



Generating Stable Cell Line for Producing Recombinant Phospholipase A2 of Honey Bee (*Apis mellifera*)

Sedigheh Nabian^{1✉}, Mohammad Taheri^{2✉}, Sara Alian^{3✉}, Mahsa Shahbakhsh^{3✉}, Abbas Gerami Sadeghian^{1✉}, Zahra Asadollahi^{3✉}

¹ Department of Honey Bee, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Rastegar Central Research Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 17 October 2023, Accepted: 18 December 2023

doi [10.22059/jvr.2023.339344.3243](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.339344.3243)

Abstract

BACKGROUND Honey bee venom contains complex compounds such as polypeptides, enzymes, and amines. One of the important components of bee venom is the phospholipase A2 enzyme, which is considered an important honey bee venom allergen and is also used to treat some diseases. This enzyme is found in other insects, arachnids, snakes, and mammalian cells, and its function is the hydrolysis of the second ester bond of glycerophospholipids and the release of fatty acids and lysophospholipids. Although transient transfection can produce recombinant proteins, stable cells are more suitable for high-scale production with economic efficiency.

OBJECTIVES: The present study created a stable cell line to produce recombinant phospholipase A2 from honey bee (*Apis mellifera*) venom.

METHODS: Plasmid cloning DNA vector containing phospholipase A2 gene was prepared by MacroGen Company. The recombinant plasmid was transferred to Chinese hamster ovary cells by heat shock method, and gene expression was carried out in a HamsF12 culture medium containing neomycin antibiotic. After increasing polyclonal strains containing plasmid, monoclonal clones were selected by limiting dilution. Then, monoclonal clones were propagated, the soup of the selected cells was collected and concentrated, and the protein expression was checked by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis test.

RESULTS: The results of electrophoresis, which was performed to confirm the expression of the phospholipase A2 gene in the cell soup, showed a band with a molecular weight of 20 kilodaltons, which confirms the creation of a stable cell line for the production of recombinant phospholipase A2 honey bee venom.

CONCLUSIONS: After the transient transfection of the plasmid containing this gene, several cells undergo recombination due to having repair mechanisms and putting the desired gene along with the antibiotic resistance gene in their genome. These cells can be selected and propagated by adding antibiotics to the culture medium.

Keywords: CHO cell line, Honey bee venom, PCDNA, Phospholipase A2, Stable cell line

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Sedigheh Nabian, Tel/Fax: +9821-61117072/+9821-66933222



How to cite this article:

Nabian S, Taheri M, Alian S, Shahbakhsh M, Gerami Sadeghian A, Asadollahi Z. Generating Stable Cell Line for Producing Recombinant Phospholipase A2 of Honey Bee (*Apis mellifera*). Journal of Veterinary Research, 2024; 79(1): 1-7. doi: 10.22059/jvr.2023.339344.3243

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Growth of Transfected Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells in the Presence of Neomycin (3000 µg/mL).

Figure 2. Lack of Growth of Untransfected Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells in the Presence of Neomycin (3000 µg/mL).

Figure 3. Results of Expression of Phospholipase A2, 1 Ladder, 2, and 3 Lysates of Transfected Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells, 4 Culture Supernatant of Transfected CHO Cells.



ایجاد رده سلولی پایدار جهت تولید فسفولیپاز نو ترکیب A2 زهر زنبور عسل (آپیس ملیفر)

صدیقه نبیان^۱، محمد طاهری^۲، سارا علیان^۳، مهسا شه‌بخش^۳، عباس گرامی صادقیان^۱، زهرا اسدالهی^۳^۱ گروه زنبور عسل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ آزمایشگاه مرکزی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۵ مهر ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۲۷ آذر ماه ۱۴۰۲

