**ایجاد رده سلولی پایدار جهت تولید فسفولیپاز A2 نوترکیب زنبور عسل ( *آپیس ملیفرا*)**

محمد طاهری1، صدیقه نبیان2\*، سارا علیان 3، پرستو یوسفی1، عباس گرامی صادقیان2

1آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

3دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران2 بخش زنبورعسل دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

نویسنده مسئول: صدیقه نبیان

nabian@ut.ac.ir

تلفن: 09126305890

**مقدمه:** رده های سلولی پایدار، سلول های نامیرایی هستند که به صورت ثابت و پیوسته ژن مورد نظر را بیان می نمایند. این سلول ها جهت تولید پروتئین های نوترکیب برای اهداف درمانی و تحقیقاتی و ژن درمانی کاربرد وسیعی دارند. اگرچه پروتئین های نوترکیب توسط ترانسفکشن موقت قابل تولید هستند اما جهت تولید در مقیاس بالا با صرفه اقتصادی، سلول های پایدار مناسب تر می باشند( Wurm, 2004). برای این منظور سلول های(Chinese Hamster Ovary) CHO بصورت مناسبی با پلاسمید حاوی ژن مورد نظر ترانسفکت می گردند سپس پلاسمید به صورت اتفاقی در ژنوم میزبان جاسازی(integration) می گردد. همچنین می توان ژن های جاسازی شده را توسط سیستم دی هیدرو فولات ردوکتاز تکثیر نمود بطوری که تعداد ژن مورد نظر در هر سلول تا 1000 برابر قابل افزایش می باشد. که این فرآیند، در صنعت داروسازی کاربرد فراوانی دارند(Southern and Berg, 1982). زهر زنبورعسل دارای ترکیبات پیچیده ای از جمله پلی پپتیدها، آنزیم ها، آمین ها می باشد که برخی از آن ها دارای خواص ضد التهابی و برخی از آن ها دارای خواص سمی و آلرزن می باشد. لذا شناسایی عملکرد مفید و مضر هر کدام از این ها می تواند جهت شناخت بیشتر مکانیسم های التهابی مفید واقع گردد( Gihyun and Hyunsu , 2006).

فسفولیپاز A2 بعنوان یکی از ترکیبات مهم زهر زنبور عسل می باشد که حدود 10-12 درصد ماده خشک زهر را به خود اختصاص می دهد و بعنوان یک آلرژن عمده مطرح می باشد. این آنزیم در حشرات دیگر، آراکنیدها، مارها و سلول های پستانداران یافت می شود و عملکرد آن هیدرولیز پیوند استری دوم گلیسروفسفولیپیدها و آزاد شدن اسیدهای چرب و لیز فسفولیپیدها می باشد. همچنین در سلول ها سبب آزادسازی آراشیدونیک اسید و تولید ایکوزانوئیدها می گردد که از واسطه های التهابی قوی می باشند (Murakami et al. 2015). فسفولیپاز کاربرد های کلینیکی متنوعی دارد.

**مساله:**

با توجه به کاربردهای کلینیکی فراوان فسفولیپاز A2 ، بنظر می رسد که کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن می تواند کاربردهای درمانی و دارویی داشته باشد. تهیه رده سلولی پایدار بمنظور تولید پروتئین نوترکیب فسفولیپاز A2 می تواند در جهت تحقیقات دارویی می تواند مفید باشد.

**روش پژوهش:**

1. **تهیه وکتور حاوی ژن**

در ابتدا توالی پروتئین فسفولیپاز A2 زهر زنبور از NCBIاستخراج گردید(NP\_001011614.1)و پس از ترجمه معکوس آن به DNA و مطلوب سازی ان جهت بیان مناسب در سلول های CHO ژن موردنظر توسط کمپانی بیوتک سنتز گردید و در پلاسمید pcDNA (+3.1)کلون گردید. این پلاسمید حاوی یک پروموتور قوی جهت بیان مناسب در سلول های پستانداران و ژن مقاومت به نئومایسین بعنوان مارکر انتخابی می باشد.

