SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

کلون سازی فعال کننده پلاسمینوژن انسانی نوترکیب به روش RT-PCR

ساناز شهریاری ، محمد حسین قهرمانی ، سید ناصر استاد
دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده داروسازی ، آزمایشگاه تحقیقات داروشناسی

Summary:

Cloning the gene , responsible for the production of human tissue –type plasminogen activator (ht-PA) protein.t-PA is a 527 amino acid glycopeptide whit thrombolytic activity.It binds to fibrin by it's amin end and facilate fibrinolysis by activating plasmin production from plasminogen. Total RNA was extracted from Fibrosarcoma cell line (HT-1080). RT-PCR was employed to produce t-PA cDNA and was subsequently cloned into pCR2.1 vector and XL1-B cells were transformed.The cloned gene was subjected to restriction endonuclease mapping to confirm cloning of the gene. following RT-PCR reaction, RCR product was cloned into pCR2.1 vector and positive colonies in blue-white screening was picked.DNA was extracted and by using restriction enzymes, the cDNA was confirmed.The gene was cut and subcloned into pcDNA3.1 expretion vector.The final sequence was confirmed using DNA sequencing. The cloning of human tPA cDNA in an expression vector is the first step in recombinant production of this protein. Since the production of biological proteins using biotechnology, proved to be safe from contamination during purification step from tissue. We hope that cloning of human tPA will open the path to recombinant production of this valuable drug.

چکیده:

فعال کننده بافتی پلاسمینوژن (tPA) با تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین در فرایند فیبرینولیز نقش مهمی ایفا می کند و از جمله درمانهای موثر در انفارکتوس میوکارد حاد محسوب می شود. یکی از راههای تهیه این دارو تولید پروتئین آن به صورت نوترکیب می باشد و کلون سازی ژن کد کننده آن اولین قدم در این مسیر است. در این راستا RNA تام از رده سلولی HT-1080 استخراج شده، با واکنش RT-PCR تکثیر و در وکتور pCR2.1 کلون می گردد. وجود ژن tPA با استفاده از آنزیمهای اندونوکلئاز تائید شده ودر مرحله بعد ژن مذکور در وکتور حاوی پروموتور CMV کلون می گردد.Sequence Analysis جهت تائید نهایی مورد نظر می باشد. به این ترتیب ژن tPA در وکتوری که قابل بیان در سلول mammalian است کلون شده و در مراحل بعدی مورد استفاده قرار می گیرد. ما امیدواریم که کلون سازی ژن tPA به عنوان اولین قدم در مسیر تهیه نوترکیب این پروتئین راهگشای انجام مراحل بعدی و تولید این داروی باارزش گردد.

مقدمه:

فعال کننده بافتی پلاسمینوژن از جمله ترکیبات ترومبولیتیک می باشد که به عنوان اقدام اولیه در درمان انفارکتوس میوکارد حاد به کار می رود(Elliott M 2001). tPA یک گلیکوپپتید با ۵۲۷ اسید آمینه می باشد که با روش DNA نوترکیب و یا خالص سازی پروتئین تهیه می شود(Pennica D 1983). تهیه این ماده به صورت نوترکیب خلوص بالا و ممانعت از انتقال آلودگیهای ویروسی و باکتریایی را موجب می شود. tPA از انتهای آمین خود به فیبرین باند شده و پلاسمینوژن متصل به فیبرین را چندین برابر پلاسمینوژن در گردش فعال می کند و با فعال کردن پلاسمینوژن و تبدیل آن به پلاسمین موجب فیبرینولیز و از بین بردن لخته های انعقادی می شود (Bell WR ۲۰۰۲). tPA در درمان انفارکتوس قلبی حاد برای بهبود بخشیدن به عملکرد عروق، کاهش احتمال بروز نارسایی احتقانی قلب و کاهش مرگ و میر به کار می رود(Rouf SA ۱۹۹۶).

روش کار:

سلولهای HT-1080 (Fibrosarcoma) در RPMI1640 ، در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شده و RNA تام با روش Trizol استخراج می گردد.سپس با انجام واکنش Reverse Transcriptase بر روی RNA ، cDNA سلولی تهیه می شود. غلظت و کیفیت RNA و cDNA با اندازه گیری Optical Density با استفاده از دستگاه Spectrophotometer مورد تایید قرار می گیرد.در مرحله بعد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tPA (که توسط نرم افزار Primer Select طراحی شده)Coding Sequence مربوطه با اندازه ۱۶۹۸ جفت باز تکثیر می گردد.قطعه مورد نظر بعد از آشکارسازی در آگاروز ژل الکتروفورز با روش فنل- کلروفرم استخراج ، در وکتور pCR2.1 کلون و در سلول XL1-B تکثیر می شود. کلونیها توسط روش blue and white screening غربال شده و وکتور حاوی قطعه مورد نظر با روش Alkaline lysis استخراج می شود. در مرحله بعد وجود ژن tPA با استفاده از آنزیمهای اندونوکلئاز تائید می شود. بعد از تائید اولیه با استفاده از دو آنزیم در Multiple Cloning Site وکتور ، قطعه خارجی جدا شده و پس از تائید جهت بیان در وکتور حاوی پروموتور CMV کلون می گردد. Sequense Analysis جهت تائید نهایی صورت می گیرد.

نتایج:

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن tPA که توالی آنها در ذیل قید شده قطعه ای با اندازه ۱۶۸۹ جفت باز تولید می شود.

Forward: CCATGGATGCAATGAAGAGAG
Reverse: TCACGGTCGCATGTTGTCAC

جهت تائید وجود ژن و صحت آن از آنزیم اندونوکلئاز SacI که قطعاتی با اندازه 1380 و ۴۲۳۸ و آنزیم اندونوکلئاز BgLII که قطعاتی با اندازه 2574 و ۳۰۴۴ در ژن tPA ایجاد میکند،استفاده می شود. نتیجه این بررسی مطابق با یافته های بررسی نرم افزاری توالی ژن tPA ، وجود قطعه خارجی را به صورت Sense تائید می کند.

جهت خارج کردن ژن کدکننده tPA از دو آنزیم HindIII و XhoI که از دو طرف ژن کلون شده برش ایجاد می کنند، استفاده می شود. حاصل بدست آمده در محل برش مشابه در وکتور pcDNA3.1 کلون میگردد.
نتایج Sequence Analysis وجود قطعه خارجی را تائید خواهد کرد.

بحث:

در این طرح ژن کدکننده tPA در وکتوری با قابلیت بیان در mammalian cell کلون گردید. از آنجائیکه کلون سازی ژن اولین قدم در تولید پروتئین مورد نظر به صورت recombinant میباشد، راه برای انجام مراحل بعدی و تولید داروی مذکور در مقیاس وسیع هموار شده است.امید است که طرح حاضر راهگشای انجام سایر مراحل شده و تولید داخلی این دارو جایگزین نوع وارداتی گردد.

1.Elliott M. Acute Myocardial Infarection. In: HARRISON TR, editor. Principles of internal Medicine. 15th ed. McGraw Hill; 2001. p1391-1393.(Disorders of the cardiovascular system;Vol 2).
2. Pennica D. Cloning and expression of human tissue- type plasminogen activator cDNA in E.coli. Nature. 1983;301:214-221.
3. Bell WR. et al. Therapeutic Agents- pharmacokinetics and pharmacodynamics. Rev cardio vasc Med. 2002;3:34-44.
4. Rouf SA. et al. Tissue type plasminogen activator: charactertics, application and prodoction technology. Biotech Adv. 1996; 14(3):239-66.

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI