

ساخت پلاسمید بیان کننده پروتئین نوترکیب تحت القای حرارتی در اشریشیاکلی

فریبا عطائی^۱، حسین قنبریان^۲، علیرضا زمردی پور^{۳*}، باقر یخچالی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوتکنولوژی پزشکی
۳- عضو هیأت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

هدف: در بیان عامل تحریک کننده رده گرانولوسیت - ماکروفاژ انسانی (hGM-CSF)، در اشریشیاکلی تحت القای حرارتی، بر پایه پلاسمید pBC(SK)، که اختلاف آنها در حضور یا عدم حضور توالی خاتمه دهنده نسخه برداری در پایین دست توالی کدکننده است پروتئین نوترکیب، ساخته شد.

مواد و روشها: دو پلاسمید بیان کننده حاوی یک قطعه ۷۵ جفت بازی از پروموتور باکتریوفازی λ PL، یک ژن جهش یافته از رپرسور CI (CI λ 57)، برای کنترل فعالیت پروموتور، که محصول آن حساس به حرارت است و یک ترادف نشانه PelB به منظور هدایت پروتئین نوترکیب به فضای پریپلاسمی است. توانایی پلاسمیدهای ساخته شده با بیان hGM-CSF تحت القای حرارتی در اشریشیاکلی آزمایش شده است.

نتایج: نتایج حاصل از آنالیز پروتئینهای باکتریهای نوترکیب (TG1) حاوی هر یک از دو پلاسمید نوترکیب بعد از شوک حرارتی بر بیان و پردازش کامل GM-CSF انسانی نوترکیب در فضای پریپلاسمی کلونهای به دست آمده دلالت دارد. با هدف افزایش کاربری پلاسمید حاوی خاتمه دهنده رونویسی برای بیان دیگر پروتئینهای نوترکیب تحت القای حرارتی، توالی کلون سازی چندگانه ای (MCS) شامل یازده جایگاه برشی منحصر به فرد به این پلاسمید افزوده شد. **نتیجه گیری:** پلاسمیدهای ساخته شده در این تحقیق ابزارهای مناسبی را برای انجام مطالعات مربوط به بیان پروتئینهای نوترکیب در اشریشیاکلی فراهم کرده اند.

کلید واژگان: القای حرارتی، پروموتور λ PL، CI λ 57، ترادف نشانه، بیان پریپلاسمی و hGM-CSF.

۱- مقدمه

مقیاس آزمایشگاهی و مقاصد مطالعاتی از القا کننده های شیمیایی استفاده می کنند؛ اما به دلیل سمی بودن و عدم صرفه اقتصادی برخی از آنها مانند IPTG برای تولید انبوه پروتئینهایی که بویژه مصرف دارویی دارند، توصیه نمی شوند [۱]. به این منظور با

علاوه بر میزبان، شاید اصلترین عامل در بیان انبوه پروتئینهای نوترکیب توالی پروموتور باشد که می تواند کنترل دقیق بیان را نیز در سطح رونویسی میسر سازد. برای کنترل فعالیت پروموتورهای مورد استفاده در تولید پروتئینهای نوترکیب به طور معمول در

تحت کنترل پروموتور λ P_L انجام شد. این پلاسمید (PZGY3) بر پایه پلاسمید پرنسخه pBC(SK) ساخته شد و قادر به تولید پروتئین نوترکیب به‌طور مستقیم تحت کنترل پروموتور λ P_L بود. پروموتور مذکور نیز با استفاده از رپرسور CI₈₅₇ حساس به حرارت که ژن آن در پلاسمید تعبیه شده است، تحت یک شیفت افزایشی حرارت قابل القاست. در تحقیق حاضر با هدف اصلاح ساختار پلاسمید pZGY3 یک توالی خاتمه‌دهنده رونویسی به پایین دست توالی ژن نوترکیب در این پلاسمید اضافه شد. به‌علاوه یک جایگاه کلون‌سازی چندگانه جدید برای افزایش کارایی این پلاسمید برای کلون‌سازی سایر ژنها به ساختار این پلاسمید اضافه شد و کارایی پلاسمید واجد توالی خاتمه‌دهنده رونویسی در مقایسه با پلاسمید قبلی با بیان عامل تحریک کلنی گرانولوسیت ماکروفاژ انسانی نوترکیب (rhGM-CSF) که یک پروتئین دارویی برای درمان بیماری‌هایی از جمله لوکوپنی، سرطان مغز استخوان است [12]، نشان داده شد.