doi: 10.22059/jvr.2023.339344.3243

چکیده

زمینه مطالعه: زهر زنبور عسل دارای ترکیبات پیچیده‌ای مانند پلی‌پپتیدها، آنزیم‌ها و آمین‌ها می‌باشد. از اجزای مهم زهر زنبور عسل، آنزیم فسفولیپاز A2 است که به‌عنوان یک آلرژن مهم زهر زنبور عسل مطرح می‌باشد و در درمان برخی از بیماری‌ها کاربرد دارد. این آنزیم در حشرات دیگر، آراکنیدها، مارها و سلول‌های پستانداران یافت می‌شود و عملکرد آن هیدرولیز پیوند استری دوم گلیسروفسفولیپیدها و آزاد شدن اسیدهای چرب و لیزوفسفولیپیدها می‌باشد. پروتئین‌های نو ترکیب توسط ترانسفکشن موقت قابل تولید می‌باشند، اما جهت تولید در مقیاس بالا با صرفه اقتصادی، سلول‌های پایدار مناسب‌ترند.

هدف: مطالعه حاضر باهدف ایجاد رده سلولی پایدار جهت تولید فسفولیپاز نو ترکیب A2 زهر زنبور عسل (آپیس ملیفر) انجام شد.

روش کار: وکتور PCDNA حاوی ژن فسفولیپاز A2 از کمپانی ماکروژن تهیه شد. پلاسمید نو ترکیب با روش شوک حرارتی به سلول‌های CHO منتقل شد و بیان ژن در محیط کشت HamsF12 حاوی آنتی‌بیوتیک نئومایسین صورت گرفت. پس از ازدیاد رده‌های پلی‌کلونال حاوی پلاسمید، کلون‌های مونوکلونال توسط روش رقت محدود (limiting dilution) انتخاب شدند. سپس اقدام به تکثیر کلون‌های مونوکلونال، جمع‌آوری و تغلیظ سوپ سلول‌های انتخاب‌شده گردید و با انجام آزمایش SDS-PAGE بیان پروتئین مذکور ارزیابی شد.

نتایج: نتایج الکتروفورز که جهت تأیید بیان ژن فسفولیپاز A2 در سوپ سلول‌ها انجام شد یک باند با وزن مولکولی ۲۰ کیلودالتون را نشان داد که مؤید ایجاد رده سلولی پایدار جهت تولید فسفولیپاز A2 نو ترکیب زهر زنبور عسل است.

نتیجه‌گیری نهایی: پس از ترانسفکشن موقت پلاسمید حاوی این ژن، تعدادی از سلول‌های حاوی پلاسمید به‌واسطه داشتن سازوکارهای ترمیمی دچار نو ترکیبی شدند و ژن موردنظر همراه با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را در ژنوم خود قرار دادند که با اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت می‌توان این سلول‌ها را انتخاب کرد و سپس به بسط و تکثیر آن‌ها پرداخت.

کلمات کلیدی: رده سلولی پایدار، رده سلولی CHO، زهر زنبور عسل، فسفولیپاز A2، وکتور PCDNA

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران

کپی‌رایت © نویسندگان



نویسنده مسئول: صدیقه نبیان، گروه زنبور عسل، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

رده‌های سلولی پایدار، سلول‌های نامیرایی می‌باشند که به‌صورت ثابت و پیوسته ژن موردنظر را بیان می‌کنند. این سلول‌ها جهت تولید پروتئین‌های نو ترکیب برای اهداف درمانی و تحقیقاتی، ژن درمانی و تولید حیوانات تراریخت‌شده (Transgenic) کاربرد وسیعی دارند. پروتئین‌های نو ترکیب توسط ترانسفکشن موقت قابل تولید می‌باشند، اما جهت تولید در مقیاس بالا و با صرفه اقتصادی، سلول‌های پایدار مناسب‌ترند (۱). برای این منظور سلول‌های CHO (Chinese Hamster Ovary) با پلاسمید حاوی ژن موردنظر ترانسفکت می‌شوند، سپس پلاسمید به‌صورت اتفاقی در ژنوم میزبان توسط سازوکارهای سلولی جاسازی (integration) می‌شود (۲). همچنین می‌توان ژن‌هایی را که جاسازی شده‌اند توسط سیستم دی‌هیدروفولات‌ردوکتاز تکثیر کرد، به‌طوری‌که تعداد ژن موردنظر در هر سلول تا ۱۰۰۰ برابر قابل افزایش می‌باشد. این فرایند، در صنعت داروسازی کاربرد