1. **ترانسفکشن**

 ابتدا پلاسمید حاوی ژن جهت تکثیر و ازدیاد وارد باکتری اشرشیا کلای Dh5α به روش شوک حرارتی گردید و سپس باکتری های ترانسفکت شده بر روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. سپس یک تک کلنی به محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین انتقال یافت و پس از گرمخانه گذاری در حرارت 37 درجه بمدت یک شب پلاسمید حاوی ژن با کمک کیت استخراج پلاسمید تهیه شده از شرکت NBST استخراج گردید. در مرحله بعد جهت ترانسفکشن سلول های یوکاریوتی CHO با پلاسمید حاوی ژن از روش کلسیم فسفات استفاده شد. بطوری که 15-20 میکروگرم از DNAبا 124 میکرولیتر از کلرور کلسیم 2 مولار مخلوط شد و حجم آن به 1 سی سی رسانده شد و به آرامی با 1 سی سی از محلول حاوی بافر Hepes X 2 مخلوط گردید. سپس 1 سی سی از مخلوط مذکور بر روی سلول های CHO کشت داده شده در یک فلاسک 25 میلی لیتری ریخته شد. پس از گذشت 16 ساعت محلول رویی برداشته شد و 10 میلی لیتر از محیط کشت سلول تازه بر روی پلیت اضافه گردید.

1. **انتخاب سلول های ترانسفکت شده در حضور آنتی بیوتیک نئومایسین**

در مرحله قبل حداقل دوز مناسب آنتی بیوتیک که سبب کشتن سلول ها پس از 10 روز مجاورت می گردد 4500 میکروگرم در میلی لیتر تعیین شده بود که به این منظور غلظت های مختلف نئومایسین به سلول های کشت داده شده در پلیت 24 خانه بدست آمده بود بطوری که محیط حاوی انتی بیوتیک با غلظت های مختلف 0-100-200-400-800-1600-2500-3200-4500-6000 میکروگرم در میلی لیتر هر 3 روز یکبار بمدت 2 هفته تعویض می شد. سپس به فلاسک 25 میلی لیتر حاوی سلول های CHO ترانسفکت شده نئومایسین با غلظت 4500 میکروگرم در میلی لیتر اضافه گردید بعد از گذشت حدود 2 هفته سلول های زنده جمع آوری گردید و داخل گوده پلیت 6 خانه ای بعنوان جمعیت پلی کلونال کشت داده شد. جهت ایجاد رده های منوکلونال از روش کشت با رقت محدود در پلیت 96 خانه استفاده گردید بطوری که در هر یک از خانه ها تنها یک سلول قرار داده شد و کلون های ایجاد شده از آن ها بعنوان رده های منوکلونال در نظر گرفته شدند.

1. **غربالگری**

پس از رشد سلول ها در پلیت 96 خانه محلول رویی آن ها با استفاده از روش SDS-PAGE و ارزیابی فعالیت آنزیمی جهت تایید تولید انزیم بررسی گردید و کلون های تولیدکننده آنزیم ابتدا تکثیر شده و سپس فریز گردید تا در مواقع لزوم کشت در مقیاس وسیع بتوان از آن استفاده نمود( Hacein et al. 2003).

1. **انجام آزمايشSDS-PAGE**

براساس روش لملي 1970و توسط د ستگاه الكتروفورز عمودي (بيوراد( جهت جدا نمودن باند هاي پروتئيني، از ژل

متراكم كننده 5 درصد و ژل جدا كننده 12 درصد استفاده شد .

