

## ساخت پلاسمید بیان کننده پروتئین نوترکیب تحت القای حرارتی در اشریشیاکلی

فریبا عطائی<sup>۱</sup>، حسین قنبریان<sup>۲</sup>، علیرضا زمردی‌پور<sup>۳\*</sup>، باقر یخچالی<sup>۲</sup>

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

### چکیده

هدف: در بیان عامل تحیریک‌کننده رده گرانولوسیت - ماکروفاز انسانی (hGM-CSF)، در اشریشیاکلی تحت القای حرارتی، بر پایه پلاسمید (pBCSK)، که اختلاف آنها در حضور یا عدم حضور توالی خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری در پایین دست توالی کدکننده است پروتئین نوترکیب، ساخته شد.

مواد و روشها: دو پلاسمید بیان کننده حاوی یک قطعه ۷۵ جفت بازی از پرموتور باکتریوفاژی λPL، یک ژن جهش یافته از رپرسور CI (CI85V)، برای کنترل فعالیت پرموتور، که محصول آن حساس به حرارت است و یک ترادف نشانه PelB به منظور هدایت پروتئین نوترکیب به فضای پرپلاسمی 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 پرپلاسمی کلونهای به دست آمده دلالت دارد. با هدف افزایش کاربری پلاسمید حاوی خاتمه‌دهنده رونویسی برای بیان دیگر پروتئینهای نوترکیب تحت القای حرارتی، توالی کلون‌سازی چندگانه‌ای (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 کرده‌اند.

کلید واژگان: القای حرارتی، پرموتور λPL، ژن CI85V، ترادف نشانه، بیان پرپلاسمی و hGM-CSF

### ۱- مقدمه

مقیاس آزمایشگاهی و مقاصد مطالعاتی از القای کننده‌های شیمیایی استفاده می‌کنند؛ اما به دلیل سمی بودن و عدم صرفه اقتصادی برخی از آنها مانند IPTG برای تولید انبوه پروتئینهایی که بسویزه مصرف دارویی دارند، توصیه نمی‌شوند [۱]. به این منظور با

علاوه بر میزبان، شاید اصلیترین عامل در بیان انبوه پروتئینهای نوترکیب توالی پرموتور باشد که می‌تواند کنترل دقیق بیان را نیز در سطح رونویسی میسر سازد. برای کنترل فعالیت پرموتورهای مورد استفاده در تولید پروتئینهای نوترکیب به طور معمول در

تحت کترل پرموتور  $\lambda$ PPL انجام شد. این پلاسمید (PZGY<sup>3</sup>) بر پایه پلاسمید پرنسخه pBC(SK) ساخته شد و قادر به تولید پروتئین نوترکیب به طور مستقیم تحت کترل پرموتور  $\lambda$ PPL بود. پرموتور مذکور نیز با استفاده از رپرسور CI<sup>857</sup> حساس به حرارت که زن آن در پلاسمید تعییه شده است، تحت یک شیفت افزایشی حرارت قابل القاست. در تحقیق حاضر با هدف اصلاح ساختار پلاسمید pZGY<sup>3</sup> یک توالی خاتمه‌دهنده رونویسی به پایین دست زن نوترکیب در این پلاسمید اضافه شد. به علاوه یک جایگاه کلون‌سازی چندگانه جدید برای افزایش کارایی این پلاسمید برای کلون‌سازی سایر زنها به ساختار این پلاسمید اضافه شد و کارایی پلاسمید واحد توالی خاتمه‌دهنده رونویسی در مقایسه با پلاسمید قبلی با بیان عامل تحریک کلنی گرانولوسيت ماکروفاز انسانی نوترکیب (rhGM-CSF) که یک پروتئین دارویی برای درمان بیماریهایی از جمله لوکوپنی، سرطان مغز استخوان است [۱۲]، نشان داده شد.

