ژن

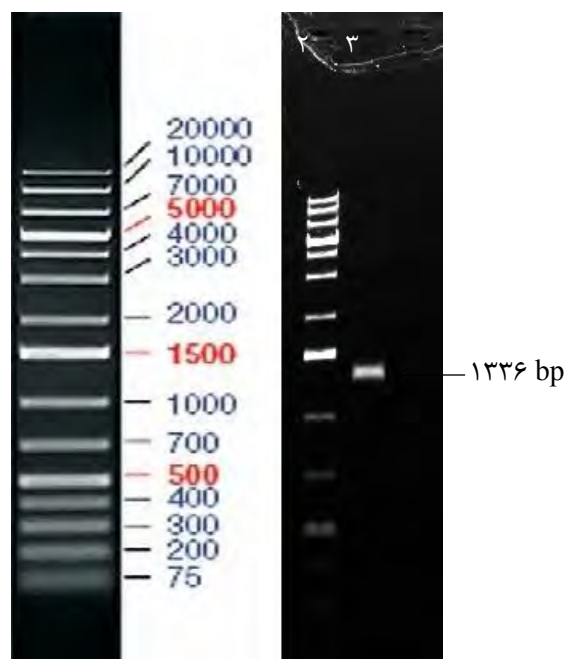
۳-۲-۱- مراحل کلونینگ ژن داربی‌پوئین آلفا به همراه توالی‌های LoxP و EGFP در وکتور pOptiVEC

نتایج حاصل به منظور آماده‌سازی وکتور pKO-DTA-LIGL

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP

به منظور تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP با طول ۱۳۳۶ bp، واکنش PCR بر روی وکتور pIRES2-EGFP

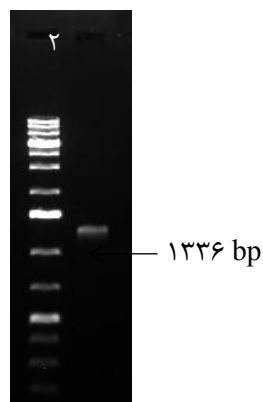
انجام شد. نتیجه‌ی حاصل پس از بارگذاری محصول این واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد به صورت زیر بود.



شکل ۳-۲۲- محصول واکنش PCR تکثیر قطعه‌ی IRES-EGFP. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش PCR (قطعه‌ی IRES-EGFP). (۳) Blank.

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی قطعه‌ی IRES-EGFP از ژل آگارز

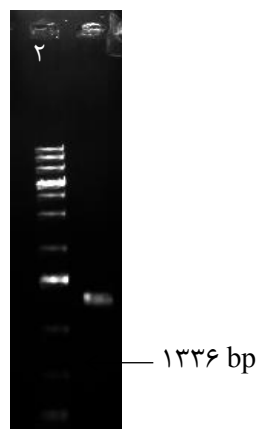
به منظور حذف باندهای غیراختصاصی تشکیل شده در واکنش PCR انجام شده بر روی وکتور pIRES2-EGFP و دستیابی به قطعه‌ی IRES-EGFP خالص با طول ۱۳۳۶ bp، این باند از ژل آگارز تخلیص و نمونه بر روی ژل آگارز ۱٪ لود گردید. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۲- قطعه‌ی IRES-EGFP خالص شده از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) قطعه‌ی IRES-EGFP تخلیص شده از ژل.

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی قطعه‌ی IRES-EGFP هضم‌شده با آنزیم *XbaI* و *NheI*

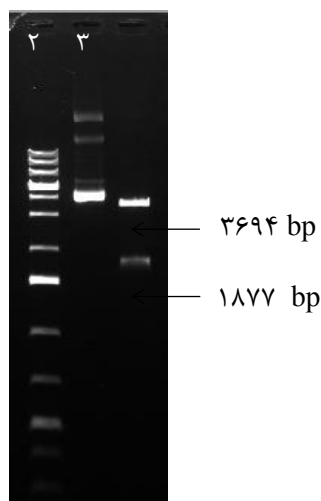
پس از خالص‌سازی قطعه‌ی IRES-EGFP از ژل آگارز، هضم آنزیمی این توالی با استفاده از دو آنزیم *NheI* و *XbaI* صورت گرفت. سپس به منظور حذف بافر و آنزیم استفاده شده در این واکنش، قطعه‌ی هضم‌شده خالص‌سازی شد. در نهایت جهت بررسی کیفیت قطعه‌ی تخلیص‌شده، نمونه بر روی ژل آگارز بارگذاری گردید. نتیجه‌ی حاصل، به صورت زیر بود.



شکل ۳-۲۴- محصول واکنش هضم آنزیمی انجام شده بر روی قطعه‌ی IRES-EGFP تخلیص شده از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) قطعه‌ی IRES-EGFP هضم شده طی واکنش هضم آنزیمی.

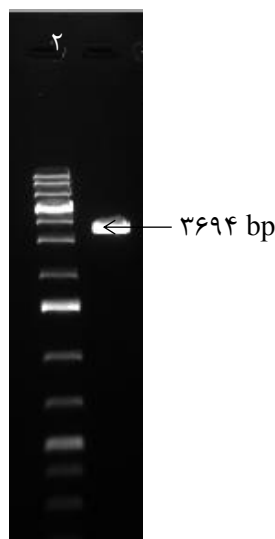
نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LoxP

به منظور همسانه‌سازی قطعه‌ی IRES-EGFP مابین دو قطعه‌ی LoxP در وکتور pKO-DTA-LoxP، واکنش هضم آنزیمی بر روی این وکتور نیز با دو آنزیم *NheI* و *XbaI* صورت گرفت. نتیجه‌ی حاصل از این واکنش، خروج یک قطعه‌ی ۱۸۷۷ bp و ساختار اصلی وکتور با طول ۳۶۹۴ bp بود.



شکل ۳-۲۵- محصول واکنش هضم آنزیمی انجام شده بر روی وکتور pKO-DTA-LoxP. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور pKO-DTA-LoxP (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LoxP.

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی وکتور pKO-DTA-LoxP هضم‌شده با آنزیم *NheI* و *XbaI* از ژل آگارز با توجه به اینکه قطعه‌ی خارج شده از وکتور pKO-DTA-LoxP دارای سایز ۱۸۷۶ bp بود، پس از واکنش هضم آنزیمی ساختار اصلی وکتور با طول ۳۶۹۴ bp از ژل آگارز تخلیص گردید. سپس به منظور بررسی کیفیت قطعه‌ی تخلیص شده، نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد.

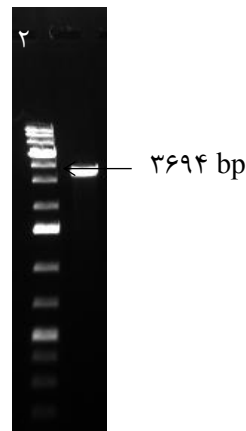


شکل ۳-۲۶- وکتور pKO-DTA-LoxP تخلیص شده از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور pKO-DTA-LoxP تخلیص شده از ژل آگارز.

نتیجه‌ی بدست آمده از خالص‌سازی محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور pKO-DTA-LoxP خطی- شده

دو آنزیم *NheI* و *XbaI* پس از برش، انتهای چسبنده‌ی مشابهی ایجاد می‌کنند. با توجه به این ویژگی، جهت جلوگیری از اتصال دو سر وکتور حین واکنش الحاق، واکنش دفسفریلاسیون بر روی وکتور pKO-DTA-

LoxP هضم شده و تخلیص شده از ژل آگارز صورت گرفت. در نهایت به منظور حذف بافر و آنزیم استفاده شده در این واکنش، خالص سازی این قطعه انجام گردید. سپس جهت بررسی کیفیت، نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود گردید. نتیجه ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۲۷- محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور **pKO-DTA-LoxP**. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور **pKO-DTA-LoxP**

نتایج حاصل به منظور تهیه باکتری حاوی وکتور **pKO-DTA-LIGL**

در این بخش به نتایج بدست آمده به منظور تهیه باکتری *E. coli* حاوی وکتور **pKO-DTA-LIGL** می-

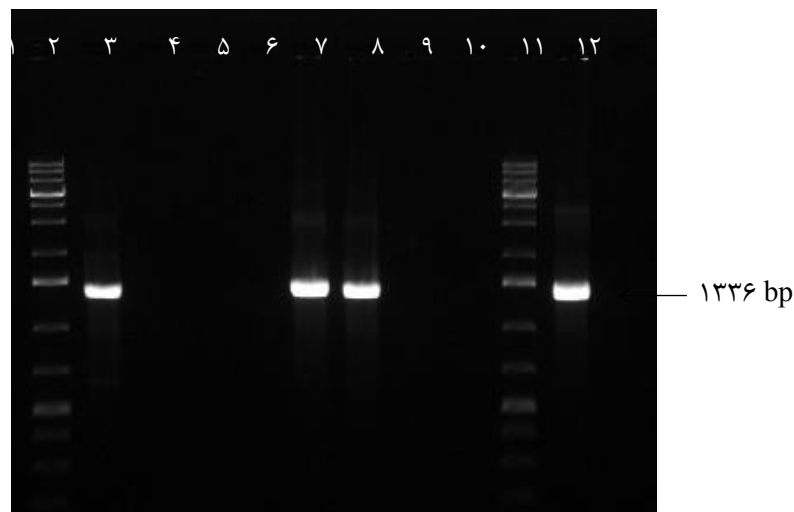
پردازیم.

۳-۲-۱- نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL

در باکتری

به منظور تایید کلونی‌های رشد یافته بر روی پلیت، واکنش Colony PCR با دو پرایمری که قطعه‌ی IRES-

EGFP با آن تکثیر یافت، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



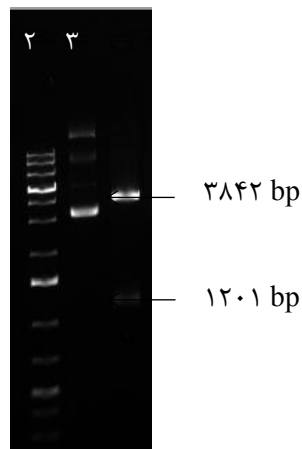
شکل ۳-۲۸- محصول واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲-۹) به ترتیب محصول Colony PCR کلون‌های ۱ تا ۸. (۱۰) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۱۱) کنترل مثبت. (۱۲) Blank.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری

پس از انجام واکنش Colony PCR، با استفاده از آنزیم *HindIII* بر روی یکی از پلاسمیدهای استخراج

شده از کلون‌های مثبت، واکنش هضم آنزیمی انجام شد. این آنزیم دارای یک جایگاه شناسایی بر روی قطعه‌ی

IRES و یک محل برش بر روی ساختار اصلی وکتور pKO-DTA-LoxP می‌باشد. در صورت خروج قطعات bp ۳۸۴۲ و ۱۲۰۱، صحت توالی درج شده تایید می‌گردد. نتیجه‌ی بدست آمده از این واکنش به صورت زیر بود.



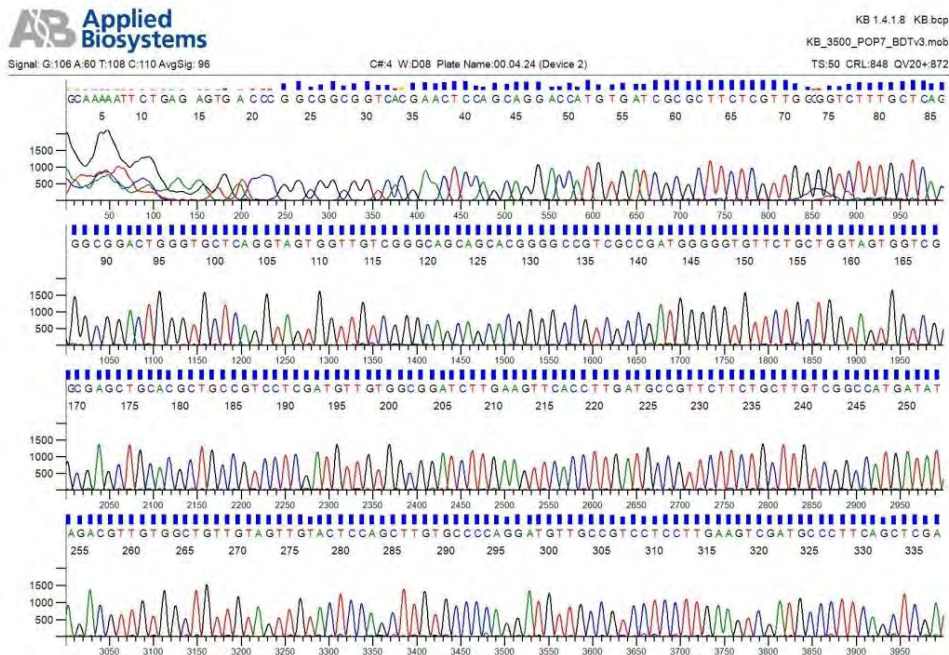
شکل ۳-۲۹- محصول واکنش هضم آنزیمی جهت تایید حضور وکتور pKO-DTA-LIGL در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) کلون ۱ وکتور pKO-DTA-LIGL. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۱ وکتور pKO-DTA-LIGL.

نتایج بدست آمده از تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور pKO-DTA-LIGL

تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور pKO-DTA-LIGL به منظور عاری بودن آن از جهش بررسی و تایید گردید. بخشی از نتایج بدست آمده در شکل‌های زیر نشان داده شده است.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1557 bits(843)	0.0	933/970(96%)	32/970(3%)	Plus/Plus
Query 18	CTCTCTCTCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGT	77		
Sbjct 39	CTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGT	98		
Query 78	TTGTCTATATGTTATTTTCACCATATTGCCGCTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAAC	137		
Sbjct 99	TTGTCTATATGTTATTTTCACCATATTGCCGCTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCCGAAAC	158		
Query 138	CTGGCCCTGTCTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGC	197		
Sbjct 159	CTGGCCCTGTCTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGC	218		
Query 198	AAGGTCGTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTCTTTGAAGACAAACAA	257		
Sbjct 219	AAGGTCGTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTCTTTGAAGACAAACAA	278		
Query 258	CGTCTGTAGCGACCCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCCTCTGCG	317		
Sbjct 279	CGTCTGTAGCGACCCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCCTCTGCG	338		
Query 318	GCCAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAGGGCGGCACAACCCCAAGTCCACGTTG	377		
Sbjct 339	GCCAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAGGGCGGCACAACCCCAAGTCCACGTTG	398		
Query 378	TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGC	437		
Sbjct 399	TGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGC	458		
Query 438	TGAAGGATGCCCGAAGAGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCTCGGTGCACAT	497		
Sbjct 459	TGAAGGATGCCCGAAGAGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCTCGGTGCACAT	518		
Query 498	GCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTGAGGCGCTCTAGGGCCCCCGAACACGGGGACG	557		
Sbjct 519	GCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGCTCTAGGGCCCCCGAACACGGGGACG	578		
Query 558	TGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGTGAGCAAGGGCGAG	617		
Sbjct 579	TGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCATGGTGAGCAAGGGCGAG	638		
Query 618	GAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCTTGGTCGAGCTGGACGGCGAGCTAAACGGCCAC	677		
Sbjct 639	GAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCTTGGTCGAGCTGGACGGCGAGCTAAACGGCCAC	698		
Query 678	AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAG	737		
Sbjct 699	AAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAG	758		
Query 738	TTCAATCTGCACACCGGGCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCCCACCTCTGTGACCAACCTG	797		
Sbjct 759	TTT-ATCTGCACACC-GGCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCCCACCTCTG-TGACCAACCTG	815		
Query 798	ACCTACGGCGGTTGCAAGTGTCTTACAACCGCTACCCCCGACCACATGAAAGCAGACG	857		
Sbjct 816	ACCTACGGCG-T-GCA-GT-GCTT-CAGCC-GCTACCCC-GACCACATG-AAGCAGCACG	867		
Query 858	ACTTCTTTCAAAGTCGCCCATGCCCGAAAGGCTACGTCCCAAGGAGCGGCACCCATTCTT	917		
Sbjct 868	ACTTCTT-CAA-GTCCGCC-ATGCCCGAA-GGCTACGTCC-AGGAGCG-CACC-AT-CTT	919		
Query 918	TCTTTCAAAGGACGACGGGCAAACTAAACAAGACCCCGCGCCCGAAGTTGAAAGTCCGAA	977		
Sbjct 920	-CTT-CAA-GGACGACG-CAA-CTA-CAAGACCC-GCGCC-GAGGT-GAA-GTTC-GA-	967		
Query 978	GGGGCGACAC 987			
Sbjct 988	GGG-CGACAC 976			

شکل ۳-۳۰- بخشی از نتایج تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور pKO-DTA-LIGL و همترازی آن با توالی مرجع.