جهت آماده سازي نمونه 20 ميكروليتر از سلول لیز شده در بافر لیزات ( 20 میلی مولار تریس با pH=8 ، 2 میلی مولار EDTA، 5/0 % ترایتون X100 و 5/0% SDS) را با 20 میکرولیتر با 20 ميكروليتر بافر نمونه SDS-PAGE

مخلوط نموده و پس از گذشت 5 دقيقه، 12 ميكروليتر آن را داخل گوده مربوطه ريخته و براي تعيين وز ن مولكولي باندهاي بدست آمده، از ماركر پروتئيني استفاده گرديد .سپس ولتاژ دستگاه روي 80 ولت تنظيم شد و تا زمان رسيدن خط رنگ به انتهاي ژل عمل الكتروفورز ادامه مي يافت. پروتئین ها براساس وزن مولكولي خود روي ژل حركت مي نمودند. پس از اتمام الكتروفورز، ژل از دستگا ه خارج گرديد و جهت رنگ آميزي استفاده گرديد.

1. **رنگ آميزي ژل با استفاده از رنگ كوماسي بلو**

الف – تهيه محلول رنگ:

2 گرم پودر كوماسي بلو را با 900 ميلي ليتر متانول 50 % و 100 ميلي ليتر اسيد / به منظور تهيه محلول رنگ ،

استيك گلاسيال مخلوط كرديم.

ب – تهيه محلول رنگبر:

جهت ساخت محلول رنگبر 300 ميلي ليتر متانول ، 600 ميلي ليتر آب مقطر و150 ميلي ليتر اسيد استيك را با هم مخلوط كرديم. ژل را به مدت نيم ساعت در محلول رنگ قرار داده و سپس آن را از محلول رنگ خارج نموده و در محلول رنگ بر قرار می داديم، تا باندهاي پروتئيني آبي رنگ مشخص گردند. سپس از ژل تصويربرداري صورت ميگرفت.

1. سنجش فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2

اندازه گیری فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از روش Owen et al. 1990 انجام پذیرفت. یک زرده تخم مرغ در 200 میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل گردید سپس 10 میلی لیتر از آن با 2 میلی لیتر از کلرور کلسیم 3 میلی مول در لیتر مخلوط گردید و 2 میلی لیتر از محلول 5 درصد آلبومین سرم گاو و 2 میلی لیتر از محلول 13 میلی مول در لیتر سدیم داکسی کولات و 4 میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و pH با اضافه کردن هیدروکسید سدیم بر روی عدد 8 تنظیم شد. سپس بمنظور تایید ترانسفکت شدن ، فعالیت آنزیمی با اضافه کردن 1 میلی لیتر از محلول رویی سلول های CHO ترانسفکت شده به مخلوط مذکور و انکوباسیون به مدت مدت نیم ساعت در حرارت آزمایشگاه، مقدار کاهش pH که بواسطه آزادسازی اسیدهای چرب صورت می پذیرد اندازه گیری گردید. لازم به ذکر است که بطور همزمان از نمونه کنترل فاقد پلاسمید حاوی ژن فسفولیپاز A2 جهت تایید روش فوق استفاده گردید.

**یافته ها**

توالی پروتئینی فسفولیپازA2 بدست آمده از داده پایگاه NCBI به شرح ذیل بدست آمد. چنانچه ملاحظه می گردد توالی اول حاوی سیگنال پپتید می باشد در حالی که توالی دوم فاقد سیگنال پپتید است و وزن مولکولی آن توسط نرم افزار expasy حدود 17 کیلو دالتون بدست آمد.

MQVVLGSLFLLLLSTSHGWQIRDRIGDNELEERIIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACCRTHDMC

PDVMSAGESKHGLTNTASHTRLSCDCDDKFYDCLKNSADTISSYFVGKMYFNLIDTKCYKLEHPVTGCGE

RTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWFDLRKY

 10 20 30 40 50 60
MQVVLGSLFL LLLSTSHGWQ IRDRIGDNEL EERIIYPGTL WCGHGNKSSG PNELGRFKHT

 70 80 90 100 110 120
DACCRTHDMC PDVMSAGESK HGLTNTASHT RLSCDCDDKF YDCLKNSADT ISSYFVGKMY

 130 140
FNLIDTKCYK LEHPVTGCGE RTEGRCLHY

Theoretical pI/Mw: 6.21 / 16773.96

بمنظور تایید ترانسفکشن از رشد سلول ها در حضور آنتی بیوتیک نئومایسین استفاده گردید بطوری که سلول های حاوی پلاسمید بواسطه دارا بودن نئومایسین فسفوترانسفراز در محیط حاوی 4500 میکروگرم نئومایسین رشد نمودند.