۲- مواد و روشها

سویه TG¹ از باکتری *اشریشیا کلی* به‌عنوان میزبان در مراحل کلون‌سازی و برای بررسی بیان مورد استفاده قرار گرفت. آنزیمهای برشگر و DNA لیگاز T₄ از شرکت روشه^۱ خریداری شدند. از محیط کشت LB^۲ برای رشد و تکثیر باکتریهای نوترکیب استفاده شد. در صورت لزوم آمپی‌سیلین با غلظت نهایی 100 µg/ml، کانامایسین یا کلرامفنیکل با غلظت نهایی 30-60 µg/ml به محیط کشت افزوده شد. برای ساخت محیط انتخابی برای غربالگری کلونهای نوترکیب علاوه بر آنتی‌بیوتیکهای مناسب، از IPTG با غلظت نهایی 1 mM و X-gal با غلظت نهایی 40 µg/ml استفاده شد. آنتی‌بادی پلی کلونال اختصاصی ضد hGM-CSF استفاده شده در این طرح در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تولید شد. روشهای مولکولی به‌کار گرفته شده در این طرح از جمله برش آنزیمی، الحاق^۳، تراریختی^۴ و ... بر طبق روشهای استاندارد [13] انجام گرفت. برای تخلیص DNA پلاسمیدی نیز از روش تجزیه

هدف حذف عوامل شیمیایی، سیستمهای بیان‌کننده قابل کنترل با تغییر درجه حرارت و pH طراحی و به‌کار گرفته شده‌اند. از جمله پروموتورهای قابل کنترل با تغییر درجه حرارت، پروموتورهای PL و PR مشتق شده از باکتریوفاژ لامبداست (λ) که به دلیل کنترل آسان و قدرت بالا برای طراحی بسیاری از وکتورهای بیان‌کننده استفاده شده‌اند [1-3]. فعالیت این پروموتورها در سیستمهای بیان‌کننده اشریشیاکلی به‌وسیله محصول جهش یافته‌ای از ژن رپرسور CI (CI₈₅₇) و با بهره‌گیری از دمای محیط تنظیم می‌شود. رپرسور CI₈₅₇ در حرارت پایین (30°C) فعال بوده و از بیان ژن تحت کنترل پروموتور λ P_L جلوگیری می‌کند؛ با افزایش حرارت نیز تا 42°C تغییر شکل پیدا کرده و قادر به اتصال به اپراتور نمی‌باشد [4-6]. به این ترتیب برای بیان پروتئین نوترکیب در این سیستم با تغییر حرارت محیط کشت از 30°C به 42°C، شکل و رفتار رپرسور CI₈₅₇ تغییر یافته و قدرت بازدارندگی آن از بین رفته و به این ترتیب رونویسی از ژن تحت کنترل پروموتورهای λ P_L و λ PR افزایش می‌یابد [7]. در برخی از تحقیقات، از این سیستم به‌طور غیر مستقیم برای بیان پروتئینهای نوترکیب، در یک سیستم دو پلاسمیدی استفاده شده است [8، 9]. برای این منظور ژن RNA پلیمراز TV را تحت کنترل پروموتور λ P_L و همراه با ژن CI₈₅₇ بر روی یک پلاسمید با تعداد نسخه‌های کم قرار داده و ژن نوترکیب تحت کنترل TV بر روی یک پلاسمید دیگر با تعداد نسخه‌های بالا قرار داده شده‌اند. در تحقیقات قبلی گروه ما نیز از چنین سیستم دو پلاسمیدی برای بیان انبوه هورمون رشد انسانی تحت القای حرارتی استفاده شد [10]. مشکل عمده این نوع سیستمها به‌کارگیری دو پلاسمید متفاوت در یک میزبان به‌طور همزمان برای بیان کنترل شده پروتئین نوترکیب است. حضور دو نوع پلاسمید به‌طور همزمان می‌تواند بار متابولیکی زیادی به سلول وارد کند. به‌علاوه با توجه به بالا بودن قدرت دو پروموتور λ P_L و TV فعالیت همزمان آنها در روی این دو پلاسمید می‌تواند بر این بار بیفزاید و سرانجام موجب ناپایداری پلاسمیدها و کاهش بازدهی ماشین سلولی برای تولید پروتئین نوترکیب گردد. با هدف رفع نقیصه سیستم دو پلاسمیدی برای بیان پروتئین نوترکیب تحت القای حرارتی در تلاشی که نتایج آن منتشر شده است [11]، مراحل اولیه شکل‌گیری یک سیستم بیان‌کننده القای حرارتی تک - پلاسمیدی پروتئینهای نوترکیب

1. Roche
2. Lauria Bertani
3. ligation
4. Transformation

DraII, *Apal*, *KpnI*, *ClaI*, *SmaI*, *SacII*, *KspI*, *SacI*
۱۰۹۱ *HpaI* و *EcoI* است.

برای بررسی بیان rhGM-CSF به وسیله کلونهای نوترکیب، با تهیه رقت ۵٪ از کشت شبانه، باکتریها در دمای ۳۰°C در محیط انتخابی رشد داده شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۰/۸-۰/۵ OD_{۶۰۰}، القای رونویسی در حرارت ۴۲°C انجام شد و سپس نمونه‌های باکتری برای بررسی بیان آزمایش شدند. برای تهیه پروتئینهای تام باکتریایی، سلولهای باکتریایی به دست آمده از ۱ ml از کشت سلولی مطابق روش استاندارد [۱۴] مورد بررسی قرار گرفت. این روش به طور خلاصه به شرح زیر انجام شد. پس از سانتریفوژ مخلوط سلولی رسوب حاصل در بافر نمونه^۴ (تشکیل شده از ۱۰۰ mM Tris-Base (pH=۷/۸)، ۰/۴٪ SDS، گلیسرول ۲۰٪، بتا-مرکاپتواتانل ۱۰٪، بروموفنل بلو ۰/۲٪) حل گردید. سپس محلول به دست آمده به مدت ۵ دقیقه در دمای جوش آب قرار داده شد و برای اجرای آزمایش SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت.