## ۲- مواد و روشها

سویه TG1 از باکتری اشريشياکالی به عنوان میزبان در مراحل کلون‌سازی و برای بررسی بیان مورد استفاده قرار گرفت. آنزیمهای برشگر و DNA لیگاز T4 از شرکت روشه<sup>۱</sup> خریداری شدند. از محیط کشت LB<sup>۲</sup> برای رشد و تکثیر باکتریهای نوترکیب استفاده شد. در صورت لزوم آمپسیسیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ µg/ml، کاناامایسین یا کلرامفینیکل با غلظت نهایی ۳۰-۶۰ µg/ml به محیط کشت افزوده شد. برای ساخت محیط انتخابی برای غربالگری کلونهای نوترکیب علاوه بر آنتی‌بیوتیکهای مناسب، از IPTG با غلظت نهایی ۱mM<sup>۳</sup> و X-gal با غلظت نهایی ۴0 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 به کار گرفته شده در این طرح از جمله برش آنزیمی، الحق<sup>۴</sup>، ترازیختی<sup>۵</sup> و ... بر طبق روشهای استاندارد [۱۳] انجام گرفت. برای تخلیص DNA پلاسمیدی نیز از روش تجزیه

هدف حذف عوامل شیمیایی، سیستمهای بیان‌کننده قابل کترل با تغییر درجه حرارت و pH طراحی و به کار گرفته شده‌اند. از جمله پرموتورهای قابل کترل با تغییر درجه حرارت، پرموتورهای PL و PR مشتق شده از باکتریوفاژ لامبداست (۸) که به دلیل کترل آسان و قدرت بالا برای طراحی بسیاری از وکتورهای بیان‌کننده استفاده شده‌اند [۱-۳]. فعالیت این پرموتورها در سیستمهای بیان‌کننده اشريشياکالی به وسیله محصول جهش یافته‌ای از زن رپرسور CI<sup>857</sup> (CI<sup>857</sup>) و با بهره‌گیری از دمای محیط تنظیم می‌شود. رپرسور CI<sup>857</sup> در حرارت پایین (۳۰°C) فعال بوده و از بیان زن تحت کترول پرموتور  $\lambda$ PL جلوگیری می‌کند؛ با افزایش حرارت نیز تا ۴۲°C تغییر شکل پیدا کرده و قادر به اتصال به اپراتور نمی‌باشد [۴-۶]. به این ترتیب برای بیان پروتئین نوترکیب در این سیستم با تغییر حرارت محیط کشت از ۳۰°C به ۴۲°C، شکل و رفتار رپرسور CI<sup>857</sup> تغییر یافته و قدرت بازدارندگی آن از بین رفته و به این ترتیب رونویسی از زن تحت کترول پرموتورهای  $\lambda$ PL و  $\lambda$ PR افزایش می‌یابد [۷]. در برخی از تحقیقات، از این سیستم به طور غیر مستقیم برای بیان پروتئینهای نوترکیب، در یک سیستم دو پلاسمیدی استفاده شده است [۸-۹] برای این منظور زن RNA پلیمراز TV را تحت کترول پرموتور  $\lambda$ PL و همراه با زن CI<sup>857</sup> بر روی یک پلاسمید با تعداد نسخه‌های کم قرار داده و زن نوترکیب تحت کترول 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 [۱۰]. مشکل عمده این نوع سیستمهای به کارگیری دو پلاسمید متفاوت در یک میزبان به طور همزمان برای بیان کترول شده پروتئین نوترکیب است. حضور دو نوع پلاسمید به طور همزمان می‌تواند بار متابولیکی زیادی به سلول وارد کند. به علاوه با توجه به بالا بودن قدرت دو پرموتور  $\lambda$ PL و TV فعالیت همزمان آنها در روی این دو پلاسمید می‌تواند بر این بار بیفراشد 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 [۱۱]، مراحل اولیه شکل‌گیری یک سیستم بیان‌کننده القای حرارتی تک - پلاسمیدی پروتئینهای نوترکیب