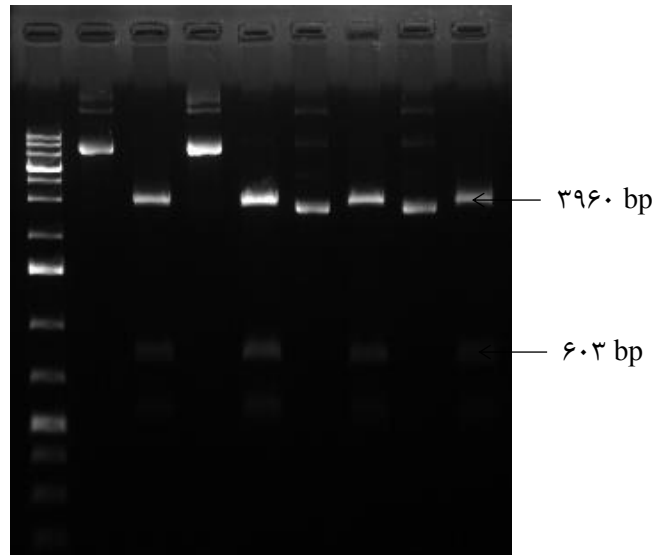


شکل ۳-۳۱- بخشی از نمودار تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور pKO-DTA-LIGL

نتایج حاصل به منظور آماده‌سازی وکتور pKO-DLIGL

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 دارای توالی ژن داربی پوئتین آلفا

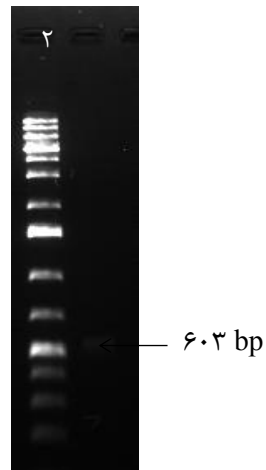
در طراحی مولکولی انجام شده در این پژوهش به منظور همسانه‌سازی قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا در وکتور pKO-DTA-LoxP، دو آنزیم *SacI* و *XhoI* در نظر گرفته شد. دو سمت قطعه‌ی داربی پوئتین آلفا در وکتور pUC57، جایگاه شناسایی آنزیم‌های ذکر شده قرار دارد. به همین منظور جهت خروج این قطعه با طول ۶۰۳ bp از ساختار اصلی وکتور با سایز ۳۹۶۰ bp، واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم *SacI* و *XhoI* بر روی وکتور pUC57 گذاشته شد. نتیجه‌ی حاصل از این واکنش به صورت زیر بود.



شکل ۳-۳۲- محصول واکنش هضم آنزیمی انجام شده بر روی وکتور pUC57. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) کلون ۱ وکتور pUC57. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۱ وکتور pUC57. (۴) کلون ۲ وکتور pUC57. (۵) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۲ وکتور pUC57. (۶) کلون ۳ وکتور pUC57. (۷) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۳ وکتور pUC57. (۸) کلون ۴ وکتور pUC57. (۹) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۴ وکتور pUC57.

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی قطعه‌ی داربی‌پوئتین آلفا هضم‌شده با آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* از ژل آگارز

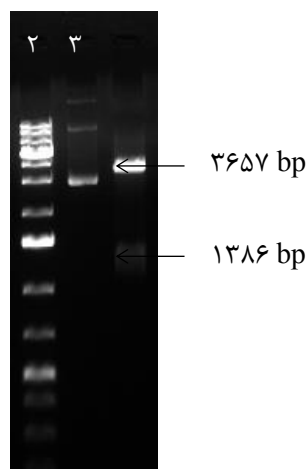
پس از انجام واکنش هضم آنزیمی، به منظور حذف ساختار اصلی وکتور pUC57 و دستیابی به قطعه‌ی داربی‌پوئتین آلفا، این توالی با طول ۶۰۳ bp از ژل آگارز تخلیص گردید. سپس نمونه جهت بررسی کیفیت بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۳- تخلیص محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pUC57 از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) قطعه‌ی داری پوئتین تخلیص شده از ژل آگارز.

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DTA-LIGL

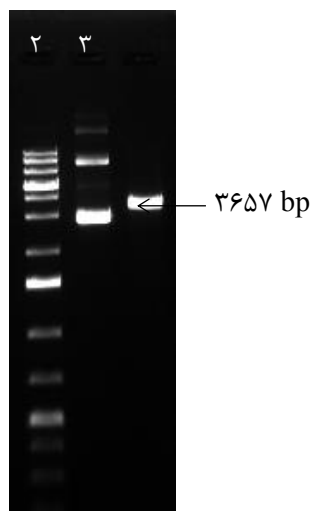
به منظور همسانه‌سازی قطعه‌ی داری پوئتین آلفا در وکتور pKO-DTA-LIGL، واکنش هضم آنزیمی با دو آنزیم *SacI* و *XhoI* بر روی این ناقل انجام گرفت. محصول این واکنش خروج یک قطعه‌ی ۱۳۸۶ bp و ساختار اصلی وکتور با طول ۳۶۵۷ bp بود.



شکل ۳-۳- محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور **pKO-DTA-LIGL** (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور **pKO-DTA-LIGL** (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور **pKO-DTA-LIGL**

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی وکتور **pKO-DTA-LIGL** هضم‌شده با آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* از ژل آگارز

با توجه به اینکه پس از واکنش هضم آنزیمی، قطعه‌ی خارج شده ۱۳۸۶ bp بود، به همین منظور ساختار اصلی وکتور با طول ۳۶۵۷ bp، از ژل آگارز تخلیص گردید. سپس جهت بررسی کیفیت، نمونه بر روی ژل آگارز لود گردید. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



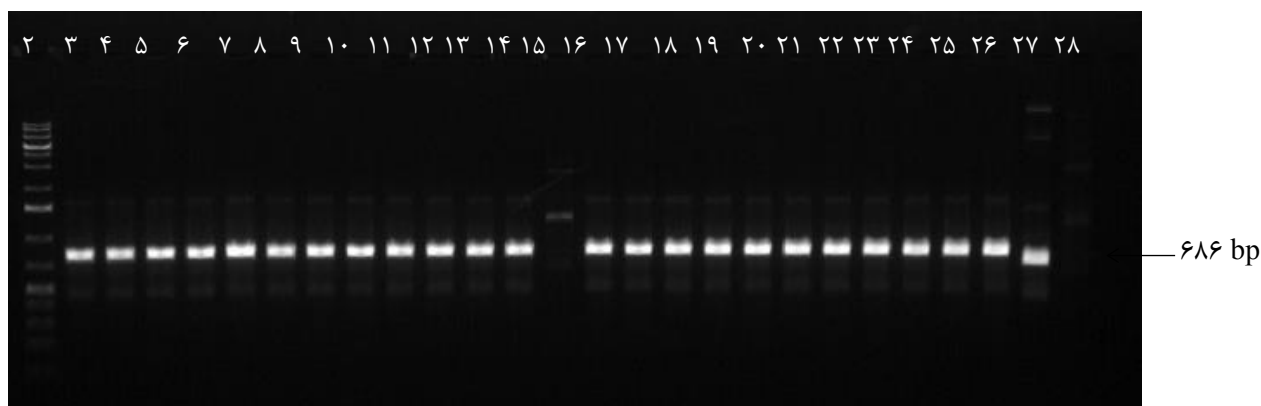
شکل ۳-۳۵- تخلیص محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO- DTA- LIGL از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) وکتور pKO- DTA- LIGL. (۳) وکتور pKO- DTA- LIGL تخلیص شده از ژل آگارز

نتایج حاصل به منظور تهیه‌ی باکتری حاوی وکتور pKO-DLIGL

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری

به منظور تایید کلونی‌های رشد یافته بر روی پلیت، واکنش Colony PCR با دو پرایمر F Aranesp و R

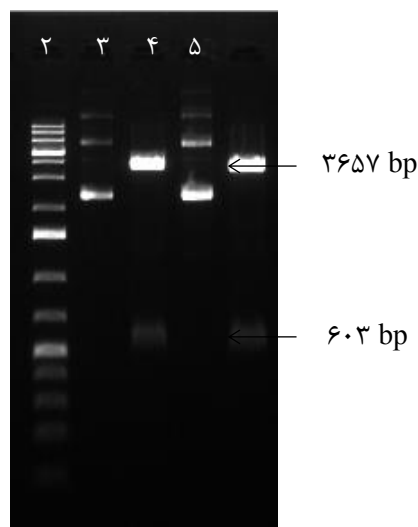
Seq On pOptiVEC که قطعه‌ی ۶۸۶ bp را تکثیر می‌کنند، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۳۶- محصول واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲-۲۵) محصول واکنش Colony PCR کلون‌های ۱ تا ۲۴. (۲۶) کنترل مثبت. (۲۷) کنترل منفی. (۲۸) Blank.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری

پس از انجام واکنش Colony PCR، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های مثبت، انجام شد. باتوجه به اینکه از این دو آنزیم به منظور همسانه‌سازی ژن داربی پوئتین آلفا در وکتور pKO-DTA-LIGL استفاده شد، در صورت خروج قطعات ۳۶۵۷ bp و ۶۰۳ bp که به ترتیب معرف ساختار اصلی وکتور و توالی ژن داربی پوئتین آلفا می‌باشند، صحت توالی درج شده تایید می‌گردد. نتیجه‌ی بدست آمده از این واکنش به صورت زیر بود.

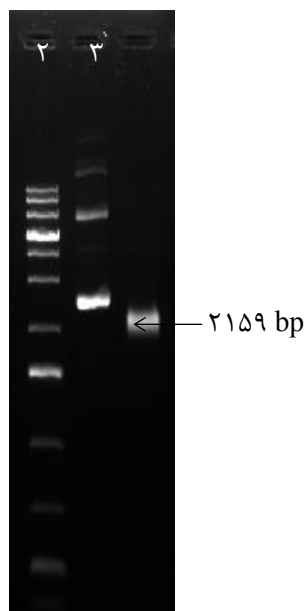


شکل ۳-۳۷- محصول واکنش هضم آنزیمی جهت تایید حضور وکتور pKO-DLIGL در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) کلون ۱ وکتور pKO-DLIGL. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۱ وکتور pKO-DLIGL. (۴) کلون ۲ وکتور pKO-DLIGL. (۵) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۲ وکتور pKO-DLIGL.

نتایج حاصل به منظور آماده سازی وکتور pOptiVEC-DLIGL

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL

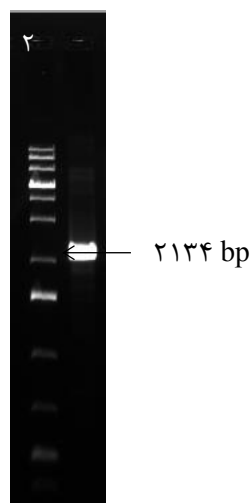
دو آنزیم *EagI* و *SacI* بر روی وکتور pKO-DLIGL در دو طرف قطعه‌ی DLIGL، دارای جایگاه شناسایی می‌باشند. باتوجه به اینکه از این وکتور به عنوان الگوی واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DLIGL استفاده می‌گردد، به منظور حذف باندهای غیراختصاصی، ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی این وکتور صورت گرفت. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۳۸- محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL جهت حذف باندهای غیراختصاصی. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور pKO-DLIGL (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DLIGL

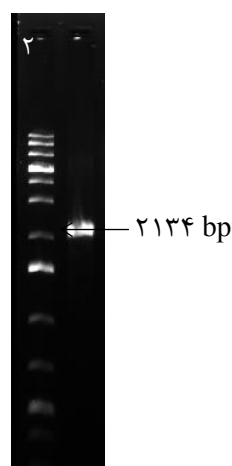
نتیجه‌ی واکنش PCR بر روی محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pKO-DLIGL، به منظور تکثیر قطعه‌ی DLIGL با طول ۲۱۳۴ bp به صورت زیر بود.



شکل ۳-۳۹- محصول واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DLIGL. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) قطعه‌ی DLIGL تکثیر شده با واکنش PCR.

نتیجه‌ی بدست آمده از خالص‌سازی محصول واکنش PCR قطعه‌ی DLIGL

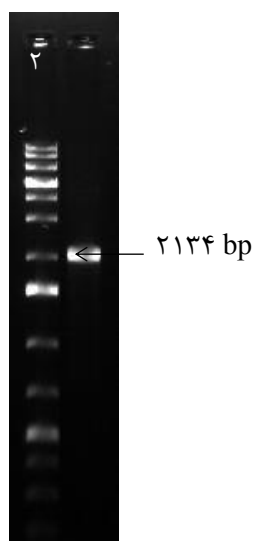
پس از تکثیر قطعه‌ی DLIGL با طول 2134 bp با استفاده از واکنش PCR، خالص‌سازی این محصول انجام گرفت. سپس جهت بررسی کیفیت، نمونه بر روی ژل آگارز لود گردید. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۴۰- محصول خالص‌سازی شده واکنش PCR قطعه‌ی DLIGL. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) قطعه‌ی DLIGL تخلیص شده.

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی قطعه‌ی DLIGL هضم‌شده با آنزیم *EcoRV*

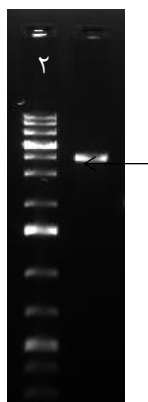
به منظور حذف آنزیم و بافر استفاده شده در واکنش هضم آنزیمی قطعه‌ی DLIGL با استفاده از آنزیم *EcoRV*، خالص‌سازی انجام شد. سپس جهت بررسی کیفیت، نمونه بر روی ژل آگارز لود گردید. نتیجه به صورت زیر بود.



شکل ۳-۴۱- قطعه‌ی DLIGL خالص‌سازی شده. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول خالص‌سازی شده واکنش هضم آنزیمی قطعه‌ی DLIGL.

خالص‌سازی وکتور pOptiVEC خطی‌شده با آنزیم *EcoRV*

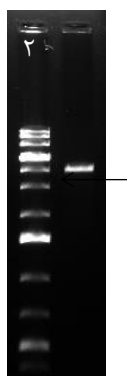
پس از انجام واکنش هضم با استفاده از آنزیم *EcoRV* بر روی وکتور pOptiVEC و خالص‌سازی آن از آنزیم و بافرهای استفاده شده، به منظور بررسی کیفیت این پلاسمید خطی‌شده با طول ۴۳۸۳ bp، بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود گردید. نتیجه‌ی بدست آمده به صورت زیر بود.



شکل ۳-۴۲- خالص سازی وکتور pOptiVEC خطی شده. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول خالص سازی شده ی واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC.

نتیجه ی حاصل از خالص سازی محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور pOptiVEC خطی شده

پس از خطی شدن وکتور pOptiVEC با استفاده از آنزیم *EcoRV*، به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور حین واکنش الحاق، دفسفریلاسیون سر ۵' این ناقل انجام گردید. سپس خالص سازی این قطعه با طول ۵۰۰ bp انجام و نمونه به منظور بررسی کیفیت، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد.

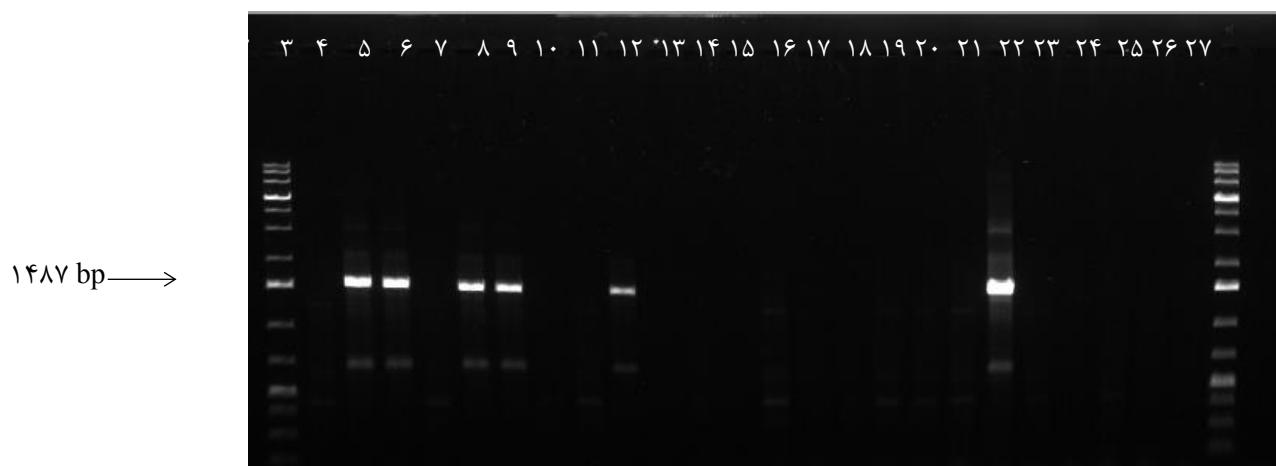


شکل ۳-۴۳- واکنش دفسفریلاسیون وکتور pOptiVEC. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور pOptiVEC.