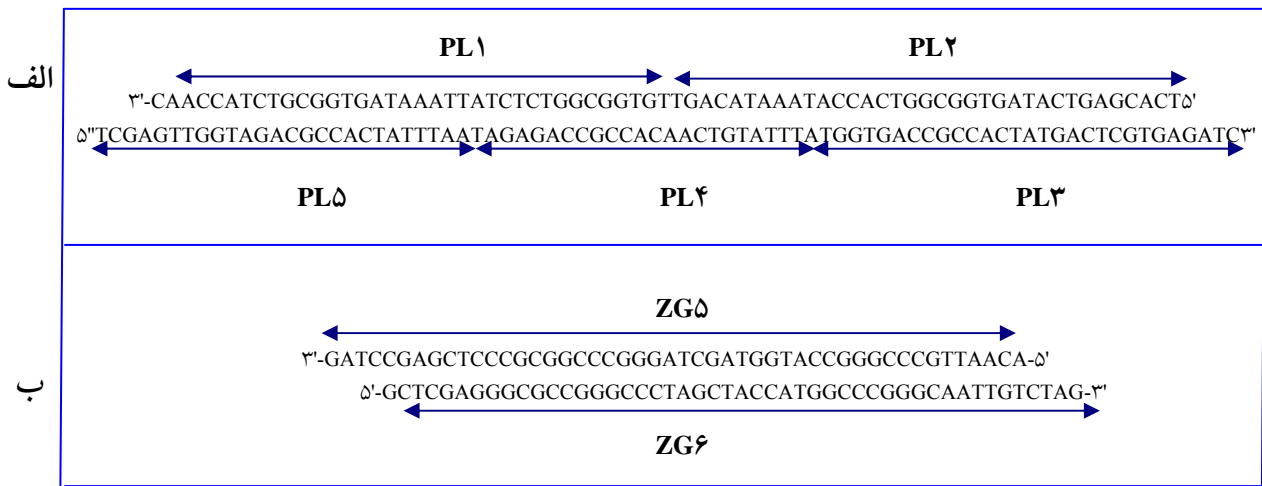
مراحل جداسازی پروتئینهای پریپلاسمی پس از قرار دادن سلولهای باکتریایی در معرض شوک اسمزی به شرح زیر انجام گرفت [۱۵]. اجزای باکتریایی به دست آمده از ۱/۵ ml از کشت سلولی ابتدا در ۱۵ μl از بافر TES (pH۸) شامل Tris-HCl ۱۰۰ mM، EDTA ۰/۵ mM و ساکارز ۰/۵ M، حل شد و با تکانه‌های متناوب به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C نگاه داشته شدند. سپس با افزودن ۲۲/۵ μl آب مقطر دوبار تقطیر، سلولها تا مدت ۳۰ دقیقه دیگر بر روی یخ نگاه داشته شدند. به منظور تفکیک پروتئینهای پریپلاسمی پس از شوک اسمزی، مخلوط سلولی با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شده و مایع رویی حاوی پروتئینهای پریپلاسمی و رسوب به دست آمده حاوی پروتئینهای اسفرو بلاستی از یکدیگر جدا شدند. پس از افزودن TCA به میزان ۱۲٪ حجم نهایی به مایع رویی و سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه پروتئینهای پریپلاسمی باکتریایی رسوب داده شده و در بافر نمونه حل شدند. آزمایشهای SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ بر اساس روشهای استاندارد انجام پذیرفت [۱۶].

(لیز) قلیایی که به وسیله سمبروک^۱ و راسل^۲ [۱۴] توضیح داده شده است و همچنین از کیت تهیه شده از شرکت روشه، استفاده شد. برای تخلیص DNA از ژل آگارز و همچنین تخلیص محصول PCR، از ستونهای خریداری شده از شرکت روشه استفاده شد. به منظور غربال کردن کلونهای نوترکیب، بعد از جداسازی کلنیا بر روی محیطهای انتخابی، DNA پلاسمیدی بعد از تخلیص مورد آنالیز مولکولی با روشهای استاندارد قرار گرفت.

پلاسمید pZGY۳ از کار قبلی گروه در دسترس بود [۹] که به طور خلاصه دارای مشخصات زیر است. این پلاسمید دارای منشأ همانندسازی و ژن مقاومت به کلرامفنیکل است که از پلاسمید pBC(sk) منشأ گرفته است. این پلاسمید همچنین حاوی یک قطعه DNA ۷۵ جفت بازی دربرگیرنده بخشی اصلی از پروموتور λPL است. توالی اخیر از الحاق ۵ الیگونوکلوئوتید، از دو زنجیره مکمل مربوط به توالی پروموتور λPL به طوری طراحی و ساخته شد که جایگاههای برش خورده آنزیم *SacI* در انتهای ۵' و *XbaI* در انتهای ۳' آن باشد (شکل ۱-الف). پلاسمید pZGY۳ همچنین واجد ژن CIA۵۷ است که از پلاسمید نوترکیب pGP1-۲ [۹] منشأ گرفته است. همچنین از پلاسمید نوترکیب pET۲۶-GM-CSF [۱۴] به عنوان منبع cDNA مربوط به hGM-CSF متصل به توالی پپتید نشانه pelB استفاده شد.