در آزمایش SDS-PAGE باندهایی با وزن مولکولی حدود 16-19 کیلودالتون بدست آمد که می تواند مربوط به ایزوفرم های مختلف فسفولیپازA2 باشد.

**1 2 3 4**



**35**

**11**

**180**

**48**

**25**

**17**

**75**

شکل 1 - آنالیز نتایج مربوط به بیان فسفولیپاز A2

1 . مارکر وزن مولکولی پروتئین

2و 3 . لیزات سلول های CHO ترانسفکت شده

4 . محلول رویی کشت سلول های CHO ترانسفکت شده

**سنجش فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A2**

بدنبال استفاده از زرده تخم مرغ بمنظور سنجش فعالیت آنزیمی فسفولیپازA2 pH محلول حاوی زرده تخم مرغ از 8 به عدد 7 تقلیل یافت. در حالی که چنین تغییری در نمونه کنترل که فاقد پلاسمید حاوی ژن بود مشاهده نگردید.

**بحث**

زهر زنبورعسل سبب ایجاد واکنش های آنافیلاکتیک وابسته به IgE در افراد آلرژن می گردد. لذا تشخیص آلرژی به زهر زنبورعسل با استفاده از اجزای زهر زنبور یک روش مناسب و ضروری می باشد. تولید فسفولیپازA2 نوترکیب بعنوان یکی از آلرژن های زهر زنبورعسل می تواند جهت استفاده از روش های تشخیصی مانند الایزا، با استفاده از سرم بیماران دچار آلرژی مفید واقع گردد. همچنین فسفولیپازA2 نوترکیب از زهر زنبورعسل می تواند به شناخت مکانیسم های مولکولی آلرژی به زهر زنبورعسل کمک نماید و بعنوان یک ابزار درمانی استفاده گردد. از خاصیت ضد التهابی زهر زنبورعسل در درمان بیماری های اتوایمیون مثل آرتریت روماتوئید و مالتیپل اسکلروزیس استفاده می شود. فسفولیپازA2 دارای خواص تعدیل کننده ایمنی می باشد و در بیماری های متنوعی مانند آسم و پارکینسون دارای اثرات درمانی می باشد. لازم به ذکر است که این ترکیب در غلظت های بالا می تواند سبب آسیب به غشای سلول و در نتیجه القای نکروز سلولی و بدنبال آن اثرات مضر گردد ( Gibyun, 2016). لذا ارزیابی اثرات مضر و مفید فسفولیپاز A2 در روند ایمونوتراپی و سایر تحقیقات ضروری می باشد. بدین منظور، جهت بیان مداوم ژن تولید سل لاین های پایدار مورد نیاز است. تهیه لاین های سلولی پایدار جهت تهیه پروتئین های نوترکیب دارویی، تحقیقاتی و تشخیصی و آنتی بادی های مونوکلونال در سطوح بالا بخش مهمی از تحقیقات داروسازی را به خود اختصاص می دهد. که بطور قابل ملاحظه ای سبب صرفه جویی در وقت و هزینه می گردد و سبب بیان ژن موردنظر بطور مداوم و کنترل شده می گردد. همچنین از آن جایی که برخی از اپی توپ ها بواسطه تغییرات پس از ترجمه ایجاد می شوند لذا بیان فسفولیپازA2 در سلول های یوکاریوتیCHO ضروری می باشد. در مطالعه حاضر توالی پروتئین فسفولیپازA2 که از NCBIبدست آمد حاوی 167 اسید آمینه بود که 18 اسید آمینه آن مربوط به پپتید راهنما ( signal peptide) است و همچنین توسط نرم افزار Expasy مقدار وزن مولکولی این آنزیم حدود 17 کیلودالتون محاسبه گردید که در آزمایش SDS-PAGE نیز این نتیجه تایید گردید و با مطالعه Shen و همکاران 2010 نیز همخوانی داشت. در تحقیقات آن ها طیف 16-18 کیلودالتون برای این آنزیم ذکر گردیده بود که علت این تنوع وزن را ناشی از الگوهای قندی شدن ( glycolization) متفاوت اعلام کردند. همچنین میزان بیان پایین این پروتئین می تواند ناشی از ماهیت سمی آن باشد که سبب ایجاد صدمه به سلول های CHO می گردد که در تحقیقات Shenو همکاران 2010 نیز توصیف شده است.