نتایج حاصل به منظور تهیه‌ی باکتری حاوی وکتور pOptiVEC-DLIGL

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری

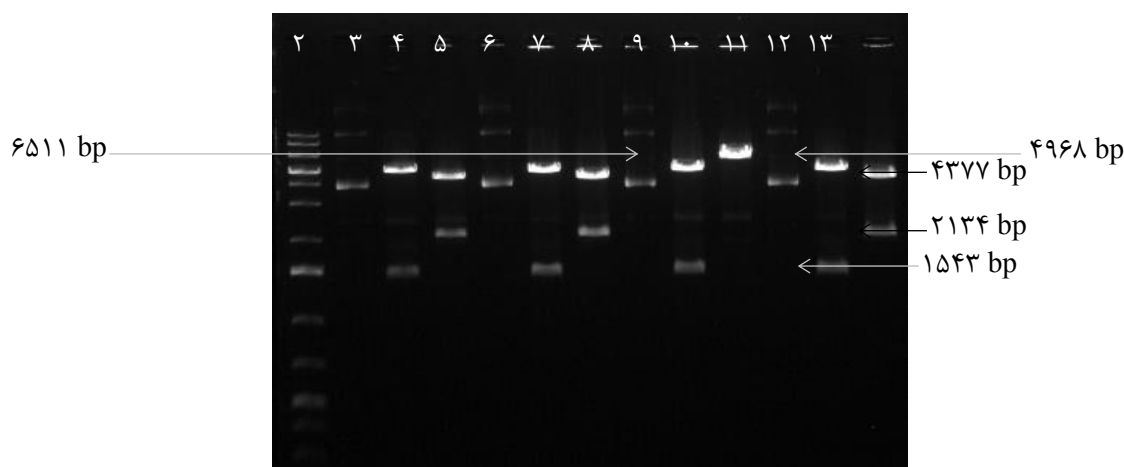
به منظور تایید کلونی‌های رشد یافته بر روی پلیت، واکنش Colony PCR با دو پرایمر F DPO/DHFR و Rev Seq 3 که قطعه‌ی ۱۴۸۷ bp را تکثیر می‌کنند، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۴۴- محصول واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲۵-۲) کلون‌های ۱ تا ۲۶ (۲۶) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲۷) Blank.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری پس از انجام واکنش Colony PCR، جهت تایید قطعه‌ی درج‌شده و همچنین جهت آن واکنش هضم آنزیمی به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های *EcoRV* و *XhoI* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های مثبت،

انجام شد. جایگاه شناسایی آنزیم *EcoRV* در دو طرف قطعه‌ی DLIGL قرار داشته و در صورت هضم وکتور با این آنزیم خروج قطعه‌ی ۲۱۳۴ bp و ۴۳۸۳ bp مورد انتظار است. آنزیم *XhoI* دارای یک جایگاه شناسایی بر روی قطعه‌ی DLIGL و یک محل برش بر روی ساختار اصلی وکتور pOptiVEC می‌باشد. در صورت خروج قطعات ۱۵۴۳ bp و ۴۹۶۸ bp، جهت توالی درج شده تایید می‌گردد. نتایج بدست آمده از واکنش‌های هضم آنزیمی به صورت زیر بود.



شکل ۳-۴۵- محصول واکنش هضم آنزیمی جهت تایید حضور وکتور pOptiVEC-DLIGL در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) کلون ۲ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *XhoI* کلون ۲ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۴) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *EcoRV* کلون ۲ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۵) کلون ۳ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۶) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *XhoI* کلون ۳ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۷) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *EcoRV* کلون ۳ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۸) کلون ۵ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۹) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *XhoI* کلون ۵ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۱۰) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *EcoRV* کلون ۵ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۱۱) کلون ۶ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۱۲) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *XhoI* کلون ۶ وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۱۳) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *EcoRV* کلون ۶ وکتور pOptiVEC-DLIGL.

نتایج بدست آمده از تعیین توالی قطعه‌ی DLIGL در وکتور pOptiVEC

تعیین توالی قطعه‌ی DLIGL در وکتور pOptiVEC-DLIGL به منظور عاری بودن آن از جهش بررسی و

تایید گردید. بخشی از نتایج بدست آمده در شکل‌های زیر نشان داده شده است.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1269 bits(687)	0.0	745/770(97%)	15/770(1%)	Plus/Plus
Query 122	ATGGGCGTCCACGAGTGTCTGCCTGGCTGTGGCTGCTGCTCTCTCTGCTCAGCCTGCCT	181		
Sbjct 1	ATGGGCGTCCACGAGTGTCTGCCTGGCTGTGGCTGCTGCTCTCTCTGCTCAGCCTGCCT	60		
Query 182	TTGGGCTGCCAGTGTCTGGGCGCTCCCCACGCCTGATCTGCGATAGCAGAGTGTGGAA	241		
Sbjct 61	TTGGGCTGCCAGTGTCTGGGCGCTCCCCACGCCTGATCTGCGATAGCAGAGTGTGGAA	120		
Query 242	AGGTACCTGCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACCACAGGCTGCAACGAGACCTGT	301		
Sbjct 121	AGGTACCTGCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACCACAGGCTGCAACGAGACCTGT	180		
Query 302	AGCCTGAACGAGAACATCACCGTGCCCGACACTAAGGTGAACTTCTACGCCTGGAAGCGG	361		
Sbjct 181	AGCCTGAACGAGAACATCACCGTGCCCGACACTAAGGTGAACTTCTACGCCTGGAAGCGG	240		
Query 362	ATGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTGAGGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGTTGTCCGAGGCT	421		
Sbjct 241	ATGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTGAGGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGTTGTCCGAGGCT	300		
Query 422	GTGCTGAGAGGCCAGGCCCTGCTCGTGAACCTTCCAGGTGAACGAGACCTGCAGCTC	481		
Sbjct 301	GTGCTGAGAGGCCAGGCCCTGCTCGTGAACCTTCCAGGTGAACGAGACCTGCAGCTC	360		
Query 482	CACGTGGATAAGGCCGTGTCTGGACTGAGGTCCCTGACCACACTGCTGCGGGCTCTGGGC	541		
Sbjct 361	CACGTGGATAAGGCCGTGTCTGGACTGAGGTCCCTGACCACACTGCTGCGGGCTCTGGGC	420		
Query 542	GCTCAGAAGGAGGCCATCTCCCTCCCGATGCCGCATCTGCTGCCCCCTGAGAACAAAT	601		
Sbjct 421	GCTCAGAAGGAGGCCATCTCCCTCCCGATGCCGCATCTGCTGCCCCCTGAGAACAAAT	479		
Query 602	CACCGCCGACACCTTCCGGAAGCTGTTACAGAGTGTACTCTAACTTTCTGAGGGGCAAGCT	661		
Sbjct 480	CACCGCCGACACCTTCCGGAAGCTGTTACAGAGTGTACTCTAACTTTCTGAGGGGCAAGCT	539		
Query 662	GAAAGCTGTACACCGGCGAGGCTGCAGAACCCGGCGACAGATGACTCGAGGGACCTAAA	721		
Sbjct 540	G-AAGCTGTACACCGGCGAGGCTGCAGAA-CCGGCGACAGATGACTCGAGGGACCT-AA	596		
Query 722	TAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGT-ATATTAAGG-TTCCGGCAAGCTCTAGATC	779		
Sbjct 597	TAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTATATTAAGGGTTCC-GCAAGCTCTAGATC	655		
Query 780	GACGGTACCGCGGGCCCGGAATCGCCCTCCTCCCTTCCCCCCCCCTAACCGATTACTG	839		
Sbjct 656	GACGGTACCGCGGGCCCGGAATCGCCCTCCTCCCTTCCCCCCCCCTAAC-G-TTACTG	712		
Query 840	GACGGAAGGCGCT-GGAATAAAGC-GGC-TGCGTTGTTCTAATATGTTAT	886		
Sbjct 713	GCCG-AAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTA-TATGTTAT	760		

شکل ۳-۴۶- بخشی از نتایج تعیین توالی قطعه‌ی داربی پوئینین آلفا در وکتور pOptiVEC-DLIGL و همترازی آن با توالی مرجع.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
675 bits(365)	0.0	400/414(97%)	14/414(3%)	Plus/Plus
Query 343	CCGCCCTCTCCCT	CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCG	402	
Sbjct 678	CCGCCCTCTCCCT	CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAATAAGGCCG	737	
Query 403	GTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGC	462		
Sbjct 738	GTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGC	797		
Query 463	CCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTCCCTCTCGCCAA	522		
Sbjct 798	CCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTCCCTCTCGCCAA	857		
Query 523	AGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAG	582		
Sbjct 858	AGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAG	917		
Query 583	ACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGAGGCAGCGGAA	CCCCCCTGCGGACAGGT	642	
Sbjct 918	ACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGAGGCAGCGGAA	CCCCCCTGCGGACAGGT	976	
Query 643	GCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGGTGTTATAAGATACACCCTGCAAAGGCGGCACAACCCC	702		
Sbjct 977	GCCTCTGCGGCCAAAAGCCACG-TG-TATAAGATACA-CCTGCAAAGGCGGCACAACCCC	1033		
Query 703	CAGTTGCCACGTTTGTGAGTTCGGCATAGTCTGTGGGAAAAGAGTTCAAATGG	756		
Sbjct 1034	-AGT-GCC-ACGTT-GTGAGTT-GG-ATAGT-TGTGG-AAA-GAGT-CAAATGG	1077		

شکل ۳-۴۷- بخشی از نتایج تعیین توالی قطعه‌ی IRES در وکتور pOptiVEC-DLIGL و همترازی آن با توالی مرجع.

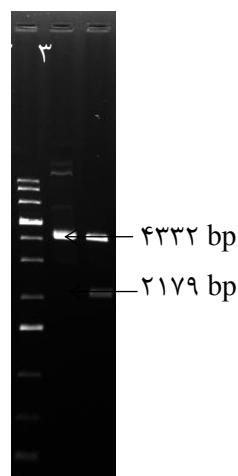
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1014 bits(549)	0.0	575/586(98%)	7/586(1%)	Plus/Plus
Query 4	AAGCGGACCCCTGAAAGGTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGGCCCGTGCCCTGGGCCCAC	63		
Sbjct 1391	AAGCTGACCCCTGAA--GTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTG-CCCGTGCCCT-GGCCCAC	1446		
Query 64	CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGTACCCCGACCACATGAA	123		
Sbjct 1447	CCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGTACCCCGACCACATGAA	1506		
Query 124	GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT	183		
Sbjct 1507	GCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT	1566		
Query 184	CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCT	243		
Sbjct 1567	CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCT	1626		
Query 244	GGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA	303		
Sbjct 1627	GGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA	1686		
Query 304	CAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA	363		
Sbjct 1687	CAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAA	1746		
Query 364	CGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGC	423		
Sbjct 1747	CGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGC	1806		
Query 424	CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA	483		
Sbjct 1807	CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCA	1866		
Query 484	CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACTTTCAACGAGAAGCGCGATCACATGG	543		
Sbjct 1867	CTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC-CAACGAGAAGCGCGATCACATGG	1925		
Query 544	TCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCAC-CTCCGGGATGG	588		
Sbjct 1926	TCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC-GGCATGG	1970		

شکل ۳-۴۸- بخشی از نتایج تعیین توالی قطعه‌ی EGFP در وکتور pOptiVEC-DLIGL و همترازی آن با توالی مرجع.

نتایج حاصل به منظور آماده‌سازی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL

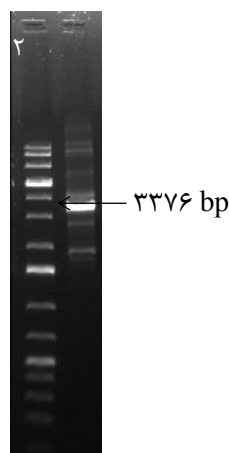
آنزیم *Sall* بر روی وکتور pOptiVEC-DLIGL در دو طرف قطعه‌ی DLIGLID، دارای جایگاه شناسایی می‌باشند. باتوجه به اینکه از این وکتور به عنوان الگوی واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DLIGLID استفاده می‌گردد، به منظور حذف باندهای غیراختصاصی، ابتدا واکنش هضم آنزیمی بر روی این وکتور صورت گرفت. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۴۹- واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL جهت حذف باندهای غیراختصاصی. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) وکتور pOptiVEC-DLIGL. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DLIGLID

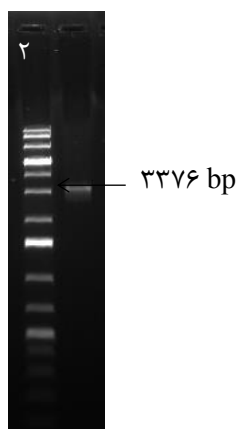
نتیجه‌ی واکنش PCR بر روی محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL با آنزیم *Sall*، به منظور تکثیر قطعه‌ی DLIGL با طول ۳۳۷۶ bp، به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۰- محصول واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی **DLIGLID**. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش PCR.

نتیجه‌ی بدست آمده از خالص‌سازی قطعه‌ی **DLIGLID** از ژل آگارز

استفاده از وکتور pOptiVEC-DLIGL هم‌شده با آنزیم *Sall* به منظور تکثیر قطعه‌ی **DLIGLID**، سبب کاهش تعداد باندهای غیراختصاصی گردید. در نهایت به منظور حذف تمامی باندهای غیراختصاصی، قطعه‌ی **DLIGLID** با طول 3376 bp از ژل آگارز تخلیص شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



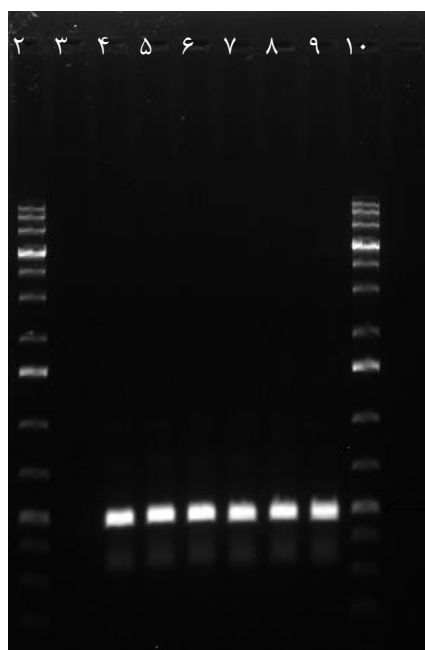
شکل ۳-۵۱- قطعه‌ی **DLIGLID** خالص شده از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) قطعه‌ی **DLIGLID** خالص شده از ژل آگارز.

نتایج حاصل به منظور تهیه‌ی باکتری حاوی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID

در این بخش به نتایج بدست آمده به منظور تهیه باکتری *E. coli* حاوی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID می‌پردازیم.

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID در باکتری

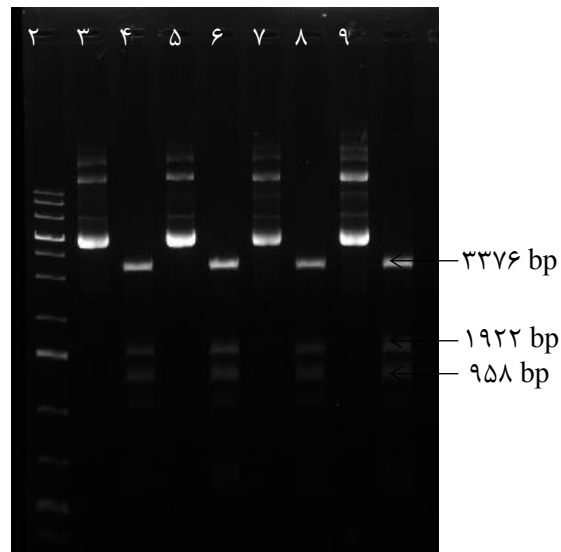
به منظور تایید کلونی‌های رشد یافته بر روی پلیت، واکنش Colony PCR با دو پرایمر F DPO/DHFR و Rev Seq DPO که قطعه‌ی ۴۵۷ bp را تکثیر می‌کنند، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۲- واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲-۷) کلون‌های ۱ تا ۵. (۸) کنترل مثبت. (۹) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۱۰) Blank.

واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID در باکتری

پس از انجام واکنش Colony PCR، به منظور تایید قطعه‌ی درج‌شده، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *NgoMIV* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های مثبت، انجام شد. این آنزیم علاوه بر جایگاه برش در دو طرف قطعه‌ی DLIGLID، دارای جایگاه شناسایی بر روی ساختار اصلی وکتور pCRTM-Blunt نیز می‌باشد و در صورت هضم وکتور با آن، خروج قطعات ۹۵۸ bp، ۱۹۲۲ bp و ۳۳۷۶ bp مورد انتظار است. نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش‌های هضم آنزیمی به صورت زیر بود.



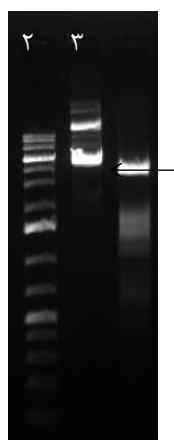
شکل ۳-۵۳- محصول واکنش هضم آنزیمی جهت تایید حضور وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) کلون ۲ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۲ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۴) کلون ۴ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۵) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۴ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۶) کلون ۵ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۷) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۵ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۸) کلون ۱۰ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID (۹) محصول واکنش هضم آنزیمی کلون ۱۰ وکتور pCRTM-Blunt-DLIGLID

۳-۲-۲- منظور آماده‌سازی وکتور UCOE-DLIGLID

در این بخش به نتایج بدست آمده به منظور تهیه‌ی وکتور UCOE-DLIGLID می‌پردازیم.

- نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID

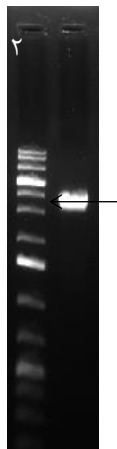
به منظور خارج کردن قطعه‌ی DLIGLID با طول ۳۳۷۶ bp از وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID، واکنش هضم آنزیمی بر روی این وکتور با استفاده از آنزیم *NgoMIV* صورت گرفت. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۴- محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID.

خالص‌سازی قطعه‌ی DLIGLID هضم‌شده با آنزیم *NgoMIV* از ژل آگارز

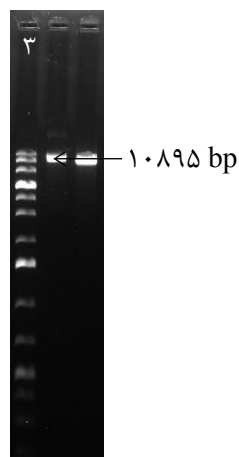
به منظور دستیابی به قطعه‌ی خالص DLIGLID با طول ۳۳۷۶ bp و حذف ساختار اصلی وکتور، پس از انجام واکنش هضم با آنزیم *NgoMIV* و خروج این توالی از وکتور pCR™-Blunt-DLIGLID، تخلیص از ژل آگارز صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی بر روی ژل آگارز لود گردید. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۵- محصول تخلیص قطعه‌ی **DLIGLID** از ژل آگارز. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) قطعه‌ی **DLIGLID** خالص شده از ژل آگارز.

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش هضم آنزیمی وکتور **UCOE**

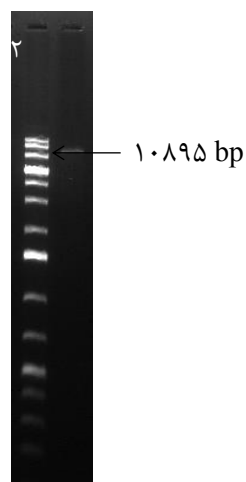
به منظور خطی نمودن وکتور **UCOE**، واکنش هضم با آنزیم *NgoMIV* بر روی این وکتور صورت گرفت. سپس نمونه بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتیجه‌ی بدست آمده به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۶- واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) وکتور UCOE. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE.

خالص سازی وکتور UCOE خطی شده با آنزیم *NgoMIV*

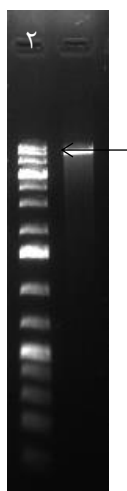
پس از انجام واکنش هضم با استفاده از آنزیم *NgoMIV* بر روی وکتور UCOE و خالص سازی آن از آنزیم و بافرهای استفاده شده، به منظور بررسی کیفیت این پلاسمید خطی شده با طول 10895 bp، نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد لود گردید. نتیجه ی بدست آمده به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۷- محصول خالص سازی واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول خالص شده ی واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE.

نتیجه‌ی حاصل از خالص‌سازی محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور UCOE خطی شده

پس از خطی شدن وکتور UCOE با استفاده از آنزیم *NgoMIV*، به منظور جلوگیری از اتصال دو سر وکتور حین واکنش الحاق، دفسفریلاسیون سر ۵' این ناقل انجام گردید. سپس خالص‌سازی این قطعه با طول ۱۰۸۹۵ bp انجام و نمونه به منظور بررسی کیفیت، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد.



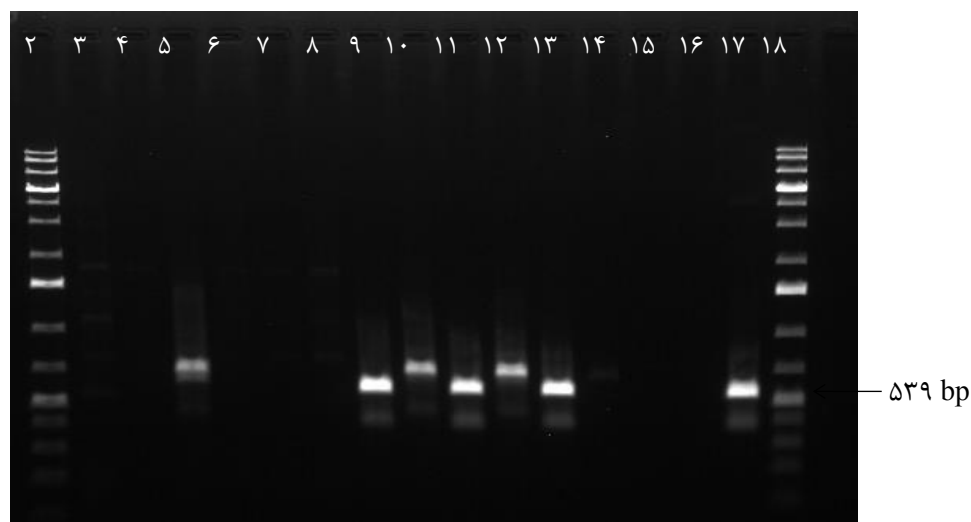
شکل ۳-۵۸- محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور UCOE خطی شده. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش دفسفریلاسیون وکتور UCOE.

منظور تهیه‌ی باکتری حاوی وکتور UCOE-DLIGLID

نتیجه‌ی بدست آمده از واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری

به منظور تایید کلونی‌های رشد یافته بر روی پلیت، واکنش Colony PCR با دو پرایمر F Pro CMV و

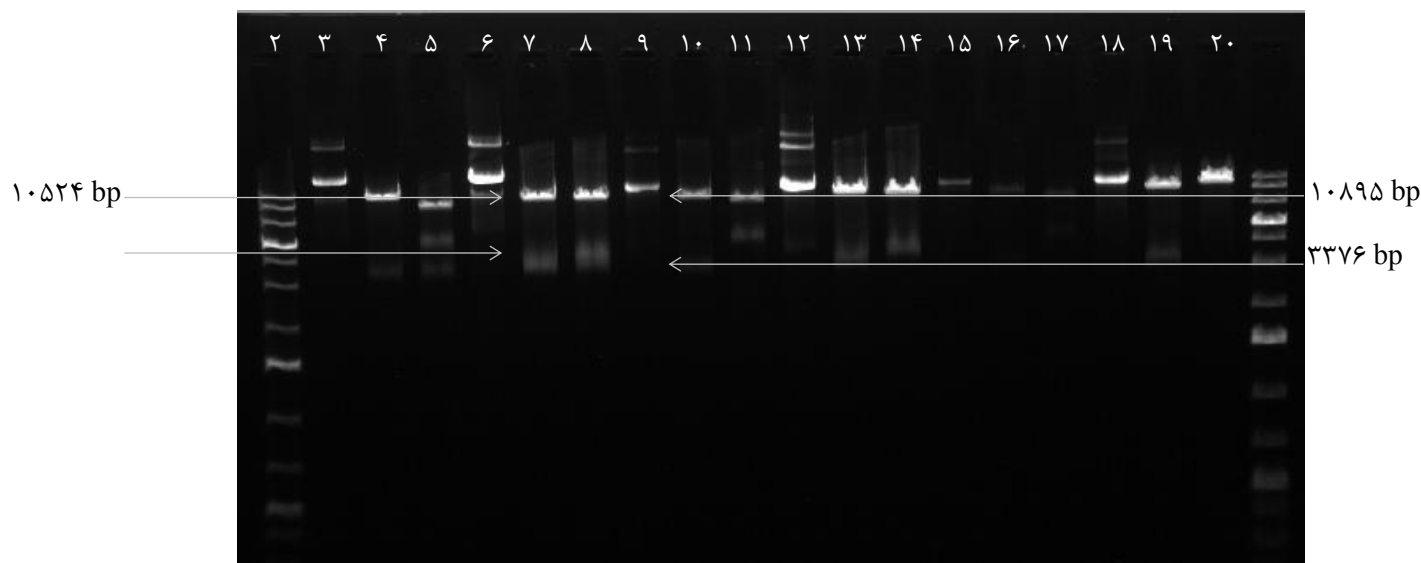
Rev Seq DPO که قطعه‌ی ۵۳۹ bp را تکثیر می‌کنند، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۵۹- محصول واکنش Colony PCR جهت تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲-۱۵) کلون‌های ۱ تا ۱۴ (۱۶) کنترل مثبت (۱۷) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۱۸) Blank.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش هضم آنزیمی به منظور تایید حضور وکتور UCOE-DLIGLID در باکتری

پس از انجام واکنش Colony PCR، جهت تایید قطعه‌ی درج‌شده و همچنین جهت آن، واکنش هضم آنزیمی به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های *NotI* و *NgoMIV* بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های مثبت، انجام شد. جایگاه شناسایی آنزیم *NgoMIV* در دو طرف قطعه‌ی DLIGLID قرار داشته و در صورت هضم وکتور با این آنزیم خروج قطعه‌ی ۳۳۷۶ bp و ۱۰۸۹۵ bp مورد انتظار است. آنزیم *NotI* دارای یک جایگاه شناسایی بر روی قطعه‌ی DLIGLID و یک محل برش بر روی ساختار اصلی وکتور UCOE می‌باشد. در صورت خروج قطعات ۳۷۶۵ bp و ۱۰۵۲۴ bp، جهت توالی درج شده نیز تایید می‌گردد. نتایج بدست آمده از واکنش‌های هضم آنزیمی به صورت زیر بود.



شکل ۳-۶۰- محصول واکنش هضم آنزیمی جهت تایید حضور وکتور **UCOE-DLIGLID** در باکتری. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) کلون ۳ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۳) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* کلون ۳ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۴) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* کلون ۳ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۵) کلون ۷ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۶) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* کلون ۷ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۷) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* کلون ۷ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۸) کلون ۸ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۹) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* کلون ۸ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۰) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* کلون ۸ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۱) کلون ۹ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۲) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* کلون ۹ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۳) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* کلون ۹ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۴) کلون ۱۰ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۵) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* کلون ۱۰ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۶) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* کلون ۱۰ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۷) کلون ۱۱ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۸) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NgoMIV* کلون ۱۱ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۱۹) محصول واکنش هضم آنزیمی با آنزیم *NotI* کلون ۱۱ وکتور **UCOE-DLIGLID**. (۲۰) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus.

نتایج بدست آمده از تعیین توالی قطعه‌ی **DLIGLID** در وکتور **UCOE**

تعیین توالی قطعه‌ی **DLIGLID** در وکتور **UCOE** به منظور عاری بودن آن از جهش بررسی و تایید گردید.

بخشی از نتایج بدست آمده در شکل‌های زیر نشان داده شده است.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
630 bits(341)	0.0	358/365(98%)	5/365(1%)	Plus/Plus
Query 689	ATGGGCGTCCACGAGTGTCTGCCTGGCTGTGGCTGCTGCTCTCTCTGCTCAGCCTGCCT	748		
Sbjct 1	ATGGGCGTCCACGAGTGTCTGCCTGGCTGTGGCTGCTGCTCTCTCTGCTCAGCCTGCCT	60		
Query 749	TTGGGCCTGCCAGTGTCTGGGCGCTCCCCACGCCTGATCTGCGATAGCAGAGTGTGGAA	808		
Sbjct 61	TTGGGCCTGCCAGTGTCTGGGCGCTCCCCACGCCTGATCTGCGATAGCAGAGTGTGGAA	120		
Query 809	AGGTACCTGTCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACCACAGGCTGCAACGAGACCTGT	868		
Sbjct 121	AGGTACCTGTCTGGAGGCCAAGGAGGCCGAGAATATCACCACAGGCTGCAACGAGACCTGT	180		
Query 869	AGCCTGAACGAGAACATCACCGTGCCCGACACTAAGGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGG	928		
Sbjct 181	AGCCTGAACGAGAACATCACCGTGCCCGACACTAAGGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGG	240		
Query 929	ATGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTCGAGGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGTTGTACACAGAG	988		
Sbjct 241	ATGGAGGTGGGCCAGCAGGCTGTCGAGGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGTTGT - C - C - GAG	297		
Query 989	GCTGTGCTGAGAGGCCAGGCCCTGCTCGTGAATC - TCCCAGGTGAACGAGACCC - GCCG	1046		
Sbjct 298	GCTGTGCTGAGAGGCCAGGCCCTGCTCGTGAATCCTTCCCAGGTGAACGAGACCCTGCAG	357		
Query 1047	GTCCA 1051			
Sbjct 358	CTCCA 362			

شکل ۳-۶۱- بخشی از نتایج حاصل از تعیین توالی قطعه‌ی داربی‌پوئین آلفا در وکتور UCOE-DLIGLID و همترازی آن با توالی مرجع.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1411 bits(764)	0.0	828/854(97%)	23/854(2%)	Plus/Plus
Query 14	CCGATTGGTATGGGGATTGTGATCTGGGGCGCCTCAGGTAGCACATGCTTTACATGTGTT			73
Sbjct 1127	CCCATT-GTAT-GGGA-TCTGATCT-GGG-GCCTC-GGT-GCACATGCTTTACATGTGTT			1179
Query 74	TTAGTCGGAGGGTTaaaaaaGGCGTCTAGGGCCCCCGGAACCACGGGGACGTTGGTTT			133
Sbjct 1180	T-AGTC-GA-GGTTAAAAAA--CGTCTA-GGCCCCC-GAACCACGGGGACG-TGGTTT			1231
Query 134	TCGTTTGAAAAACACGATGGATAAATATGGCCACAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC			193
Sbjct 1232	TCCTTTGAAAAACACGATG-AT-AATATGGCCACAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC			1289
Query 194	TGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCTGGGTCGAGCTGGACGGGCGACGTAAACGGCCACAA			253
Sbjct 1290	TGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCTGG-TGAGCTGGAC-GGCGACGTAAACGGCCACAA			1347
Query 254	GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT			313
Sbjct 1348	GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT			1407
Query 314	CATCTGCACCAACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCACCTGACCTA			373
Sbjct 1408	CATCTGCACCAACGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCAACCTCGTGACCACCTGACCTA			1467
Query 374	CGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC			433
Sbjct 1468	CGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC			1527
Query 434	CGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA			493
Sbjct 1528	CGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA			1587
Query 494	CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA			553
Sbjct 1588	CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA			1647
Query 554	GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA			613
Sbjct 1648	GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAA			1707
Query 614	CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAA			673
Sbjct 1708	CAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAA			1767
Query 674	GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC			733
Sbjct 1768	GATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC			1827
Query 734	CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC			793
Sbjct 1828	CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGC			1887
Query 794	CCTGAGCAAAGACCCGCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCG			853
Sbjct 1888	CCTGAGCAAAGACCC-CAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCG			1946
Query 854	CCCGCCCGGGGATC	867		
Sbjct 1947	CC-GCC-GGG-ATC	1957		

شکل ۳-۶۲- بخشی از نتایج حاصل از تعیین توالی قطعه‌ی IRES-EGFP در وکتور UCOE-DLIGLID و همترازی آن با توالی مرجع.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1323 bits(716)	0.0	726/730(99%)	3/730(0%)	Plus/Plus
Query 2	CTCCC-CCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGT	60		
Sbjct 2152	CTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAAGCCGCTTGGAAATAAGGCCGGTGTGCGT	2211		
Query 61	TTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAA	120		
Sbjct 2212	TTGTCTATATGTTA-TTTTCCACCATATTGCCGCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAA	2270		
Query 121	CCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGCTTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATG	180		
Sbjct 2271	CCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGCTTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATG	2330		
Query 181	CAAGGCTGTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA	240		
Sbjct 2331	CAAGGCTGTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACA	2390		
Query 241	ACGCTCTGTAGCGACCTTTTGACGGCAGCGGAACCCCACTGGCGACAGGTGCCTCTGC	300		
Sbjct 2391	ACGCTCTGTAGCGACCTTTTGACGGCAGCGGAACCCCACTGGCGACAGGTGCCTCTGC	2450		
Query 301	GGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCACTGCCACGTT	360		
Sbjct 2451	GGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCCACTGCCACGTT	2510		
Query 361	GTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGG	420		
Sbjct 2511	GTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGG	2570		
Query 421	CTGAAGGATGCCAGAAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCTCGGTACACA	480		
Sbjct 2571	CTGAAGGATGCCAGAAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCTCGGTACACA	2630		
Query 481	TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAGCGTCTAGGCCCCCCGAACACGGGGAC	540		
Sbjct 2631	TGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAGCGTCTAGGCCCCCCGAACACGGGGAC	2690		
Query 541	GTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAAGATCTGCCACCATGGTTTCG	600		
Sbjct 2691	GTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAAGATCTGCCACCATGGTTTCG	2750		
Query 601	ACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAAATATGGGATTGGCAAGAACGGAGACCT	660		
Sbjct 2751	ACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAAATATGGGATTGGCAAGAACGGAGACCT	2810		
Query 661	ACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAGGAATGACCACAACCTCTTG	720		
Sbjct 2811	ACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCCAAGGAATGACCACAACCTCTTG	2869		
Query 721	CAGGGGAAGG 730			
Sbjct 2870	CAGTGGAAAGG 2879			

شکل ۳-۶۳- بخشی از نتایج حاصل از تعیین توالی قطعه‌ی IRES-DHFR در وکتور UCOE-DLIGLID و همترازی آن با توالی مرجع.