برای ساخت پلاسمید اصلاح شده pZGAY۵، توالی خاتمه دهنده رونویسی با استفاده از آغازگرهای ZG۳ (۵'CGGGATCCCGAACAAAAACTCATCTCA) و ZG۴ (۵'GGAATTCGAATTCTGCAGAAAGCCCAGTC۳) با روش PCR از پلاسمید pBAD^۳ تکثیر و پس از برش آنزیمی به پلاسمید pZGY۳ وارد شد. از الحاق الیگونوکلوئوتیدهای ZG۵، ZG۶ برای ساخت قطعه MCS استفاده شد. برای تسهیل مراحل کلون سازی، توالیها به طریقی طراحی شده اند که پس از الحاق به یکدیگر، جایگاههای برش خورده آنزیم *BamHI* و *BglII* در دو انتهای آن ایجاد شود. با استفاده از آن، قطعه مزبور در جایگاه *BamHI* پلاسمید نوترکیب (pZGAY۴) وارد شد (شکل ۱-ب). این قطعه MCS ساخته شده دارای جایگاههای *BamHI*

1. Sambrook
2. Rucell
3. invitrogen



شکل ۱ الف: توالی نوکلئوتیدی قطعه پروموتوری λPL که موقعیت پنج الیگونوکلئوتید طراحی شده برای ساخت پروموتور نشان داده شده است؛ ب: توالی قطعه DNA ساخته شده حاوی جایگاه کلون‌سازی چندگانه (MCS) که در آن موقعیت دو الیگونوکلئوتید ZN₅ و ZG₆ نشان داده شده است.

مطالعات بیان پروتئینی به سویه TG₁ از اشریشیاکلی منتقل شدند.

۳- نتایج

۳-۱- ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب

بیان‌کننده GM-CSF انسانی (pZAY₅ و pZGY₃)

مراحل ساخت و تأیید پلاسمید نو ترکیب pZGY₃، بر پایه پلاسمید pBC(SK) ساخته شده در کار قبلی گروه گزارش شده است [۱۱]. این پلاسمید شامل قطعه رمز کننده GM-CSF انسانی متصل به پپتید نشانه pelB [۱۴] است که در پایین دست قطعه ۷۵bp جفت‌بازی از λPL قرار گرفته و همچنین این پلاسمید دارای ژن CI₈₅₇ رمز کننده ریپرسور حساس به حرارت CI است.

پلاسمید نو ترکیب pZAY₅ با قراردادن توالی خاتمه‌دهنده رونویسی در پلاسمید pZGY₃ ساخته شد. این قطعه که با روش PCR و با استفاده از آغازگرهای ZG₃ و ZG₄ تکثیر شده، با آنزیمهای BamHI و *pst*I بریده و در فرودست کاست کدکننده PelB::GM-CSF قرار داده شد (شکل ۲). همچنین با هدف افزایش کارایی این پلاسمید، برای کلون‌سازی و بیان سایر پروتئینها یک قطعه DNA دو زنجیره‌ای ساخته شده حاوی یازده جایگاه کلون‌سازی منحصر به فرد (MCS) در داخل پلاسمید قرار داده شد (شکل ۲). پلاسمیدهای نو ترکیب ساخته شده با روش برش آنزیمی و تعیین توالی تأیید و برای استفاده در