فراوانی دارد (۳). زهر زنبور عسل دارای ترکیبات پیچیده‌ای مانند پلی‌پپتیدها، آنزیم‌ها، آمین‌ها می‌باشد که برخی از آن‌ها دارای خواص ضدالتهابی و برخی از آن‌ها دارای خواص سمی و آلرژن می‌باشند. بنابراین شناسایی عملکرد مفید و مضر آن‌ها می‌تواند جهت شناخت بیشتر مکانیسم‌های التهابی مفید واقع شود (۳، ۴).

فسفولیپاز A2 یکی از ترکیبات مهم زهر زنبور عسل است که به‌عنوان یک آلرژن عمده مطرح می‌باشد (۵). این آنزیم در حشرات دیگر، آراکنیدها، مارها و سلول‌های پستانداران یافت می‌شود و عملکرد آن هیدرولیز پیوند استری دوم گلیسروفسفولیپیدها و آزاد شدن اسیدهای چرب و لیزوفسفولیپیدها می‌باشد. همچنین سبب آزادسازی آراشیدونیک‌اسید و تولید ایکوزانوئیدها در سلول می‌شود که از واسطه‌های التهابی قوی می‌باشند (۶). بنابراین با توجه به کاربردهای کلینیکی فراوان فسفولیپاز A2، کسب اطلاعات بیشتر در مورد آن می‌تواند کاربردهای درمانی و دارویی داشته باشد. در این راستا، تهیه رده سلولی پایدار به‌منظور تولید پروتئین نوترکیب فسفولیپاز A2 می‌تواند در جهت مطالعات دارویی مفید باشد.

مواد و روش کار

کشت سلول‌های CHO: سلول‌های CHO از مؤسسه پاستور ایران تهیه شدند. تعداد 10^5 سلول در میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو، ۱۰۰ واحد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند.

تهیه وکتور حاوی ژن: در ابتدا توالی پروتئین فسفولیپاز A2 زهر زنبور با شماره دسترسی NP_001011614.1 از پایگاه داده NCBI به آدرس <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> استخراج شد. وزن مولکولی و pH ایزوالکتریک آن با استفاده از سرور آنلاین expasy به نشانی https://web.expasy.org/compute_pi محاسبه شد. سپس ترجمه معکوس پروتئین مذکور به DNA و بهینه‌سازی کدون‌ها جهت بیان مناسب در سلول‌های CHO با استفاده از سرور آنلاین JCAT به نشانی <https://www.jcat.de> صورت گرفت، سپس توالی مذکور جهت سنتز و کلون در پلاسمید (+3.1) pcDNA به کمپانی بیوتک ارسال شد. پلاسمید pcDNA (+3.1) حاوی پروموتور قوی جهت بیان مناسب در سلول‌های پستانداران و همچنین ژن مقاومت به نئومایسین به‌عنوان مارکر انتخابی است.

ترانسفکشن: ابتدا پلاسمید حاوی ژن موردنظر، جهت تکثیر و ازدیاد با روش شوک حرارتی به باکتری *شرشیا کلای DH5α* منتقل شد. سپس باکتری‌های ترانسفکت‌شده بر روی پلیت LB agar حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. یک تک‌کلنی از محیط کشت مذکور برداشته شد و به محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انتقال یافت و پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت یک شب در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلاسمید حاوی ژن موردنظر با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت MBST استخراج شد. در مرحله بعد جهت ترانسفکشن سلول‌های یوکاریوتی CHO با پلاسمید حاوی ژن از روش کلسیم‌فسفات استفاده شد. به این صورت که ۲۰-۱۵ میکروگرم از DNA با ۱۲۴ میکرولیتر از کلرورکلسیم ۲ مولار مخلوط و حجم آن به ۱ سی‌سی رسانده شد و با ۱ سی‌سی از محلول حاوی بافر HEPES ۲ درصد مخلوط شد. سپس ۱ سی‌سی از مخلوط مذکور بر روی سلول‌های CHO کشت داده شد و در یک فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد. پس از گذشت ۱۶ ساعت، محلول رویی برداشته شد و ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سلول تازه بر روی پلیت اضافه گردید.