در پوهش حاضر، بمنظور تایید فعالیت آنزیمی از محلول زرده تخم مرغ حاوی کلرور کلسیم استفاده گردید و pH محلول حاوی زرده تخم مرغ از 8 به عدد 7 تقلیل یافت که موید فعالیت آنزیم فوق می باشد. خانواده فسفولیپازA2 در موجودات مختلف، گروهی از آنزیم های خارج سلولی را تشکیل می دهندکه از نظر ساختمانی شبیه به هم هستند و وابسته به کلسیم می باشند. هر کدام از این آنزیم ها از نقطه نظر سوبسترا و توزیع سلولی و بافتی با یکدیگر تفاوت هایی دارند که سبب تمایز نقش بیولوژیک آن ها می گردند. برای مثال در پستانداران آنزیم های فسفولیپازA2 گروه 3 همولوگ فسفولیپازA2 زهر زنبورعسل می باشند و در بلوغ اسپرم و ایجاد آرترواسکلروزیس نقش ایفا می نمایند (Shen et al. , 2010).

فسفولیپازA2 زهر زنبورعسل هم دارای خواص مفید و هم دارای خواص مضر می باشد. از خواص مفید آن می توان به خاصیت ضد التهابی (60) در درمان بیماری های اتوایمیون اشاره نمود که بواسطه افزایش تولید لنفوسیت هایT تنظیمی ( regulatory T-cell و افزایش اینترلوکین 10 از سلول های عرضه کننده آنتی ژن می باشد. بطوری که در شرایط آلرژی می تواند سبب کاهش فعالیت های لنفوسیت های Th2 و متعاقبا جلوگیری از تولید IgE اختصاصی می گردد. همچنین فسفولیپازA2 زهر زنبورعسل دارای اثرات ضد توموری با مکانیسم ایجاد صدمه به غشای سلول های سرطانی می باشد و بواسطه ایجاد پیامبرهای ثانویه ( secondary messenger) وتداخل در انتقال سیگنال سبب تعدیل تکثیر سلولی و تنظیم چرخه سلولی می شود. همچنین Boutrin و همکاران سال 2008، اثرات فسفولیپازA2 زهر زنبورعسل را بر روی باکتری ها و انگل ها گزارش نمودند. از اثرات مضر فسفولیپاز زهر زنبور عسل می توان به خاصیت نوروتوکسیک آن اشاره نمود بطوری که محققین نشان داده اند تزریق مستقیم این آنزیم به داخل سیستم عصبی مرکزی رت در یک رویه وابسته به دوز می تواند سبب دمیلونیزاسیون گردد.

**References:**

Boutrin MC, Foster H, Pentreath VW. 2008. The effect of bee ( Apis mellifera) venom phospholipase A2 on Trypanosoma brucei brucei and enterobacter, Exp. Parasitol, 119, 246-251.

Deok- Sang H, Sun Kwang K, Hyunsu B. 2015.Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases, Toxins, 7, 2413-2421.

Gihyun L, and Hyunsu B. 2016. Bee venom phospholipase A2:Yesterday,s enemy Becomes today,s friend, Toxins, 8, 48.

Hacein- Bey- Abine S, Von kale C, Schmidt M. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for Scid-X1. Science, 302: 415-419.

Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685.

Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. 2015, A new era of secreted phospholipase A2, L. Lipid Res, 56, 1248-1261.

Owen MD, Pfaff L A, Reisman R E, Wypych. 1990. Phospholipase A2 in venom extracts from honey bees ( Apis mellifera) of different ages Toxicon, 28 (7): 813-820.