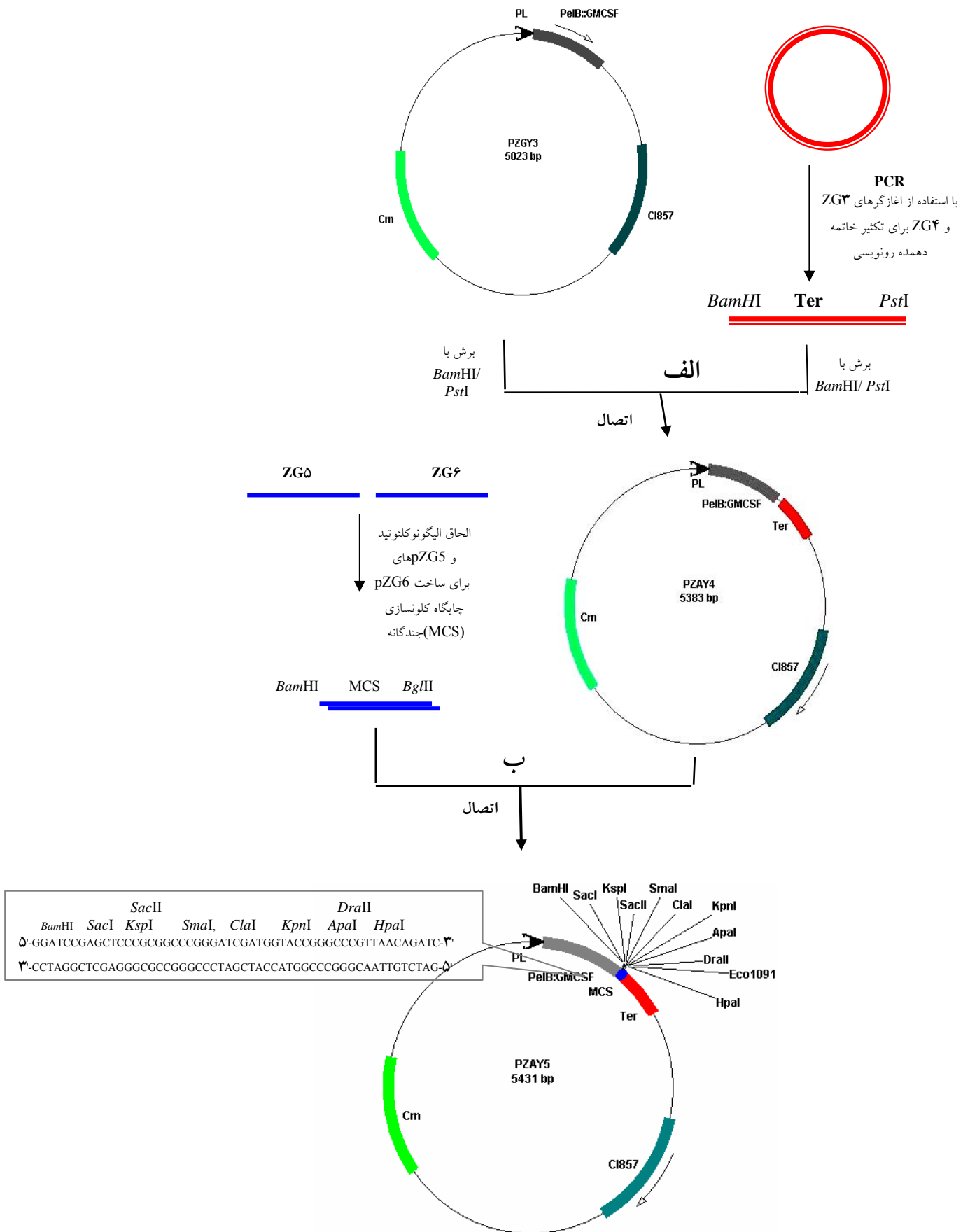
۳-۲- بررسی بیان پریپلاسمی rhGM-CSF در

باکتریهای نو ترکیب

پس از تأیید صحت مولکولی ساختار پلاسمیدهای نو ترکیب، در اولین مرحله بررسی بیان پریپلاسمی rhGM-CSF بر روی تعدادی از کلونهای جدا شده از سویه TG₁ اشریشیاکلی حاوی پلاسمید pZGY₃ انجام شد. به این ترتیب پروتئینهای این کلونها بعد از رشد و چهار ساعت القا در دمای ۴۲°C بررسی شدند. الگوی پروتئینهای پریپلاسمی این باکتریها بر بیان پروتئینی دلالت می‌کرد، که از نظر وزن مولکولی با GM-CSF استاندارد مطابقت داشت. این امر نشانگر بیان rhGM-CSF تحت پروموتور λPL بود (شکل ۳ - الف). همچنین نتایج به دست آمده از آزمایش ایمنوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد hGM-CSF نیز اختصاصی بودن آن را مورد تأیید کرد (شکل ۳ - ب). بررسی و مقایسه الگوی پروتئین سیتوپلاسمی و پریپلاسمی این کلونها پس از القا، نشانگر انتقال کامل GM-CSF بالغ (پردازش شده) به فضای پریپلاسمی است (شکل ۳).

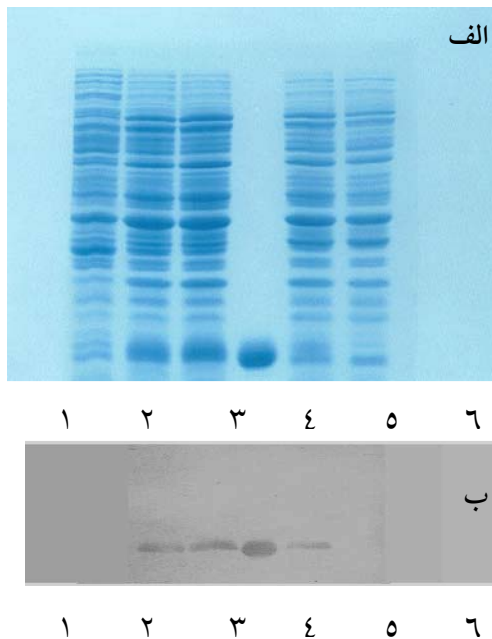
جدول ۱ بررسی کمی تأثیر زمانهای مختلف القا (ساعت) بر بیان rhGM-CSF در کلون pZGY₃ در دمای ۳۷°C