۳-۲-۳- نتایج حاصل از تهیه‌ی لاین سلولی CHO DG44 نو ترکیب به صورت پایدار

نتایج به دست آمده به منظور آماده‌سازی وکتورهای pOptiVEC-DLIGL و UCOE-

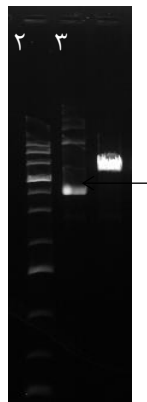
DLIGLID جهت انجام ترنسفکشن

نتیجه‌ی حاصل از واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL

به منظور درج وکتور pOptiVEC-DLIGL با طول bp ۶۵۱۶ در ژنوم سلول CHO DG44، این وکتور با

استفاده از آنزیم *PvuI* خطی گردید. سپس نمونه جهت بررسی کیفیت، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتیجه‌ی

حاصل به صورت زیر بود.



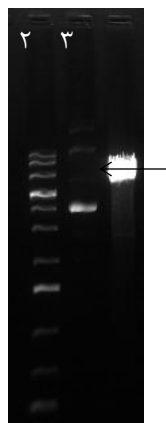
شکل ۳-۶۴- محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور pOptiVEC-DLIGL (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور حلقوی pOptiVEC-DLIGL (۳) وکتور pOptiVEC-DLIGL خطی شده با آنزیم *PvuI*.

نتیجهی بدست آمده از خالص سازی وکتور pOptiVEC-DLIGL خطی شده با آنزیم *PvuI*

به منظور حذف بافر و آنزیم استفاده شده طی واکنش هضم آنزیمی، تخلیص وکتور pOptiVEC-DLIGL

خطی شده صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی کیفیت، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتیجهی حاصل به

صورت زیر بود.



شکل ۳-۶۵- محصول خالص شده‌ی وکتور pOptiVEC-DLIGL خطی شده با آنزیم *PvuI*. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور حلقوی pOptiVEC-DLIGL (۳) محصول خالص شده‌ی وکتور pOptiVEC-DLIGL خطی شده با آنزیم *PvuI*.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE-DLIGLID

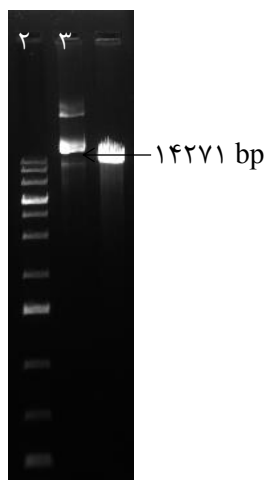
به منظور درج وکتور UCOE-DLIGLID با طول ۱۴۲۷۱ bp در ژنوم سلول CHO DG44، این وکتور با استفاده از آنزیم *I-SceI* خطی گردید. سپس نمونه جهت بررسی کیفیت، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۶۶- محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور UCOE-DLIGLID (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور حلقوی UCOE-DLIGLID (۳) وکتور UCOE-DLIGLID خطی شده با آنزیم *I-SceI*

نتیجه‌ی بدست آمده از خالص‌سازی وکتور UCOE-DLIGLID خطی شده با آنزیم *I-SceI*

به منظور حذف بافر و آنزیم استفاده شده طی واکنش هضم آنزیمی، تخلیص وکتور UCOE-DLIGLID خطی شده صورت گرفت. سپس نمونه جهت بررسی کیفیت، بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



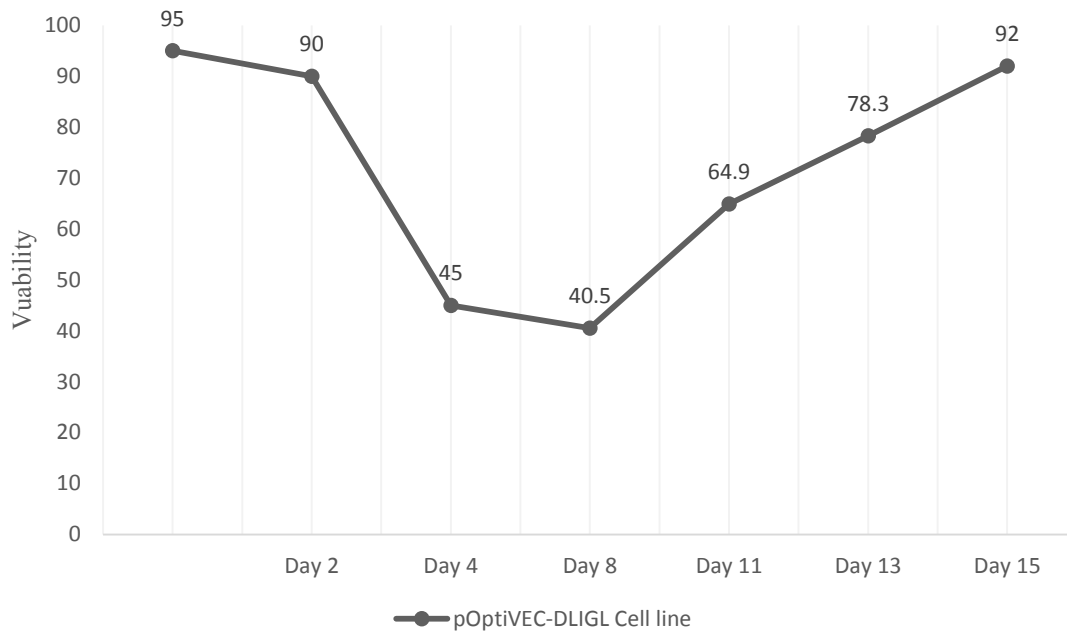
شکل ۳-۶۷- محصول خالص شده‌ی وکتور UCOE-DLIGLID خطی شده با آنزیم *I-SceI* (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus (۲) وکتور حلقوی UCOE-DLIGLID (۳) محصول خالص شده‌ی وکتور UCOE-DLIGLID خطی شده با آنزیم *I-SceI*

نتایج حاصل از ترنسفکشن و غربالگری سلول‌ها

نتیجه‌ی بدست آمده از ترنسفکشن وکتور pOptiVEC-DLIGL به سلول CHO DG44 و غربالگری آن‌ها

نمودار زیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها، از زمان ترنسفکشن و سپس در طول دوره‌ی غربالگری تا دستیابی به

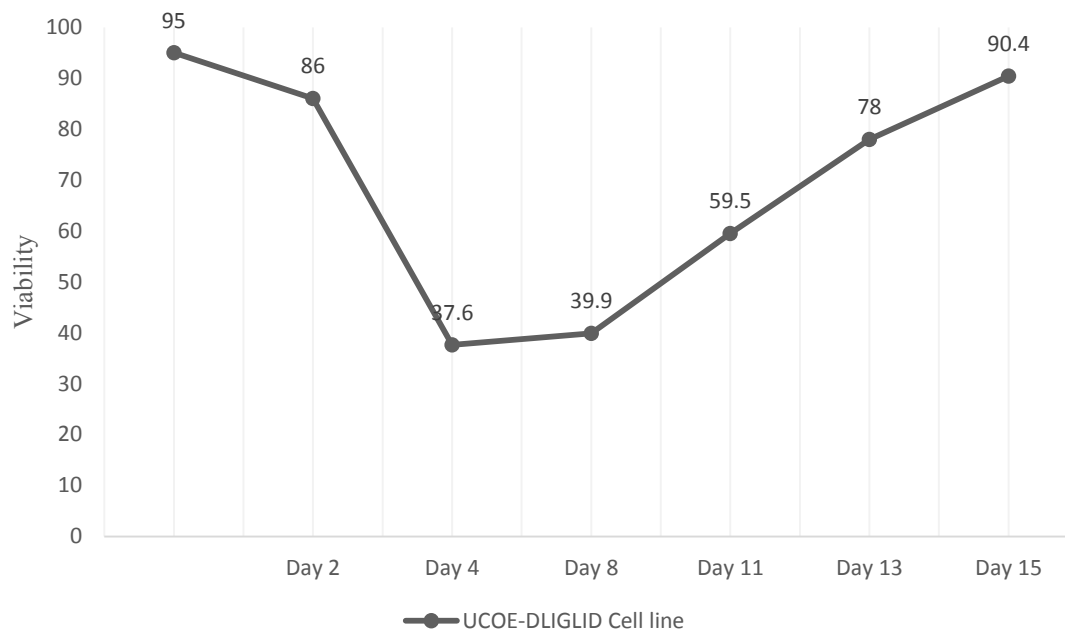
درصد زنده‌مانی بالای ۹۰٪، در لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL را نشان می‌دهد.



نمودار ۲-۳- درصد زنده‌مانی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL از زمان ترنسفکت تا دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۰٪.

ترنسفکت وکتور UCOE-DLIGLID به سلول CHO DG44 و غربالگری آن‌ها

نمودار زیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها، از زمان ترنسفکت و سپس در طول دوره‌ی غربالگری تا دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۰٪، در لاین سلولی UCOE-DLIGLID را نشان می‌دهد.



نمودار ۳-۳- درصد زنده‌مانی سلول‌های UCOE-DLIGLID از زمان ترنسفکت تا دستیابی به درصد زنده‌مانی بالای ۹۰٪.

نتایج حاصل از تایید درج سازه درون ژنوم سلول CHO DG44

نتیجه‌ی بدست آمده از ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت به منظور تایید

درج سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول

نتیجه‌ی بدست آمده از بررسی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، به

صورت زیر بود.



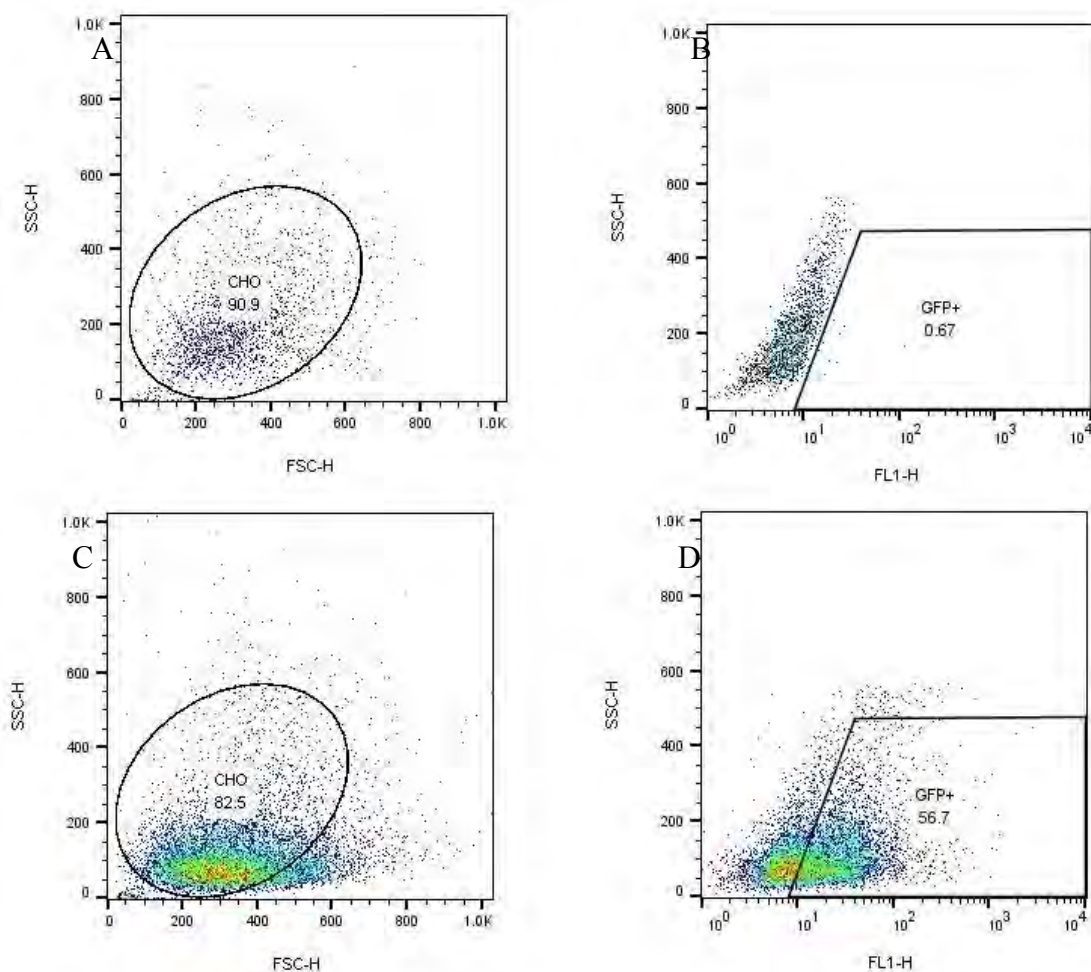
شکل ۳-۶۸- بررسی بیان ژن EGFP در سلول‌های pOptiVEC-DLIGL با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. (A) سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور pOptiVEC-DLIGL. (B) سلول CHO DG44 ترنسفکت نشده.

ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از فلوسایتومتری به منظور تایید درج سازهی pOptiVEC-DLIGL

در ژنوم سلول

نتیجه‌ی بدست آمده از بررسی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL با استفاده از فلوسایتومتری، به صورت زیر

بود.



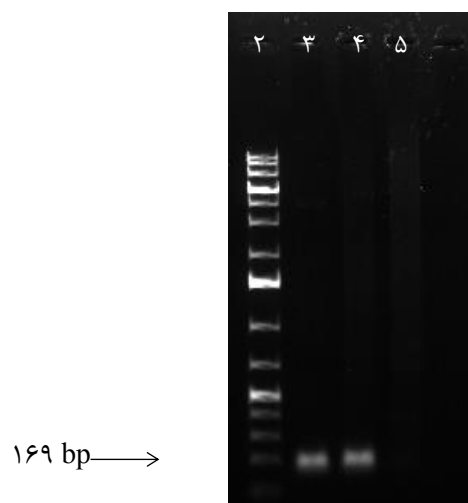
شکل ۳-۶۹- آنالیز فلوسایتومتری لاین سلولی از وکتور pOptiVEC-DLIGL (A) جمعیت انتخاب شده از سلول‌های کنترل منفی. (B) جمعیت انتخاب شده به عنوان محدوده‌ی سلول‌های بیان کننده‌ی ژن EGFP در سلول‌های کنترل منفی. (C) جمعیت انتخاب شده از سلول‌های لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL (D) درصد جمعیت سلولی که به عنوان سلول‌های بیان کننده‌ی ژن EGFP مشخص شده‌اند.