Shen L, Ding M, Zhang L, Zhang W, Liu L, Li D. (2010). Expression of bee venom phospholipase A2 from Apis cerana in the baculovirus- insect cell. J. Zheijang University- Science B ( Biomedical & Biothecnology).

Southern, P. J, Berg P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter, J Mol.Appl Genet, 1: 327-344.

Wurm F.M. 2004. Oroduction of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature Biotechnol, 22: 1393-1398.

:

**Generation of stable cell line for production of honey bee *(Apis mellifera*) phospholipase A2**

**Mohammad Taheri1, Sedigheh Nabian2, Sara Alian3, Parstoo Yousefi1, Abbas Gerami Sadeghian2**

*1 Restegar central research laboratory, Faculty of veterinary medicine, Tehran University*

*2 Honey bee department, Faculty of veterinary medicine, Tehran University*

*3 Educated of veterinary medicine, Faculty of veterinary medicine, Tehran University*

**Abstract:**

**Introduction:** Honey bee venom contains a variety of enzymes such as: phospholipase A2, hyaloronidase, Acid phosphatase, …) which phospholipaseA2 is one of the most abundant.

Raising of our knowledge about this enzyme can be useful for pharmacy industry. Since the mentioned enzyme is one of the most lethal components of insect and reptiles venom and also is an important allergen, so its production by stable cell line for pharmacological studies is necessary. The generation of stable cell line is required for permanent gene expression. This method for recombinant protein production (pharmacology, researches, diagnostic purposes) and monoclonal antibodies in large level is noted which can save time and cost and express the target gene permanently.

**Aim**: The production of stable cell line for expression of phospholipaseA2 of honey bee ( *Apis mellifera*) venom.

**Material and methods:**

These processes were included of gene synthetize, vector construction and transfection. Based on random integration of PLA2 sequence, selection of cells by antibiotic resistance, screening of transfected cells, multiplying the selected clones and protein purification. We amplified the plasmid in *E coli* after synthetizing PLA2 gene and its insertion in PCDNA vector constructed by Biotech Company. Afterwards CHO cells transfected with plasmid containing mentioned gene using caCl2 method. Gene expression in Hams F12 medium contained Neomycin performed. Determination of suitable antibiotic concentration was performed. Usually non inserted cells by plasmid will be died, but the cells contained plasmid survive after 9 days. Confluent plates could be considered as polyclonal lines. These polyclonal cells were cultured in 96 wells plate by using limiting dilution method for selection of monoclonal clones.

Finally, supernatant was collected and concentrated for SDS-PAGE in order to investigation and protein expression.

**Result and conclusion:**

The electrophoretic test was performed for confirmation of expression PLA2 gene in supernatant cells and the expected band with approximately 18 kDa Molecular weight was obtained which this result with finding of other researcher was matched. Since, PLA2 is one of the most important toxic and allergic component in bee venom. So that, diagnostic and therapeutic research about the mentioned enzyme needs to purified and adequate protein. The production of this protein by stable cell lines provide suitable amount of protein in saving time and cost.

**Key Words:** *Honey bee venom, Phospholipase A2, Stable cell line*

**ایجاد رده سلولی پایدار جهت تولید فسفولیپاز A2 نوترکیب زنبور عسل ( *آپیس ملیفرا*)**

محمد طاهری1، صدیقه نبیان2\*، سارا علیان 3، پرستو یوسفی1، عباس گرامی صادقیان2

1آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

3دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران2 بخش زنبورعسل دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