زمان القا (ساعت)		۱	۲	۴	۶	۸	۱۰	۱۲
دمای القا	۳۷°	۲٪	۴-۶٪	۸-۱۰٪	۱۲-۱۴٪	۱۰-۱۲٪	۱۰-۱۲٪	۹-۱۱٪

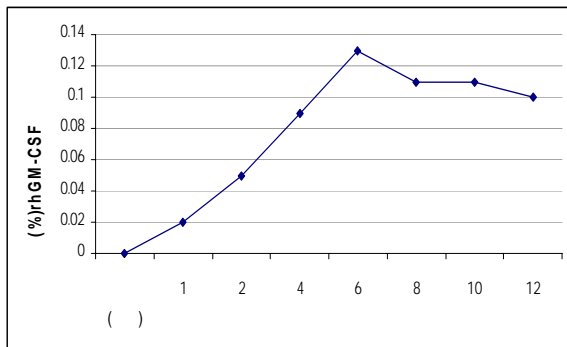


شکل ۲. مراحل ساخت پلاسمید نو ترکیب pZAY5

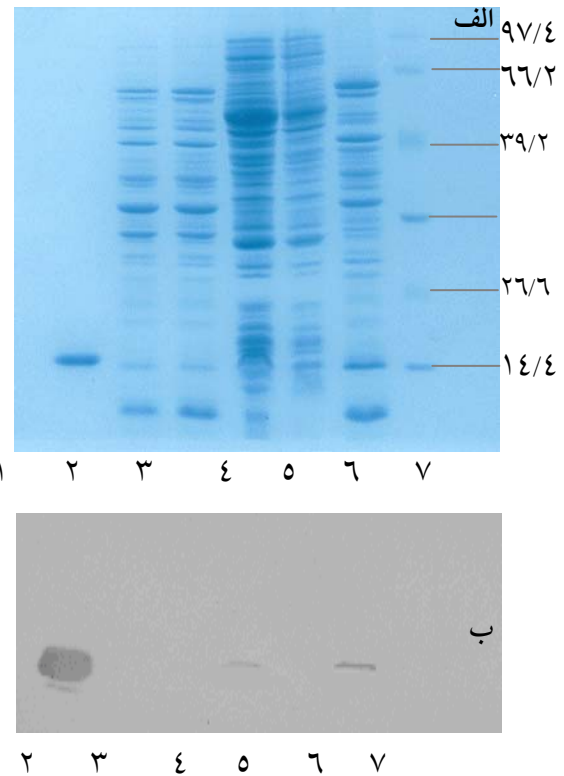
بیان rhGM-CSF در دمای ۳۷ °C یا ۴۰ °C و زمان لازم برای این شوک حرارتی ۶ ساعت تخمین زده شد (شکل ۵).



شکل ۴ بررسی الگوی پروتئینهای پریپلاسمی در کلون pZGY۳ در دماهای مختلف القا با روشهای الف: SDS-PAGE و ب: وسترن بلاتینگ. ردیف ۱: نمونه غیرالقایی، ردیفهای ۲، ۳ و ۵: بترتیب القا در دمای ۴۰ °C، ۳۷ °C و ۴۲ °C به مدت ۶ ساعت، ردیف ۴: پروتئین GM-CSF استاندارد، ردیف ۶: باکتری TG۱ حاوی کلون pZGY۲ (فاقد قدرت بیان) به عنوان کنترل منفی.



شکل ۵ بررسی الگوی پروتئینهای پریپلاسمی و سیتوپلاسمی در کلونهای pZGY۵ پس از ۶ ساعت القا در حرارت ۳۷ °C در مقایسه با کلون pZGY۵ در شرایط یکسان با روش SDS-PAGE. ردیف ۱: پریپلاسم کلون ۱ از pZGY۵ در دمای ۳۷ °C؛ ردیف ۲: پریپلاسم کلون ۲ از pZGY۵ در دمای ۳۷ °C؛ ردیف ۳: پریپلاسم کلون ۳ از pZGY۵ در دمای ۳۷ °C؛ ردیف ۴: پریپلاسم کلون ۱ از pZGY۳ در دمای ۴۰ °C؛ ردیف ۵: پریپلاسم کلون ۲ از pZGY۳ در دمای ۴۰ °C؛ ردیف ۶: پریپلاسم کلون ۳ از pZGY۳ در دمای ۴۰ °C؛ ردیف ۷: GM-CSF استاندارد؛ ردیفهای ۸ تا ۱۳: الگوی سیتوپلاسمی مربوط به نمونه‌های ردیفهای ۱-۶.