انتخاب سلول‌های ترانسفکت‌شده در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین: به‌منظور تعیین حداقل دُز مناسب آنتی‌بیوتیک که به کشتن سلول‌ها پس از حدود ۱۰ روز منجر می‌شود، غلظت‌های مختلف نئومایسین به سلول‌های کشت داده‌شده در پلیت ۲۴ خانه اضافه شد. محیط حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت‌های مختلف ۰-۱۰۰-۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۶۰۰-۲۵۰۰-۳۰۰۰-۳۲۰۰-۴۵۰۰-۶۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هر ۳ روز یک‌بار به‌مدت ۲ هفته تعویض شد. در این آزمایش حداقل دُز مناسب آنتی‌بیوتیک ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. بنابراین به فلاسک ۲۵ میلی‌لیتری حاوی سلول‌های CHO ترانسفکت‌شده، نئومایسین با غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه گردید. بعد از گذشت حدود ۲ هفته سلول‌های زنده جمع‌آوری شدند و داخل گوده پلیت ۶ خانه‌ای به‌عنوان جمعیت پلی‌کلونال

کشت داده شدند. جهت ایجاد رده‌های منوکلونال از روش کشت با رقت محدود (limiting dilution) در پلیت ۹۶ خانه استفاده شد، به‌طوری‌که در هریک از خانه‌ها تنها یک سلول قرار داده شد و کلون‌های حاصل به‌عنوان رده‌های منوکلونال در نظر گرفته شدند.

غربالگری سلول‌های ترانسفکت‌شده: پس از رشد سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای از روش SDS-PAGE و ارزیابی فعالیت آنزیمی جهت تأیید تولید آنزیم، استفاده شد. سپس کلون‌های تولیدکننده آنزیم تکثیر و فریز شدند تا در مواقع لزوم برای کشت در مقیاس وسیع، بتوان از آن‌ها استفاده کرد.

SDS-PAGE براساس روش Laemli، توسط دستگاه الکتروفورز عمودی (Biorad) انجام شد (۷). جهت جدا کردن باندهای پروتئینی، از ژل متراکم‌کننده ۵ درصد و ژل جداکننده ۱۲ درصد استفاده شد.

به منظور آماده‌سازی نمونه، ۲۰ میکرولیتر از لیزات سلول در بافر لیزات (۲۰ میلی‌مولار تریس با pH=8، ۲ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ درصد تریتون ۱۰۰ و ۰/۵ درصد SDS) با ۲۰ میکرولیتر بافر نمونه SDS-PAGE مخلوط شد و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۲ میکرولیتر آن در گوده مربوطه ریخته شد و برای تعیین وزن مولکولی باندها از مارکر پروتئینی استفاده گردید. سپس ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم شد و تا زمان باز شدن کامل مارکر، عمل الکتروفورز ادامه یافت. پروتئین‌ها براساس وزن مولکولی خود روی ژل حرکت کردند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل از دستگاه خارج و با استفاده از رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد و سپس ژل از محلول رنگ خارج گردید و در محلول رنگ‌بر قرار داده شد، تا باندهای پروتئینی مشخص شوند.