نویسنده مسئول: صدیقه نبیان

**چکیده فارسی:**

**بیان مسئله:** در زهر زنبور عسل آنزیم های مختلفی مانند فسفولیپازA2 ، هیالورونیداز، .اسید فسفاتاز، ..... ) وجود دارد که آنزیم فسفولیپاز یکی از فراوانترین آن ها است. لذا افزایش اطلاعات در رابطه با این آنزیم می تواند برای صنعت داروسازی مفید باشد. از ان جایی که این آنزیم یکی از کشنده ترین اجزای سم حشرات و خزندگان می باشد و همچنین در زهر زنبورعسل بعنوان آلرژن مطرح است لذا تولید آن توسط ایجاد رده های سلولی پایدار جهت مطالعات فارماکولوژیک ضروری می باشد. در صورت نیاز به بیان مداوم ژن، تولید سل لاین های پایدار مورد نیاز است. تهیه لاین های سلولی پایدار جهت تهیه پروتئین های نوترکیب دارویی، تحقیقاتی و تشخیصی و آنتی بادی های مونوکلونال در سطوح بالا بخش مهمی از تحقیقات داروسازی را به خود اختصاص می دهد. که بطور قابل ملاحظه ای سبب صرفه جویی در وقت و هزینه می گردد و سبب بیان ژن موردنظر بطور مداوم و کنترل شده می گردد.

**هدف پژوهش:** تولید رده سلولی پایدار جهت بیان فسفولیپازA2 زهر زنبور عسل ( *آپیس ملیفرا*)

**روش کار:** این پروسه شامل سنتز ژن و طراحی وکتور، ترانسفکشن و جای گیری توالی ژن مورد نظر داخل ژنوم و انتخاب این سلول ها بر اساس مقاومت انتی بیوتیکی، غربالگری ازدیاد و تکثیر کلون های انتخاب شده و تخلیص پروتئین ها می باشد. پس از سنتز ژن فسفولیپاز A2 و قرار دادن آن در وکتور PCDNA توسط کمپانی ماکروژن اقدام به ازدیاد پلاسمید در باکتری اشرشیا کلای گردید.سپس ترانسفکت نمودن سلول های CHO، با پلاسمید حاوی ژن با روش کلرور کلسیم و بیان ژن در محیط کشت هامز اف 12 حاوی آنتی بیوتیک نئومایسین. در سه مرحله تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک، ترانسفکشن و انتخاب و ازدیاد کلون های حاوی پلاسمید انجام پذیرفت. بطور معمول اغلب سلول هایی که پلاسمید وارد ان ها نشده است می میرند ولی سلول های حاوی پلاسمید بعد از 9 روز زنده می مانند. پس از این که پلیت کاملا از سلول پر شد سلول ها می توانند بعنوان رده پلی کلونال در نظر گرفته شوند.سپس این رده های پلی کلونال توسط تکنیک رقت محدود (limiting dilution) در پلیت های 96 خانه ای کشت داده می شوند تا بتوان کلون های مونوکلونال را انتخاب نمود و بسط داد. در نهایت اقدام به جمع آوری و تغلیظ سوپ سلول های انتخاب شده و انجام SDS-PAGE جهت بررسی و بیان پروتئین مذکورگردید.

**یافته ها و نتیجه گیری:** در آزمایش الکتروفورز که بمنظور تایید بیان ژن فسفولیپازA2 در سوپ سلول­ها انجام پذیرفت باند ی قابل انتظار با وزن مولکولی حدود 20 کیلودالتون بدست آمدکهبا گزارشات دیگر محققین در این خصوص مطابقت داشته است. از آن جایی که فسفولیپاز A2 از ترکیبات مهم توکسیک و آلرژیک زهر زنبورعسل می باشد لذا مطالعات تشخیصی و درمانی در رابطه با این آنزیم نیاز به پروتئین کافی و خالص دارد. تولید نوترکیب این پروتئین نیازمند فراهم سازی رده های سلولی پایدار می باشد تا بتوان بصورت کنترل شده و مداوم و با صرف کمترین وقت و هزینه اقدام به تولید مقادیر مناسب پروتئین نمود. integration جاگیری توالی دی ان ای خارجی به داخل ژنوم سلول یوکاریوت ِ می تواند از طریق بکارگیری سیستم های تغییر و ترمیم دی ان ای اندوژن انجام پذیرد.

**کلید واژه ها:** زهر زنبورعسل، فسفولیپازA2، رده سلولی پایدار