شکل ۳ بررسی الگوی تام، اسفروبلاستی و پریپلاسمی کلون pZGY۳ با روشهای الف: SDS-PAGE و ب: وسترن بلاتینگ. ردیف ۱: پروتئین GM-CSF به عنوان کنترل مثبت، ردیف ۲: باکتری TG۱ حاوی کلون pZGY۲ به عنوان کنترل منفی؛ ردیف ۳: نمونه غیرالقایی و ردیفهای ۴، ۵ و ۶ بترتیب پروتئینهای تام، اسفروبلاستی و پریپلاسمی؛ ردیف ۷: مارکر پروتئینی low weight

۳-۳- بررسی تأثیر دماها و زمانهای مختلف القا بر بیان hGM-CSF در کلون pZGY۳

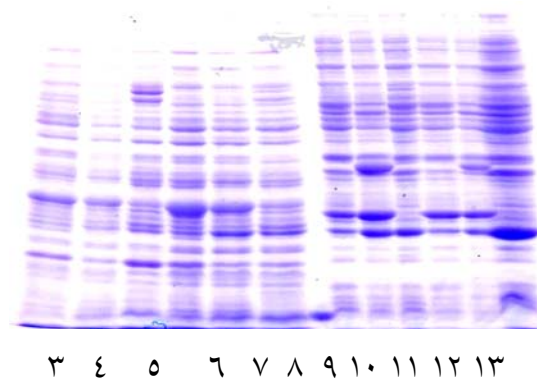
پس از اینکه نتایج اولیه از بررسی بیان نشان داد که سیستم ساخته شده توانایی لازم برای بیان پروتئین نوترکیب را دارد، مجموعه آزمایشهایی در جهت دستیابی به دما و مدت زمان مناسب برای القای حرارتی بر روی باکتری حاوی pZGY۳ انجام شد. بر این اساس در اولین گام میزان بیان پریپلاسمی پروتئین rhGM-CSF در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشاتی که بر روی باکتریها در شرایط القایی به مدت ۶ ساعت در حرارتهای ۳۷ °C، ۴۰ °C و ۴۲ °C رشد کرده بودند در مقایسه با شرایط غیرالقایی، نشان داد که میزان rhGM-CSF در فضای پریپلاسم در حرارتهای مختلف متفاوت است (شکل ۶). در ادامه آزمایشهای انجام شده، شرایط بهینه برای بیان rhGM-CSF و پردازش کامل آن به وسیله باکتری حاوی pZGY۳ تعیین شد. بنابراین بهترین دمای شوک حرارتی برای دستیابی به بیشترین

پروموتور λ PL نهاده شد که علاوه بر توانایی بیان پروتئین نوترکیب تحت القای حرارتی، با بهره‌گیری از توالی نشانه PelB قادر به بیان پروتئینهای نوترکیب در فضای پریپلاسمی *E. coli* است. با قرار گرفتن GM-CSF cDNA انسانی در این وکتورها بیان پریپلاسمی hGM-CSF نوترکیب تحت القای حرارتی نشان داده شد. بررسیهای انجام شده نشان داد که بیشترین بیان پروتئین GM-CSF انسانی در این سیستم تحت یک شوک حرارتی به مدت ۶ ساعت در دمای 37°C و یا 40°C اتفاق می‌افتد. اما این شرایط در آزمایشگاه و در مقیاس پایین به دست آمد و دستیابی به شرایط بهینه نیاز به انجام آزمایشهایی در مقیاس بالا و در نظر گرفتن عوامل مؤثر دیگر در رشد و بیان دارد.

با هدف افزایش کارایی این پلاسמיד، یک توالی خاتمه‌دهنده رونویسی و یک جایگاه کلون‌سازی چندگانه جدید به ساختار آن افزوده شد. مقایسه الگوی بیانی باکتریهای حاوی هر یک از دو پلاسמיד ساخته شده نشانگر توانایی آنها در بیان پروتئین نوترکیب است. نتایج به دست آمده تفاوت قابل ملاحظه‌ای را بین تأثیر حضور و عدم حضور توالی خاتمه رونویسی بر بیان پروتئین نوترکیب نشان نمی‌دهد.

استفاده از یک نوع پلاسמיד در این سیستم برخلاف سیستمهای معرفی شده به وسیله ریچاردسون و تابور^[۹] و گوپتا^[۸] و همکاران [۸] که تولید پروتئین نوترکیب را با استفاده از دو نوع پلاسמיד به طور همزمان در یک میزبان نشان داده بودند، میزان بار متابولیک بر سلول میزبان را بمراتب کاهش داد و موجب افزایش پایداری پلاسמידی در باکتریهای نوترکیب شد. علاوه بر این به دلیل حضور یک پلاسמיד فقط از یک مارکر انتخابی در طول مراحل رشد و بیان استفاده می‌شود که این امر نیز تسهیل در روند کلون‌سازی و سرانجام مراحل تولید پروتئین را به دنبال خواهد داشت. پروموتور قوی λ PL که در سیستم حاضر استفاده می‌شود به وسیله آنزیم RNA پلیمراز باکتریایی شناخته شده و می‌تواند به طور مستقیم برای بیان پروتئین استفاده شود به این ترتیب نیازی به استفاده از سویه‌های خاص از اشریشیاکلی به عنوان میزبان نیز وجود ندارد [۵]. پلاسמיד pZAY5 که واجد توالی خاتمه رونویسی و نیز مجهز به جایگاه کلون‌سازی چندگانه می‌باشد، ابزار مناسبی را برای کلون‌سازی و بیان پروتئینهای دیگر تحت القای حرارتی فراهم کرده است.