واکنش PCR به منظور تایید درج سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول

به منظور تایید درج سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL در ژنوم سلول CHO DG44، واکنش PCR بر روی

DNA استخراج شده از این لاین سلولی با دو پرایمر F Real DPO و R Real DPO که قطعه‌ای با طول ۱۶۹ bp

را تکثیر می‌کنند، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



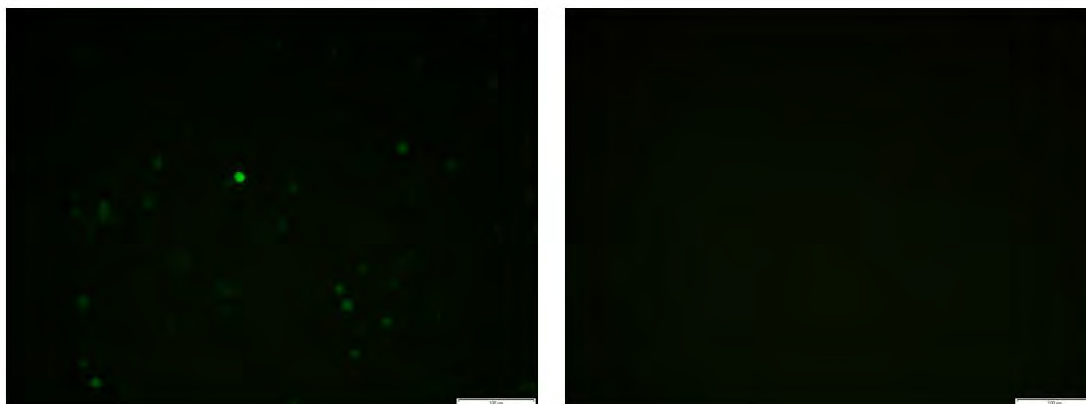
شکل ۳-۷۰- تایید درج سازه‌ی pOptiVEC-DLIGL در سطح ژنومیک. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش PCR بر روی ژنوم استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL (۳) محصول واکنش PCR بر روی وکتور pOptiVEC-DLIGL (۴) محصول واکنش PCR بر روی ژنوم استخراج شده از سلول CHO DG44 (۵) Blank.

ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت به منظور تایید درج سازه‌ی UCOE-

DLIGLID در ژنوم سلول

نتیجه‌ی بدست آمده از بررسی سلول‌های UCOE-DLIGLID با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، به

صورت زیر بود.



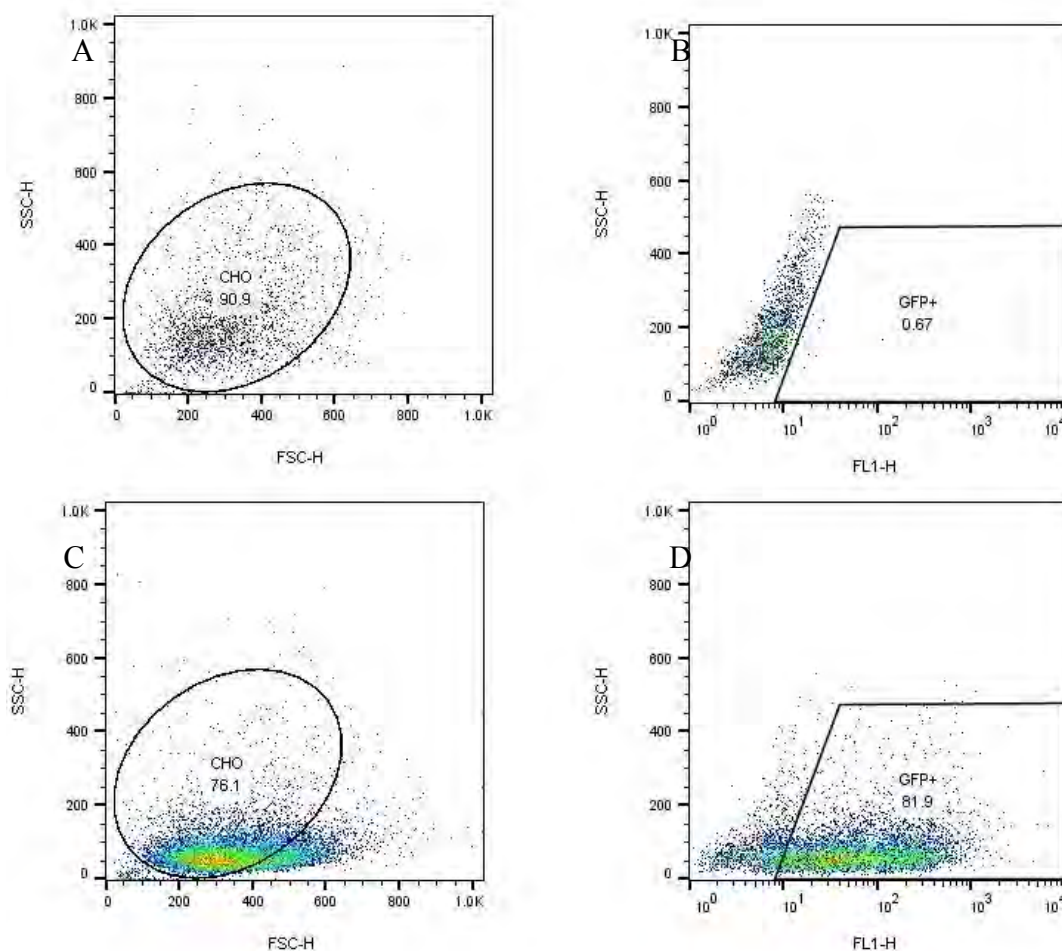
شکل ۳-۷۱- بررسی بیان ژن EGFP در سلول‌های UCOE-DLIGLID با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت. (A) سلول‌های ترنسفکت شده با وکتور UCOE-DLIGLID. (B) سلول CHO DG44 ترنسفکت نشده.

نتیجه‌ی حاصل از ارزیابی بیان ژن EGFP با استفاده از فلوسایتمتری به منظور تایید درج سازه‌ی

UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول

نتیجه‌ی بدست آمده از بررسی سلول‌های UCOE-DLIGLID با استفاده از فلوسایتمتری، به صورت زیر

بود.



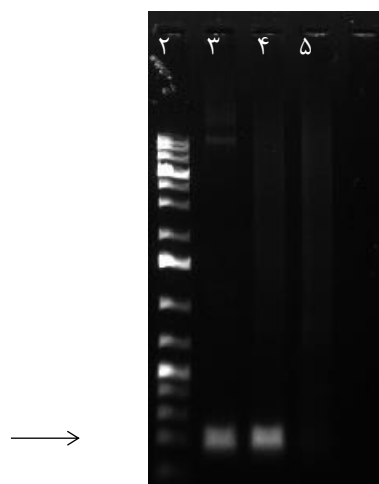
شکل ۳-۷۲- آنالیز فلوسایتومتری لاین سلولی UCOE-DLIGLID (A) جمعیت انتخاب شده از سلول‌های کنترل منفی. (B) محدوده‌ی سلول‌های بیان کننده‌ی ژن EGFP در سلول‌های کنترل منفی. (C) جمعیت انتخاب شده از سلول‌های لاین سلولی UCOE-DLIGLID (D) درصد جمعیت سلولی که به عنوان سلول‌های بیان کننده‌ی ژن EGFP از لاین سلولی UCOE-DLIGLID مشخص شده‌اند.

نتیجه‌ی حاصل از واکنش PCR به منظور تایید درج سازه‌ی UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول

به منظور تایید درج سازه‌ی UCOE-DLIGLID در ژنوم سلول CHO DG44، واکنش PCR بر روی DNA

استخراج شده از این لاین سلولی با دو پرایمر F Real DPO و R Real DPO که قطعه‌ای با طول ۱۶۹ bp را

تکثیر می‌کنند، انجام شد. نتیجه‌ی حاصل به صورت زیر بود.



شکل ۳-۷۳- تایید درج سازهی UCOE-DLIGLID در سطح ژنومیک. (۱) نشانگر وزن مولکولی 1kb Plus. (۲) محصول واکنش PCR بر روی ژنوم استخراج شده از لاین سلولی UCOE-DLIGLID. (۳) محصول واکنش PCR بر روی وکتور UCOE-DLIGLID. (۴) محصول واکنش PCR بر روی ژنوم استخراج شده از سلول CHO DG44. (۵) Blank.

۳-۲-۴- نتایج حاصل از جداسازی سلول‌ها با استفاده از روش FACS

نتیجه‌ی به دست آمده از جداسازی سلول‌های pOptiVEC-DLIGL دارای بیان بالا از ژن

EGFP

در ابتدا دستگاه با استفاده از نمونه‌های کنترلی که در Test Tube تهیه گردید تنظیم شد. در حدود ۱۷ درصد از سلول‌های pOptiVEC-DLIGL توسط دستگاه سبز پررنگ تشخیص و قابل جداسازی بودند. این درصد اندازه‌گیری شده از میزان بیان EGFP توسط دستگاه، دامنه‌ی مختلفی از شدت بیان این پروتئین را در سلول‌ها شامل می‌شود. هرچقدر درصد جداسازی سلول‌ها، کمتر از میزان تشخیص داده شده توسط دستگاه باشد، در نهایت جمعیت جداسازی‌شده دارای بیان بالاتری از EGFP بوده و در زمان برخورد نور فلورسنت به آن‌ها رنگ سبز را با شدت بیشتری ساطع می‌کنند. در نهایت دو دسته‌ی ۱۰٪ و ۶٪، از کل سلول‌ها، جداسازی شدند. خلوص سلول‌های جداسازی‌شده به صورت زیر بود.

Tube: purity			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	64	###	100.0
■ Cell	52	81.2	81.2
■ Single cell1	51	98.1	79.7
■ Single cell2	49	96.1	76.6
■ Live cell	48	98.0	75.0
■ GFP positive	37	77.1	57.8

نمودار ۳-۴- درصد خلوص سلول‌های pOptiVEC-DLIGL جداسازی شده.

نتیجه‌ی حاصل از جداسازی سلول‌های UCOE-DLIGLID دارای بیان بالا از ژن EGFP

در ابتدا دستگاه با استفاده از نمونه‌های کنترلی که در Test Tube تهیه گردید تنظیم شد. در حدود ۷۰ درصد از سلول‌های UCOE-DLIGLID توسط دستگاه سبز پررنگ تشخیص و قابل جداسازی بودند. این درصد اندازه‌گیری شده از میزان بیان EGFP توسط دستگاه، دامنه‌ی مختلفی از شدت بیان این پروتئین را در سلول‌ها شامل می‌شود. هرچقدر درصد جداسازی سلول‌ها، کمتر از میزان تشخیص داده شده توسط دستگاه باشد، در نهایت جمعیت جداسازی شده دارای بیان بالاتری از EGFP بوده و در زمان برخورد نور فلورسنت به آن‌ها رنگ سبز را با شدت بیشتری ساطع می‌کنند. در نهایت دو دسته‌ی ۳۰٪ و ۱۰٪، از کل سلول‌ها، جداسازی شدند. خلوص سلول‌های جداسازی شده به صورت زیر بود.

Tube: PURITY			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	94	####	100.0
■ Cell	81	86.2	86.2
■ Single cell1	76	93.8	80.9
■ Single cell2	69	90.8	73.4
■ Live cell	46	66.7	48.9
■ GFP positive	44	95.7	46.8

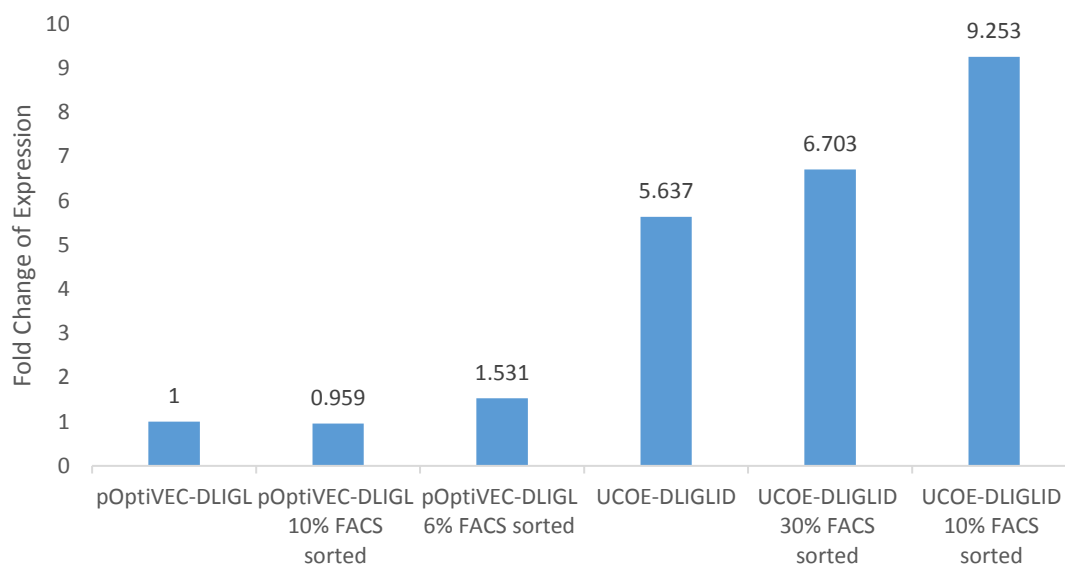
نمودار ۳-۵- درصد خلوص سلول های UCOE-DLIGLID جداسازی شده.

۳-۲-۵- نتایج بدست آمده از بررسی بیان در سطح RNA و پروتئین

در این بخش به نتایج بدست آمده از بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا و EGFP در سطح RNA و پروتئین در شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی شده ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID می پردازیم.

۳-۲-۵-۱- نتایج حاصل از تست Real Time PCR

نتیجه ی بدست آمده از تست Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا در سطح RNA نتیجه ی بدست آمده از تست Real Time PCR انجام شده بر روی شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی- شده ی UCOE-DLIGLID و pOptiVEC-DLIGL به منظور بررسی بیان ژن داربی پوئتین آلفا در سطح RNA به صورت زیر بود.



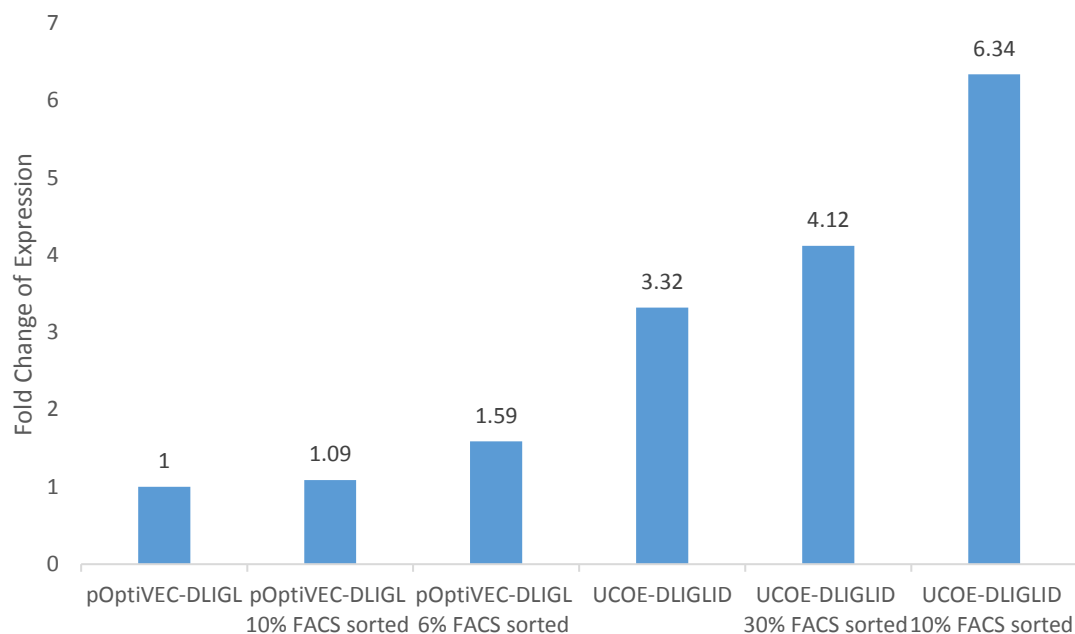
نمودار ۳-۶- نمودار حاصل از تست Real Time PCR به منظور مقایسه‌ی بیان ژن داربی پوئین آلفا در شش لاین سلولی.

نتیجه‌ی حاصل از تست Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن EGFP در سطح RNA

نتیجه‌ی بدست آمده از تست Real Time PCR انجام شده بر روی شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی-

شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID به منظور بررسی بیان ژن EGFP در سطح RNA به صورت

زیر بود.