سنجش فعالیت آنزیم فسفولیپاز A2: اندازه‌گیری فعالیت فسفولیپاز A2 با استفاده از روش Owen انجام شد. برای انجام این کار ابتدا یک زرده تخم‌مرغ در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه حل شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از آن با ۲ میلی‌لیتر از کلروکلسیم ۳ میلی‌مول در لیتر مخلوط گردید و متعاقباً ۲ میلی‌لیتر از محلول ۵ درصد آلومین سرم گاو، ۲ میلی‌لیتر از محلول ۱۳ میلی‌مول در لیتر سدیم‌داکسی‌کولات و ۴ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و pH مخلوط مذکور با اضافه کردن هیدروکسیدسدیم بر روی عدد ۸ تنظیم شد. سپس به‌منظور تأیید ترانسفکت شدن، فعالیت آنزیمی با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی سلول‌های CHO ترانسفکت‌شده به مخلوط مذکور و انکوباسیون به‌مدت نیم‌ساعت در حرارت آزمایشگاه و بررسی مقدار کاهش pH که به‌واسطه آزادسازی اسیدهای چرب صورت می‌گیرد، اندازه‌گیری شد و به‌طور هم‌زمان از نمونه کنترل فاقد پلاسمید حاوی ژن فسفولیپاز A2 جهت تأیید روش فوق استفاده گردید.

نتایج

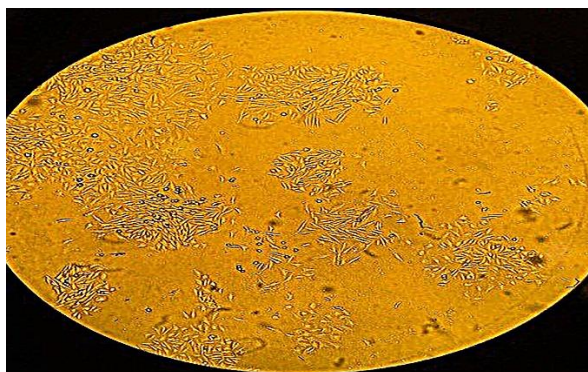
توالی پروتئینی فسفولیپاز A2 حاصل از پایگاه اطلاعات داده NCBI به شرح ذیل بود. همچنین وزن مولکولی پروتئین مذکور توسط سرور آنالین expasy حدود ۱۷ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک آن ۶/۲۱ محاسبه شد.

MQVVLGSLFLLLLSTSHGWQIRDRIGDNELEERIIYPGTLWCGHGNKSSGPNELGRFKHTDACC
RTHDMCPDVMASAGESKHGLTNTASHTRLSCDCDDKFYDCLKNSADTISSYFVGKMYFNLIIDTKCY
KLEHPVTGCGERTEGRCLHYTVDKSKPKVYQWFDLRKY

تأیید ترانسفکشن از طریق بررسی رشد سلول‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین انجام شد، به‌طوری‌که سلول‌های حاوی پلاسمید به‌دلیل دارا بودن نئومایسین فسفوترانسفراز در محیط حاوی ۳۰۰۰ میکروگرم نئومایسین رشد کردند (تصویر ۱).

چنان‌که در تصویر ۲ نشان داده شده است، حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک که مانع رشد سلول‌های ترانسفکت‌نشده شد ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. در آزمایش SDS-PAGE باندهای متعدد حاصل شد که محدوده وزن مولکولی آن حدود ۱۶-۱۹ کیلودالتون بود و این می‌تواند مربوط به ایزوفرم‌های مختلف فسفولیپاز A2 باشد (تصویر ۳).

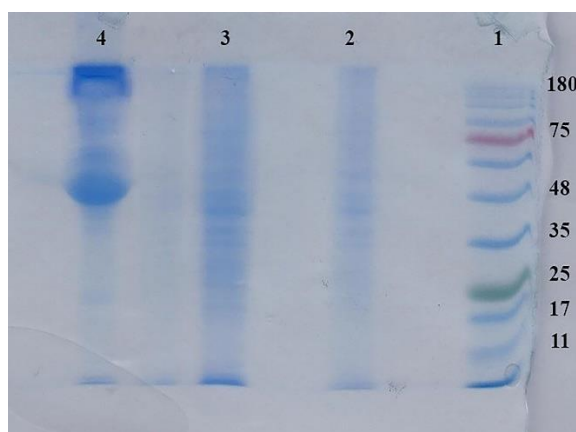
سنجش فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A2: در آزمون سنجش فعالیت آنزیمی فسفولیپاز A2، pH محلول حاوی زرده تخم‌مرغ از ۸ به عدد ۷ تقلیل یافت، درحالی‌که چنین تغییری در نمونه کنترل که فاقد پلاسمید حاوی ژن بود مشاهده نشد.