بر اساس شرایط بهینه رشد و القا که از مطالعه کلون pZGY3 به دست آمد، در مرحله بعد باکتریهای حاوی پلاسמיד pZGY5 (حاوی توالی خاتمه رونویسی) به موازات باکتریهای گروه اول (حاوی پلاسמיד pZGAY3) در شرایط یکسان در دمای 30°C رشد داده شده و سپس به مدت ۶ ساعت تحت شوک حرارتی 37°C و 40°C قرار گرفتند. الگوی پروتئینهای تام و پریپلاسمی این دو گروه کلون پس از القا با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط که در شکل ۶ مشاهده می‌گردد، نشانگر بیان پروتئین نوترکیب در هر دو گروه کلون است که از نظر اندازه با hGM-CSF استاندارد مطابقت می‌کند. این نتایج نشانگر افزایش نسبی بیان این پروتئین در شوک حرارتی 40°C در هر دو گروه است. مقایسه الگوی پروتئینهای سیتوپلاسمی و پریپلاسمی این کلونها نیز نشانگر پردازش کامل پروتئینها در هر دو گروه کلون است.



شکل ۶ بررسی الگوی پروتئینهای پریپلاسمی و سیتوپلاسمی در کلونهای pZAY5 پس از ۶ ساعت القا در حرارت 37°C در مقایسه با کلون pZAY5 در شرایط یکسان با روش SDS-PAGE. ردیف ۱: پریپلاسم کلون pZAY5-۱ در دمای 37°C ، ردیف ۲: پریپلاسم کلون pZAY5-۲ در دمای 37°C ، ردیف ۳: کلون pZGY3 در دمای 37°C ، ردیف ۴: پریپلاسم کلون pZAY5-۱ در دمای 40°C ، ردیف ۵: پریپلاسم کلون pZAY5-۲ در دمای 40°C ، ردیف ۶: پریپلاسم کلون pZGY3 در دمای 40°C ، ردیف ۷: GM-CSF استاندارد، ردیفهای ۸ تا ۱۳: الگوی سیتوپلاسمی مربوط به نمونه‌های ردیفهای ۱ تا ۶

۴- بحث

در تحقیق حاضر اساس یک وکتور بیان کننده جدید بر مبنای

۵- منابع

- [1] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *E. coli*. *Microbiol. Rev.* 1996; 60:512-538.
- [2] Hwang LH, Tsi HF, Liu ST. High level expression of porcine growth hormone in *E. coli* from an expression vector containing bacteriophage λ PL and N gene untranslated region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1990; 2: 711-717.
- [3] Remaut E, Stanssens P, Fiers W. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the PL promoter of coliphage lambda. *Gene* 1981; 15: 81-93.
- [4] Burnett V, Springer D. High level expression of human histon H₄ in *E. coli*. *Biotechniques* 1999; 26: 30-34.
- [5] Elvin CM, Thompson PR, Argall ME, Hendry P, Stamford NPJ, Lilly PE, Dixon NE. Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *E. coli*. *Gene* 1990; 87: 123-126.
- [6] Love A, Lilly E, Dixon E. Stable high-copy-number bacteriophage λ promoter vectors for overproduction of proteins in *E. coli*. *Gene* 1996; 176: 49-53.
- [7] Curless E, Pope J, Loredó L, Tsai B. Effect of preinduction specific growth rate on secretion of granulocyte macrophage colony stimulating factor by *E. coli*. *Biotechnol. Prog.* 1994; 10: 467-471.
- [8] Gupta CJ, Jaisani M, Pandey G, Mukherjee KJ. Enhancing recombinant protein yields in *Escherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible λ PL promoter. *J. Biotechnol* 1999; 68: 125-134.
- [9] Tabor S, Richardson C. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1985; 82:1074-1078.
- [10] Tabandeh F, Shojaosadati SA, Zomorodipour A, Khodabandeh M, Sanati MH, Yakhchali B. Heat-induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* 2004; 26: 245-250.
- [11] Ghanbarian H, Zomorodipour A, Ataei F, Shojai Sh, Yakhchali B. Expression of Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor Under Heat-Induction in *Escherichia coli*. *Journal of Science, Islamic Republic of Iran* 2004; 15(3): 203-210.
- [12] Armitage OJ. Emerging applications of recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood*, 1998; 12:4491-4508.
- [13] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Biotechnol.* 1999; 10: 411-421.
- [14] Sambrook J, Rucell D. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [15] Borjaliloo S, Zomorodipour A, Yakhchali B, Shojai Sh. The comparison of T7 and lac-based system for periplasmic expression of human granulocyte macrophage colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *The Iranian Journal of Biotechnology* 2003; 1(2): 101-108.
- [16] Libby TR, Braedt G, Kronheim RS, March JC, Urdal LD, Chiaverotti AT, Tushinski JR, Mochizuki YD, Hopp PT, Cosman D. Expression and purification of native human granulocyte-macrophage colony stimulating factor from an *Escherichia coli* secretion vector. *DNA* 1987; 3: 221-229.