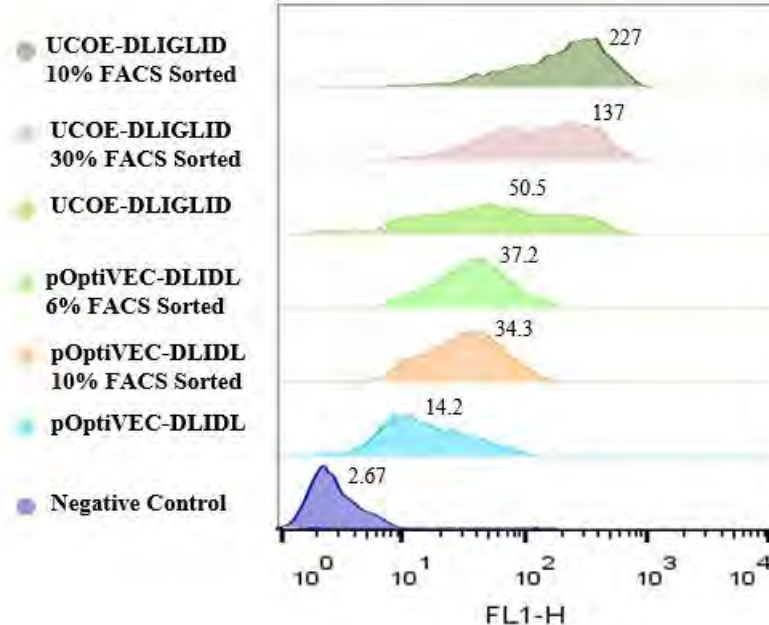


نمودار ۳-۷- نمودار حاصل از تست Real Time PCR به منظور مقایسه‌ی بیان ژن *EGFP* در شش لاین سلولی.

نتیجه‌ی بدست آمده از تست فلوسایتومتری

تست فلوسایتومتری به منظور بررسی بیان ژن *EGFP* در شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی‌شده‌ی *pOptiVEC-DLIGL* و *UCOE-DLIGLID* و مقایسه آن‌ها، انجام گردید. هرچقدر میزان انحراف نمودار متعلق به نمونه‌ی لاین سلولی مورد نظر نسبت به نمونه‌ی کنترل منفی بیشتر باشد، سطح پروتئین *EGFP* در آن بالاتر خواهد بود. اعداد نشان داده شده بالای هر نمودار، نمایانگر میانگی شدت نور فلورسنت دریافت‌شده ($MFI^{۵۶}$) در نمونه می‌باشند. نتیجه‌ی حاصل از تست فلوسایتومتری به صورت زیر بود.

^{۵۶} Mean Fluorescent Intensity



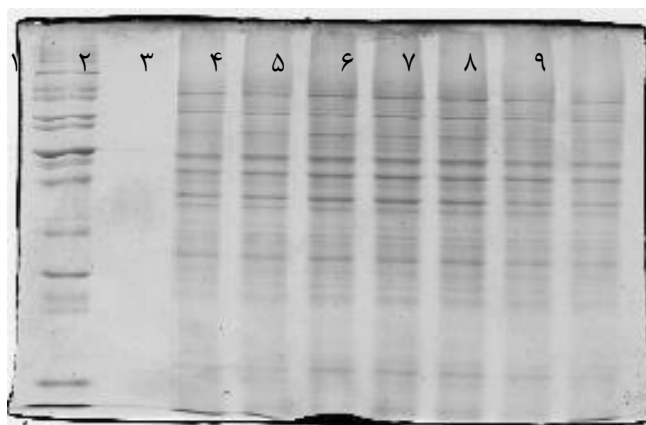
نمودار ۳-۸- نمودار حاصل از تست فلوسایتومتری به منظور مقایسه‌ی شش لاین سلولی.

۳-۵-۲-۳- نتایج حاصل از تست SDS-PAGE

نتیجه‌ی بدست آمده از تست SDS-PAGE نمونه‌های پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی

نتیجه‌ی بدست آمده از تست SDS-PAGE نمونه‌های پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی شش لاین

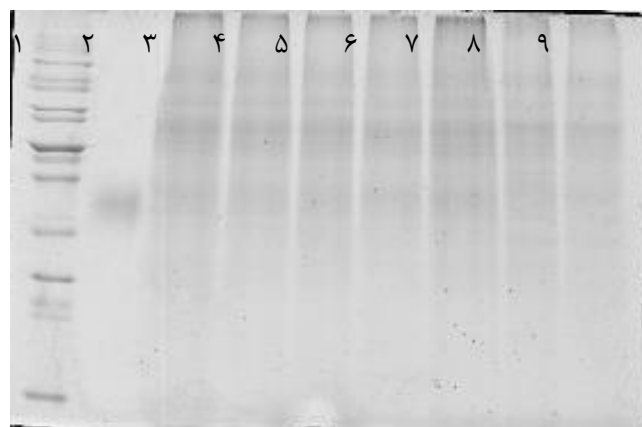
هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID به صورت زیر بود.



شکل ۳-۷۴- تست SDS-PAGE پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی. (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Unstained protein ladder (۲) کنترل مثبت (CinnaPoetin 400 IU). (۳) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL. (۴) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL 10% FACS Sorted. (۵) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC-DLIGL 6% FACS Sorted. (۶) کنترل منفی. (۷) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی UCOE-DLIGLID 30% FACS Sorted. (۸) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی UCOE-DLIGLID 10% FACS Sorted. (۹) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی UCOE-DLIGLID 10% FACS Sorted.

نتیجه‌ی حاصل از تست SDS-PAGE نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده

نتیجه‌ی بدست آمده از تست SDS-PAGE نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده‌ی شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID به صورت زیر بود.



شکل ۳-۷۵- تست SDS-PAGE پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده. (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Unstained protein ladder (۲) کنترل مثبت (CinnaPoetin 2000 IU). (۳) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده pOptiVEC-DLIGL 10% FACS Sorted. (۴) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده pOptiVEC-DLIGL 10% FACS Sorted.

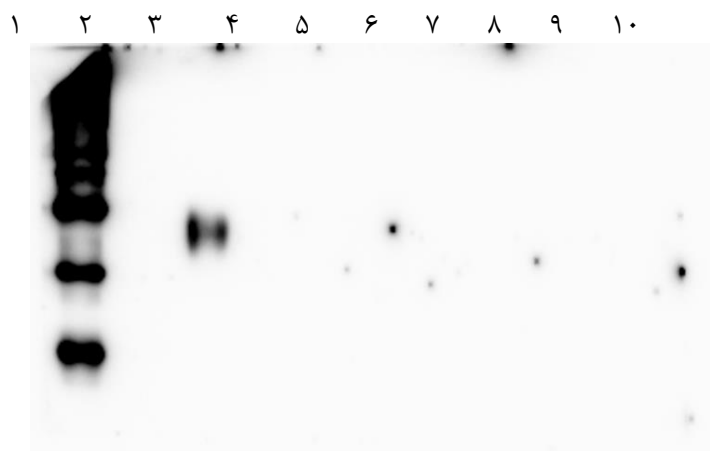
۵ نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده pOptiVEC-DLIGL 6% FACS Sorte (۶ کنترل منفی. ۷) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده UCOE-DLIGLID (۸) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده UCOE-DLIGLID 30% FACS Sorted (۹) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده UCOE-DLIGLID 10% FACS Sorted.

نتایج بدست آمده از تست وسترن بلات

در این بخش به نتایج بدست آمده از تست وسترن بلات به منظور بررسی میزان بیان ژن داربی پوئین آلفا در سطح پروتئین در شش لاین سلولی هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و مقایسه‌ی آن‌ها می‌پردازیم.

۳-۵-۴-۱- نتیجه‌ی حاصل از تست وسترن بلات نمونه‌های پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی

با توجه به ترش‌هی بودن پروتئین داربی پوئین آلفا، تست وسترن بلات نمونه‌های پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID نشان داد که بخش عمده‌ای از این مولکول به بیرون از سلول انتقال پیدا کرده و میزان این پروتئین درون سلول با استفاده از تست وسترن بلات قابل ارزیابی نمی‌باشد. نتیجه‌ی حاصل از این تست به صورت زیر بود.



شکل ۳-۷۶- نتایج حاصل از وسترن بلات پروتئین‌های استخراج شده از لاین‌های سلولی. ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین
 Magic MarkXP western Protein Standard (۲). Blank (۳). کنترل مثبت (CinnaPoetin 400IU). (۴) نمونه‌ی پروتئین
 استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC DLIGL (۵). نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC DLIGL
 10% FACS Sorted (۶). نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی pOptiVEC DLIGL 6% FACS Sorted (۷). نمونه‌ی
 پروتئین استخراج شده از لاین سلولی UCOE DLIGLID (۸). نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی UCOE DLIGLID
 30% FACS Sorted (۹). کنترل منفی. (۱۰) نمونه‌ی پروتئین استخراج شده از لاین سلولی UCOE DLIGLID 10% FACS
 Sorted.

نتیجه‌ی بدست آمده از تست وسترن بلات نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده

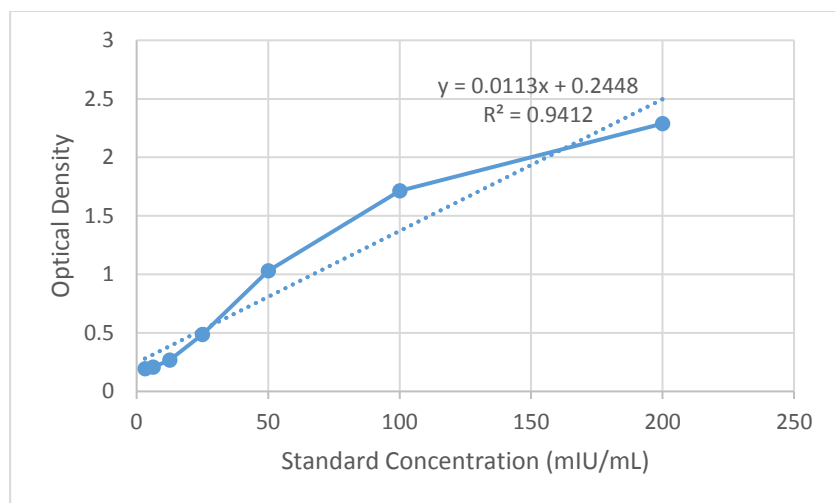
در شکل شماره‌ی ۳-۶۲ نتیجه‌ی حاصل از تست وسترن بلات نمونه‌های محیط کشت سلولی تغلیظ شده‌ی
 شش لاین هتروژن و جداسازی‌شده‌ی pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID به منظور بررسی پروتئین
 داری‌پوتین آلفا با وزن ۳۷ kDa نشان داده شده است.



شکل ۳-۷۷- نتایج حاصل از وسترن بلات محیط کشت سلولی تغلیظ شده. (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Magic (۲) MarkXP western Protein Standard (۳) Blank. (۴) کنترل مثبت (CinnaPoetin 400IU). (۵) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده pOptiVEC-DLIGL (۶) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده pOptiVEC-DLIGL 6% FACS Sorted (۷) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده UCOE-DLIGLID 10% FACS Sorted (۸) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده UCOE-DLIGLID 30% FACS Sorted (۹) کنترل منفی. (۱۰) نمونه‌ی پروتئین محیط کشت سلولی تغلیظ شده UCOE-DLIGLID 10% FACS Sorted.

بررسی کمی میزان بیان پروتئین داربی پوتئین آلفا در محیط کشت با استفاده از تست الایزا

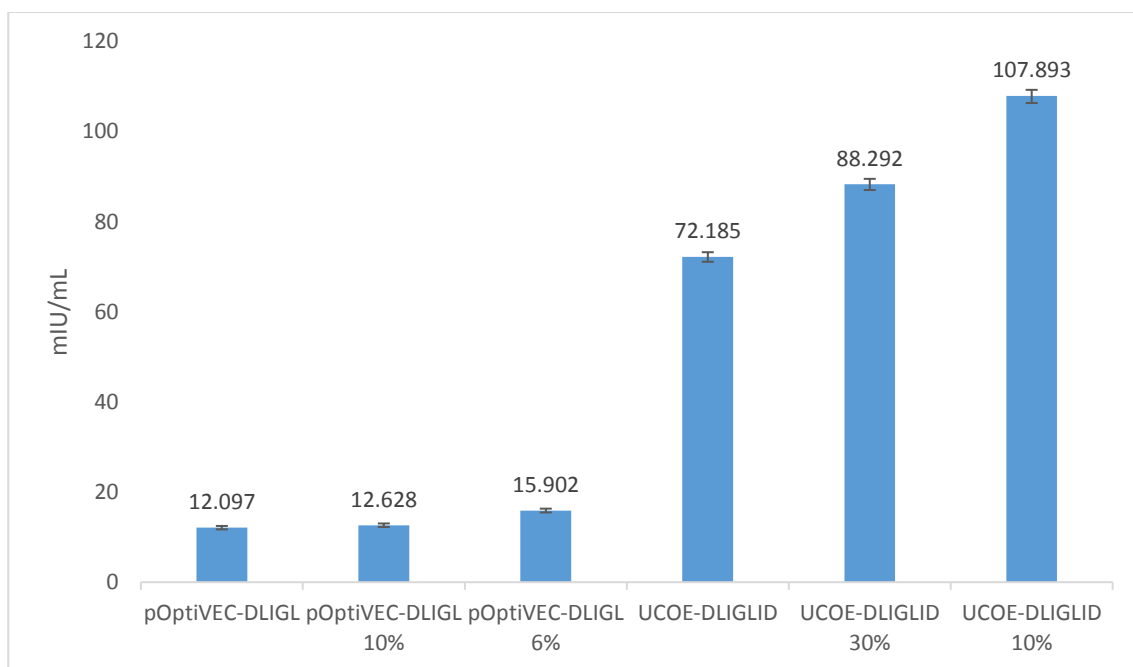
پس از آماده‌سازی پلیت الایزا، میزان $100 \mu\text{L}$ از نمونه‌های محیط کشت و پروتئین استخراج شده از رسوب سلولی دو لاین هتروژن pOptiVEC-DLIGL و UCOE-DLIGLID و چهار لاین جداسازی شده‌ی pOptiVEC-DLIGL 10%، pOptiVEC-DLIGL 6%، UCOE-DLIGLID 30%، UCOE-DLIGLID 10% به همراه استانداردهای کیت در چاهک‌ها لود گردید. پس از تکمیل مراحل و در انتها اضافه نمودن میزان $50 \mu\text{L}$ از محلول Stop Solution به هر چاهک، خوانش در طول موج 450 nm صورت گرفت. نمودار استاندارد بر اساس جذب خوانده شده به صورت زیر رسم گردید.



نمودار ۳-۹- نمودار حاصل از خوانش جذب نمونه‌های استاندارد تست الیزا.

سپس با استفاده از معادله‌ی خط نمودار جذب استاندارد ($y=0.0113x + 0.2448$)، غلظت نمونه‌ها محاسبه

گردید. نمودار زیر بیان کننده‌ی میزان بیان پروتئین داربی پوئین آلفا در محیط کشت سلول می‌باشد.