تصویر ۱. رشد سلول‌های CHO ترانسفکت‌شده در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین با غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.



تصویر ۲. عدم رشد سلول‌های CHO ترانسفکت‌نشده در حضور آنتی‌بیوتیک نئومایسین با غلظت ۳۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر.



تصویر ۳. نتایج بیان فسفولیپاز A2. ستون ۱ مارکر وزن مولکولی پروتئین، ستون ۲ و ۳ لیزات سلول‌های CHO ترانسفکت‌شده، ستون ۴ محلول رویی کشت سلول‌های CHO ترانسفکت‌شده.

بحث

زهر زنبور عسل می‌تواند سبب ایجاد واکنش‌های آنافیلاکتیک وابسته به IgE در افراد شود. بنابراین تشخیص حساسیت به زهر زنبور عسل با استفاده از اجزای زهر زنبور عسل یک روش مناسب و ضروری است. تولید فسفولیپاز A2 نوترکیب به‌عنوان یکی از آلرژن‌های زهر زنبور عسل می‌تواند جهت استفاده از روش‌های تشخیصی مانند الایزا، با استفاده از سرم بیماران دچار آلرژی مفید واقع شود. همچنین فسفولیپاز A2 نوترکیب از زهر زنبور عسل می‌تواند به شناخت مکانیسم‌های مولکولی آلرژی به زهر زنبور عسل کمک کند و به‌عنوان یک ابزار درمانی استفاده شود. از خاصیت ضدالتهابی زهر زنبور عسل در درمان بیماری‌های خودایمن، مثل آرتریت روماتوئید و مالتیپل اسکلروزیس استفاده می‌شود. فسفولیپاز A2 دارای خواص تعدیل‌کننده ایمنی است و در بیماری‌های متنوعی مانند آسم و پارکینسون دارای اثرات درمانی می‌باشد (۸-۱۱).

این ترکیب در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب آسیب به غشای سلول و در نتیجه القای نکروز سلولی و به دنبال آن اثرات مضر شود (۱۲). بنابراین ارزیابی اثرات مضر و مفید فسفولیپاز A2 در روند ایمنوتراپی و سایر مطالعات ضروری است. بدین منظور، جهت بیان مداوم ژن، تولید سل‌لاین‌های پایدار ضروری است. تهیه لاین‌های سلولی پایدار جهت تهیه پروتئین‌های نو ترکیب دارویی، تحقیقاتی، تشخیصی و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در سطوح بالا بخش مهمی از مطالعات داروسازی را به خود اختصاص می‌دهد که به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب صرفه‌جویی در وقت و هزینه و سبب بیان ژن موردنظر به‌طور مداوم و کنترل شده می‌شود. همچنین برخی از اپی‌توپ‌ها به‌واسطه تغییرات پس از ترجمه ایجاد می‌شوند. بنابراین بیان فسفولیپاز A2 در سلول‌های یوکاریوتی CHO ضروری است (۱۳). در مطالعه حاضر توالی پروتئین فسفولیپاز A2 که از NCBI استخراج شد حاوی ۱۶۷ اسید آمینه بود که ۱۸ اسید آمینه آن مربوط به پپتید راهنما (signal peptide) می‌باشد و همچنین توسط نرم‌افزار موجود در Expasy مقدار وزن مولکولی این آنزیم حدود ۱۷ کیلو دالتون محاسبه شد که در آزمایش SDS-PAGE نیز این نتیجه تأیید گردید و با مطالعه Shen و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز هم‌خوانی داشت. در مطالعات آن‌ها طیف ۱۶-۱۸ کیلو دالتون برای این آنزیم ذکر شده بود که علت این تنوع وزن را ناشی از الگوهای قندی شدن (glycosylation) متفاوت اعلام کردند. همچنین میزان بیان پایین این پروتئین می‌تواند ناشی از ماهیت سمی آن باشد که سبب ایجاد صدمه به سلول‌های CHO می‌شود که در مطالعه Shen و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز بیان شده است (۱۴).

در مطالعه حاضر، به‌منظور تأیید فعالیت آنزیمی از محلول زرده تخم‌مرغ حاوی کلرور کلسیم استفاده شد و pH محلول حاوی زرده تخم‌مرغ از ۸ به عدد ۷ به‌واسطه ایجاد اسیدهای چرب آزاد تقلیل یافت که مؤید فعالیت آنزیم فوق است.

خانواده فسفولیپاز A2 در موجودات مختلف، گروهی از آنزیم‌های خارج سلولی را تشکیل می‌دهند که از نظر ساختمانی شبیه به هم و وابسته به کلسیم می‌باشند. هر کدام از این آنزیم‌ها از نقطه‌نظر سوبسترا و توزیع سلولی و بافتی با یکدیگر تفاوت‌هایی دارند که سبب تمایز نقش بیولوژیک آن‌ها می‌شوند. برای مثال در پستانداران آنزیم‌های فسفولیپاز A2 گروه ۳، همولوگ فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل می‌باشند که در بلوغ اسپرم و ایجاد آرترواسکلوئزیس نقش ایفا می‌کنند (۱۴).

فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل دارای خواص مفید و اثرات مضر می‌باشد. از خواص مفید آن می‌توان به خاصیت ضدالتهابی در درمان بیماری‌های اتوایمونی اشاره کرد که می‌تواند به‌دلیل افزایش تولید لنفوسیت‌های T تنظیمی (T-cell Regulatory) و افزایش اینترلوکین ۱۰ از سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن باشد و در شرایط آلرژی می‌تواند سبب کاهش فعالیت‌های لنفوسیت‌های Th2 و متعاقباً جلوگیری از تولید IgE اختصاصی شود (۱۵). همچنین فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل دارای اثرات ضدتوموری با مکانیسم ایجاد صدمه به غشای سلول‌های سرطانی می‌باشد و با ایجاد پیام‌برهای ثانویه (Secondary messenger) و تداخل در انتقال سیگنال سبب تعدیل تکثیر سلولی و تنظیم چرخه سلولی می‌شود (۱۶، ۱۷). از اثرات مضر فسفولیپاز زهر زنبور عسل می‌توان به خاصیت نوروتوکسیک آن اشاره کرد، چنان‌که محققین نشان داده‌اند تزریق مستقیم این آنزیم به داخل سیستم عصبی مرکزی رت در یک رویه وابسته به دُز می‌تواند سبب دمیولینزاسیون شود (۹).