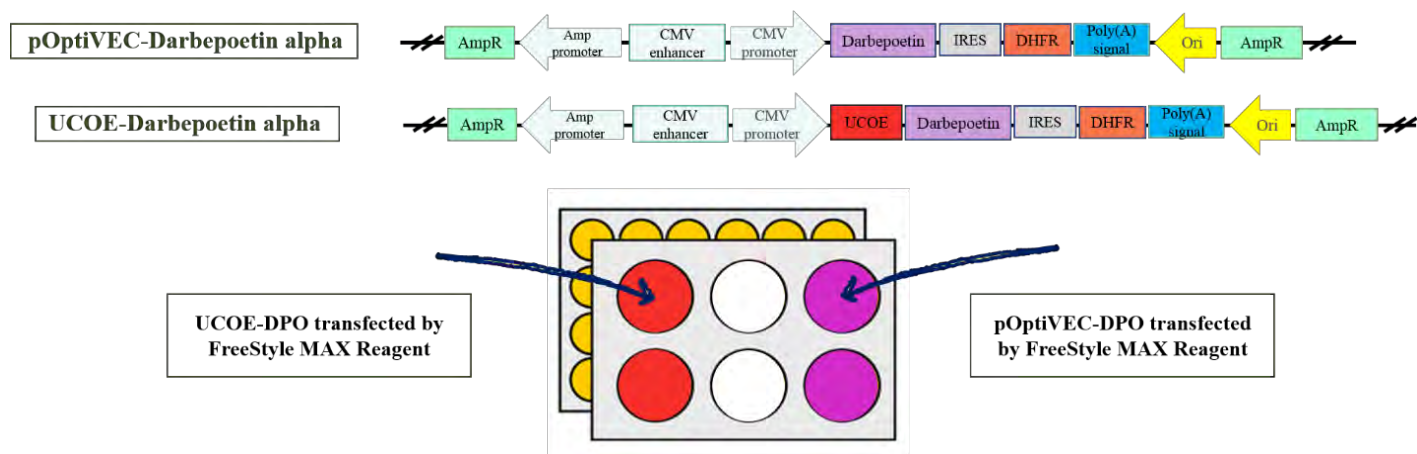


نمودار ۳-۱۰- میزان بیان پروتئین داربی پوئین آلفا بدست آمده در محیط کشت سلول با استفاده از تست الیزا

در ادامه بررسی نهایی میزان بیان در رسوب سلولی لاین ها نیز انجام شد و تست های بررسی کمی و کیفی بیان مجدداً تکرار گردید. همچنین از لاین های هتروژن موجود که دارای بیان بالاتری هستند، برای دستیابی به لاین های تک دودمانی با بالاترین میزان بیان نیز استفاده شد:

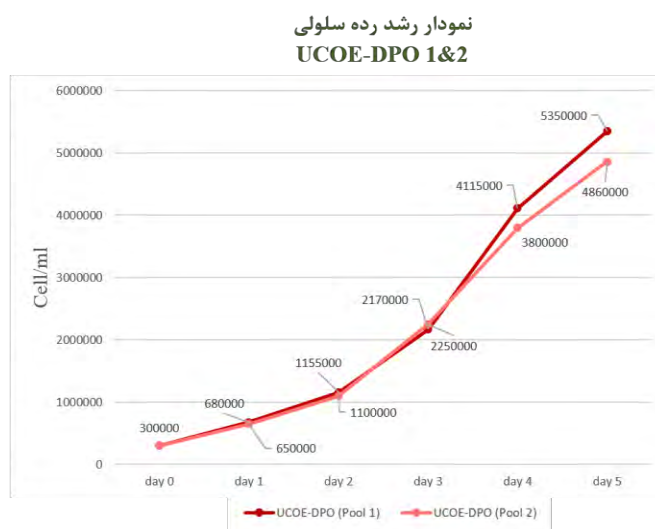
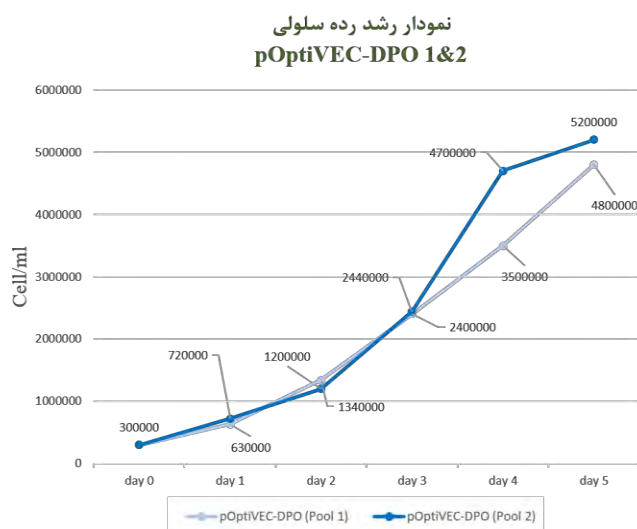
تهیه رده سلولی تولید کننده پروتئین داربی پوئتین آلفا بدون مارکر

در این مرحله هر یک از ناقل های نو ترکیب با آنزیم اختصاصی مربوط به خود خطی شدند. هر کدام از ناقل ها به صورت جداگانه به دو استخر سلولی در حجم ۳ میلی لیتر با تعداد 0.3×10^6 سلول در هر میلی لیتر ترنسفکت شدند. بنابراین دو رده سلولی دارای ناقل UCOE و دو رده سلولی دارای ناقل pOptiVEC به دست آمد.



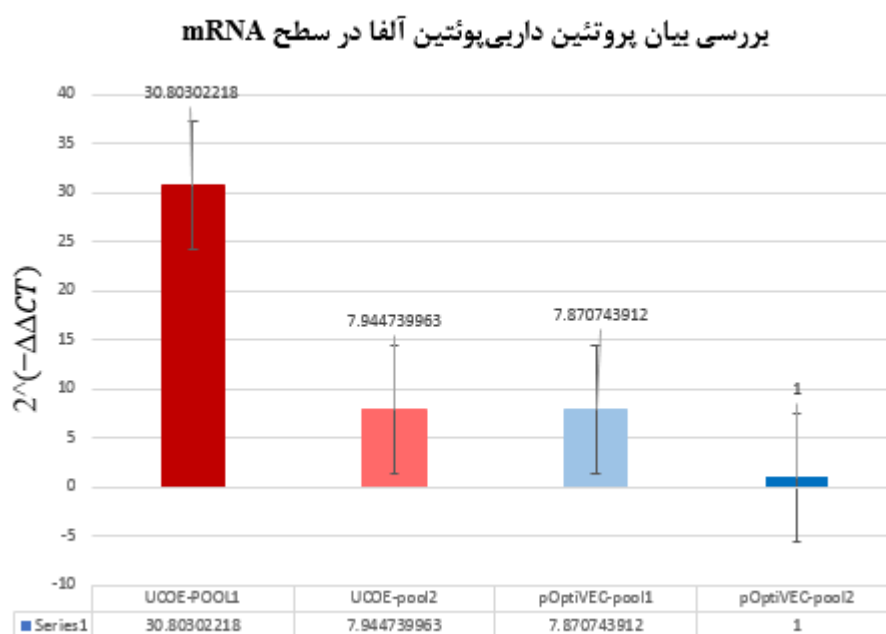
بررسی تعداد و زنده مانی سلول‌های چهار رده سلولی به دست آمده

جهت بررسی بیان داربی‌پوئین آلفا، ابتدا سلول‌های هر چهار رده سلولی در حجم ۱۰ میلی‌لیتر داخل ارلن پاساژ داده شدند و تعداد و زنده مانی آن‌ها از روز اول تا پنجم مورد بررسی قرار گرفت.



بررسی میزان بیان داری پوئتین آلفا در رده‌های سلولی توسعه داده شده

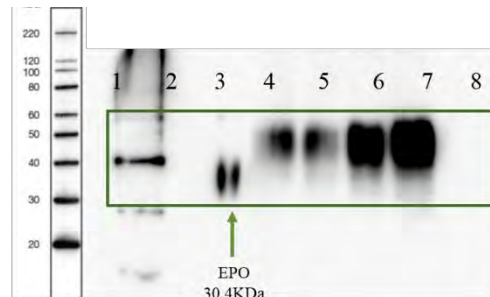
بررسی بیان در سطح mRNA بر روی هر چهار رده سلولی با تکنیک Real Time PCR انجام گرفت. به این صورت که ابتدا پلت سلولی ۳ میلیون سلول در روز پنجم پس از کشت از هر چهار رده سلولی جمع آوری شد و استخراج RNA از آن به صورت دستی صورت گرفت، سپس سنتز cDNA انجام گرفت و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بر روی آن Real Time PCR گذاشته شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بیان رده سلولی UCOE-DPO1 در سطح mRNA ۳۰ برابر بیشتر از رده سلولی pOptiVEC-DPO2 می‌باشد.



در ادامه، مجدداً بررسی بیان داربی پروتئین آلفا در سطح پروتئین با کمک تست وسترن بلائینگ انجام شد. در این تست نمونه سوپرناتانت سلولی و پروتئین استخراج شده از پلت سلولی در روز پنجم جمع آوری شد. در تأیید تست Real Time PCR رده سلولی UCOE-DPO1 بیان پروتئینی بالاتری از دیگر رده‌های سلولی به دست آمده نشان داد. همچنین نبودن هیچ گونه باند پروتئینی در تصویر دوم نشان دهنده سیگنال پپتید مناسب جهت ترشح پروتئین به خارج از سلول می‌باشد.

سوپرناتانت سلولی

۱. مارکر پروتئینی
۲. کنترل مثبت (داروی سیناپوتئین)
۳. سوپرناتانت سلولی pOptiVEC-DPO2
۴. سوپرناتانت سلولی pOptiVEC-DPO1
۵. سوپرناتانت سلولی UCOE-DPO2
۶. سوپرناتانت سلولی UCOE-DPO1
۷. کنترل منفی (سوپرناتانت سلولی فاقد ناقل بیانی)

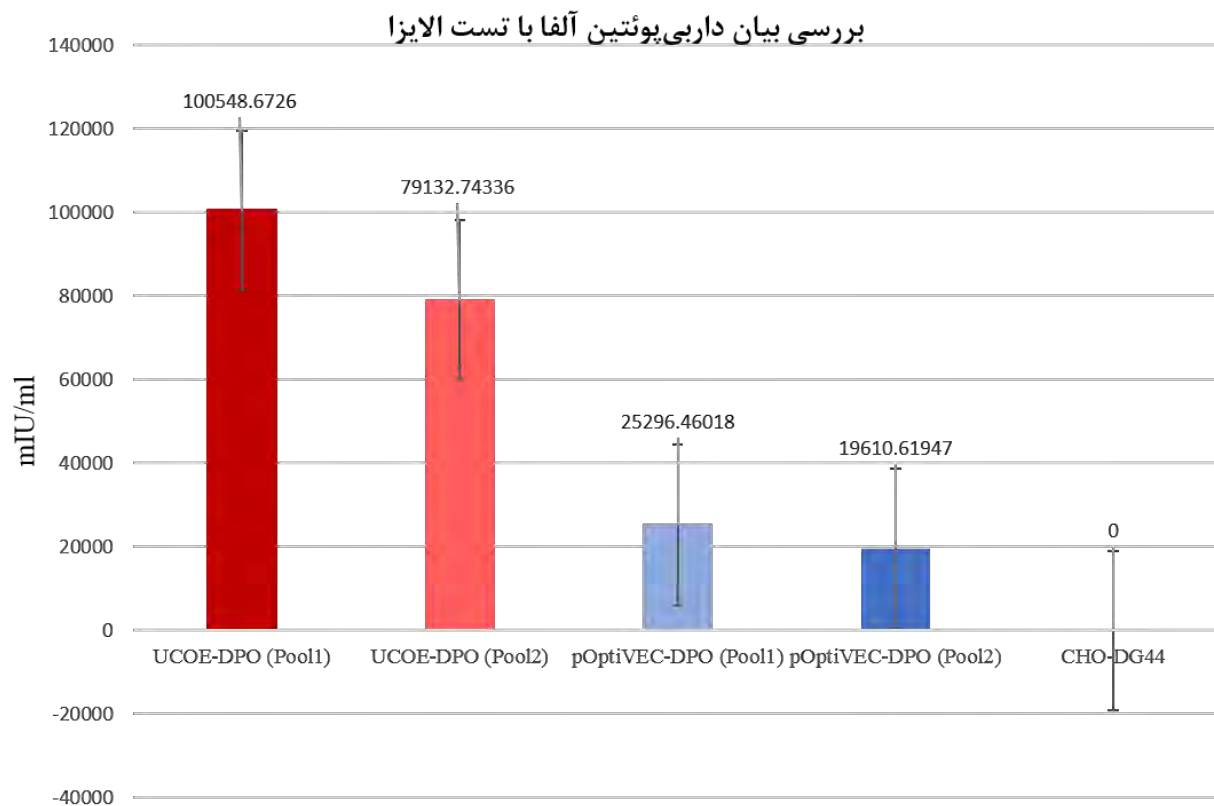


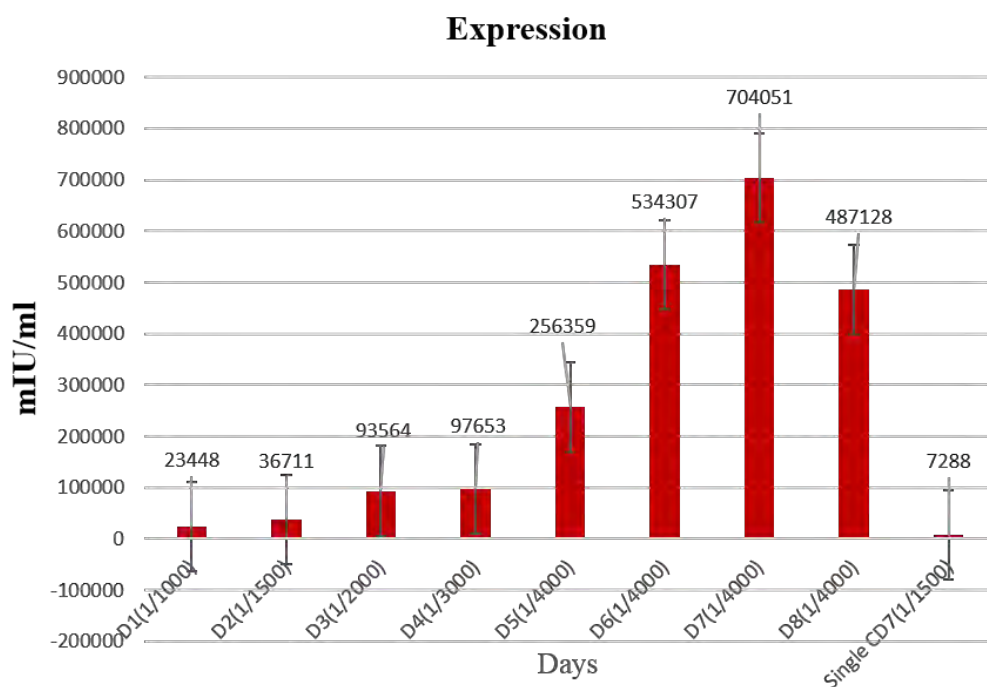
پروتئین استخراج شده

۱. مارکر پروتئینی
۲. کنترل مثبت (داروی سیناپوتئین)
۳. پروتئین استخراج شده pOptiVEC-DPO2
۴. پروتئین استخراج شده pOptiVEC-DPO1
۵. پروتئین استخراج شده از رده سلولی فاقد ناقل بیانی
۶. پروتئین استخراج شده UCOE-DPO2
۷. پروتئین استخراج شده UCOE-DPO1



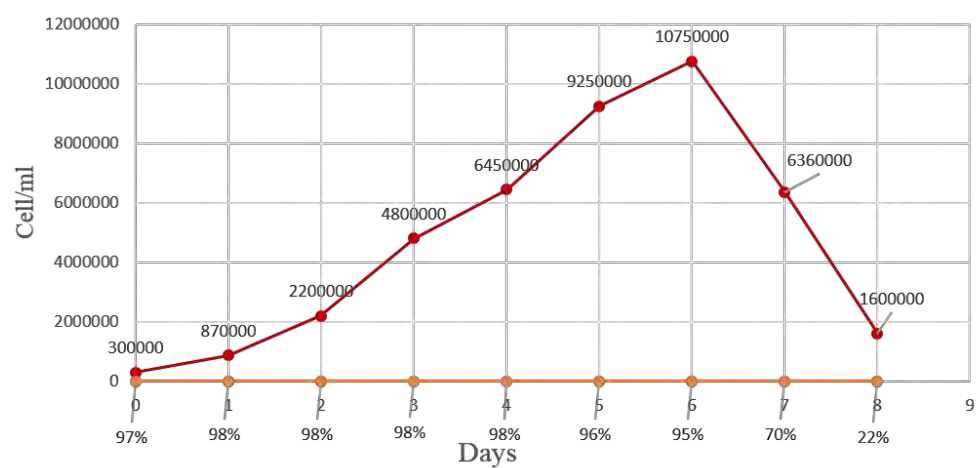
به دنبال بررسی میزان بیان پروتئین، سوپرناتانت روز پنجم هر چهار رده سلولی با استفاده از تست الایزا انجام گرفت. نمونه‌های رده سلولی pOptiVEC، ۵۰۰ برابر و نمونه‌های رده سلولی UCOE، ۱۰۰۰ برابر رقیق شدند. نتایج این تست نشان داد رده سلولی UCOE-DPO1 مانند تست‌های پیشین بیان بالاتری دارد. همچنین پروتئینی پس از بررسی نمونه‌های پروتئین استخراج شده از پلت سلولی شناسایی نشد.





پس از انتخاب بهترین رده سلولی با بالاترین میزان تولید پروتئین، پیدا کردن بهترین روز بیان در اولویت قرار گرفت. جهت انجام این کار رده سلولی UCOE-DPO1 در حجم ۳ میلی لیتر با تعداد ۳۰۰,۰۰۰ سلول پاساژ داده شد و به آن ۸ روز برای تولید و ترشح پروتئین فرصت داده شد. هر روز از سلول ها نمونه سوپرناتانت جمع آوری شد و تعداد سلول ها شمارش و زنده مانگی آن ها بررسی شد. با توجه به نتایج به دست آمده، این رده سلولی هتروژن در روز ششم بیشترین تعداد سلول و در روز هفتم بالاترین بیان را در تست انجام شده بین روزهای ۱ تا ۸ را دارا بود. همچنین به دنبال راهکاری جهت افزایش بیان، بهترین رده سلولی یعنی UCOE-DPO1 انتخاب گردید و ۳۶ تک سلول از این رده هتروژن جدا گردید.

UCOE-DPO (Pool1) Cell growth Curve



گام بعدی بیان مقایسه ای همه لاینهای حاصل با روش های qPCR و وسترن بلاتینگ و الیزا می باشد.