نتیجه‌گیری نهایی: فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل دارای خواص مفید و اثرات مضر می‌باشد. خواص مفید آن، ازجمله خاصیت ضدالتهابی فسفولیپاز A2 زهر زنبور عسل در درمان بیماری‌های اتوایمونی، مانند آرتریت روماتوئید و مالتیپل اسکلروزیس، همچنین اثرات ضدتوموری آن در کنار خواص مضر توکسیک و آلرژیک آن، اهمیت مطالعات تشخیصی و درمانی در رابطه با این آنزیم را مشخص می‌کند. بنابراین تولید پروتئین نو ترکیب آن توسط رده‌های سلولی پایدار، به‌صورت کنترل شده و مداوم و با صرف کمترین وقت و هزینه می‌تواند مفید واقع شود. در مطالعه حاضر پس از ترانسفکشن موقت پلاسمید حاوی این ژن، تعدادی از سلول‌های حاوی پلاسمید به‌دلیل داشتن سازوکارهای ترمیمی دچار نو ترکیبی شدند و ژن موردنظر همراه با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ژنوم سلول‌ها قرار گرفت که با اضافه کردن آنتی‌بیوتیک به محیط کشت، می‌توان این سلول‌ها را انتخاب کرد و سپس به تکثیر آن‌ها پرداخت.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت حمایت مالی از مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Lagassé HD, Alexaki A, Simhadri VL, Katagiri NH, Jankowski W, Sauna ZE, et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Res*. 2017;6:1-18. doi: 10.12688/f1000research.9970.1
2. Albert B, Innes J, Blackford J, Taylor B, Conneller C, Milner N. Degradation of the wetland sediment archive at Star Carr: An assessment of current palynological preservation. *J Archaeol Sci Rep*. 2016;6:488-95. doi: 10.1016/j.jasrep.2016.03.010
3. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31(1):173-94. doi: 10.1007/s10555-011-9339-3
4. Wehbe R, Frangieh J, Rima M, El Obeid D, Sabatier J-M, Fajloun Z. Bee venom: Overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests. *Molecules*. 2019;24(16):2997. doi: 10.3390/molecules24162997
5. Perez-Riverol A, Lasa AM, dos Santos-Pinto JRA, Palma MS. Insect venom phospholipases A1 and A2: Roles in the envenoming process and allergy. *Insect Biochem Mol Biol*. 2019;105:10-24. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.12.011 PMID: 30582958
6. Murakami M, Sato H, Miki Y, Yamamoto K, Taketomi Y. A new era of secreted phospholipase A2. *J Lipid Res*. 2015;56(7):1248-61. doi: 10.1194%2Fjlr.R058123
7. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0
8. Darwish DA, Masoud HM, Abdel-Monsef MM, Helmy MS, Zidan HA, Ibrahim MA. Phospholipase A2 enzyme from the venom of Egyptian honey bee *Apis mellifera lamarckii* with anti-platelet aggregation and anti-coagulation activities. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021;19(1):1-8. doi: 10.1186/s43141-020-00112-z PMID: 33443641
9. Hwang D-S, Kim SK, Bae H. Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins*. 2015;7(7):2413-21. doi: 10.3390/toxins7072413
10. Mirshafiey A. Venom therapy in multiple sclerosis. *Neuropharmacology*. 2007;53(3):353-61. doi: 10.1016/j.neuropharm.2007.05.002
11. Kim KH, Lee SY, Shin J, Hwang J-T, Jeon HN, Bae H. Dose-dependent neuroprotective effect of standardized bee venom phospholipase A2 against MPTP-induced parkinson's disease in mice. *Front Aging Neurosci*. 2019;11(80):1-9. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.006
12. Lee G, Bae H. Bee venom phospholipase A2: Yesterday's enemy becomes today's friend. *Toxins*. 2016;8(2):48. doi: 10.3390/toxins8020048
13. Kuo C-C, Chiang AW, Shamie I, Samoudi M, Gutierrez JM, Lewis NE. The emerging role of systems biology for engineering protein production in CHO cells. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;51:64-9. doi: 10.1016/j.copbio.2017.11.015 PMID: 29223005
14. Shen L-r, Ding M-h, Zhang L-w, Zhang W-g, Liu L, Li D. Expression of a bee venom phospholipase A2 from *Apis cerana cerana* in the baculovirus-insect cell. *J Zhejiang Uni Sci. B*. 2010;11(5):342-9. doi: 10.1111/j.1744-7917.2004.tb00175.x
15. Kim H, Lee H, Lee G, Jang H, Kim S-S, Yoon H, et al. Phospholipase A2 inhibits cisplatin-induced acute kidney injury by modulating regulatory T cells by the CD206 mannose receptor. *Kidney Int*. 2015;88(3):550-9. doi: 10.1038/ki.2015.147
16. Choi KE, Hwang CJ, Gu SM, Park MH, Kim JH, Park JH, et al. Cancer cell growth inhibitory effect of bee venom via increase of death receptor 3 expression and inactivation of NF-kappa B in NSCLC cells. *Toxins*. 2014;6(8):2210-28. doi: 10.3390/toxins6082210
17. Shiassi Arani F, Karimzadeh L, Ghafoori SM, Nabiuni M. Antimutagenic and synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on 4T1 invasive mammary carcinoma cell line. *Adv Pharmacol Sci*. 2019;1:1-8. doi: 10.1155/2019/7581318 PMID: 30838042