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

*DraII* *ApaI* *KpnI* *Clal* *SmaI* *SacII* *KspI* *SacI*  
و *HpaI* *Eco109I* 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 OD<sub>500nm</sub>=۰.۵-۰.۸، القای رونویسی در حرارت ۴۲°C انجام شد و سپس نمونه‌های باکتریی 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<sup>۴</sup> (تشکیل شده از SDS=۰.۸٪، pH=۷.۸ Tris-Base ۱۰۰mM) گلیسرول ۲۰٪، بتا-مرکاپتواتانول ۱۰٪، بروموفنل بلو ۰.۰۲٪) 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 مععرض شوک اسمزی به شرح زیر انجام گرفت [۱۵]. اجزای باکتریایی به دست آمده از ۱/۵ ml از کشت Tris-HCl سلولی ابتدا در ۱ml ۱۵ از بافر TES (pH۸) شامل ۱۰mM EDTA، ۰/۵ mM ساکارز M و ۰/۵ mM تکانهای متناوب به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴°C نگاه داشته شدند. سپس با افزودن ۰.۰۵ μl ۲۲/۵ 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 rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شده و مایع رویی حاوی پروتئینهای پریپلاسمی و رسوب به دست آمده حاوی پروتئینهای اسپروفلاستی از یکدیگر جدا شدند. پس از افزودن TCA به میزان ۱۲٪ حجم نهایی به مایع رویی و سانتریفوژ با دور rpm ۱۰۰۰۰ 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 بلاستینگ براساس روشهای استاندارد انجام پذیرفت [۱۶].

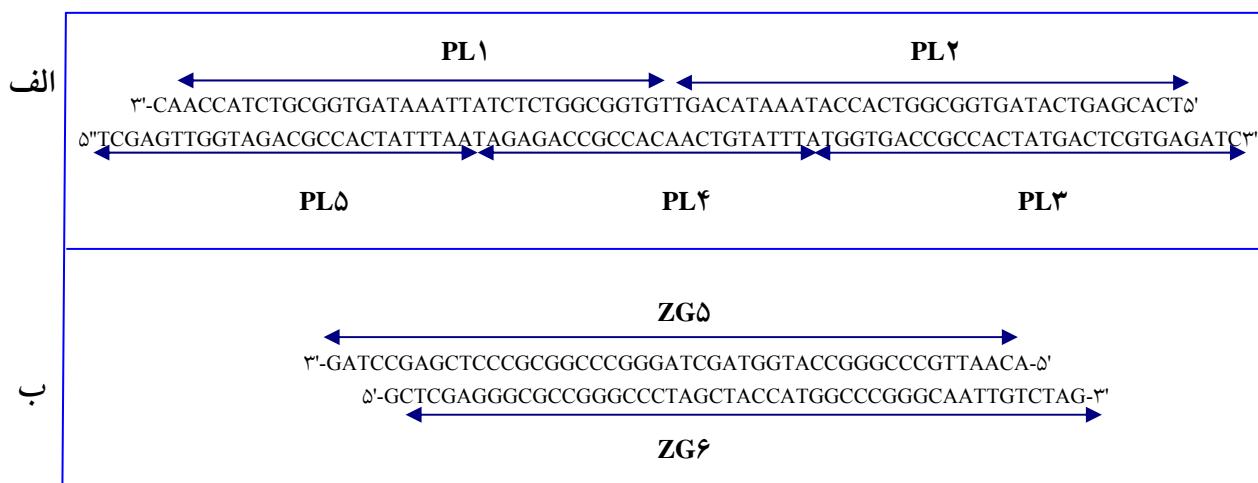
#### 4. Sample Solvent

(لیز) قلیایی که به وسیله سمبروک<sup>۱</sup> و راسل<sup>۲</sup> [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 کلینیها بر روی محیط‌های انتخابی، DNA پلاسمیدی بعد از تخلیص مورد آنالیز مولکولی با روشهای استاندارد قرار گرفت.

پلاسمید pZGY<sup>۳</sup> 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 کلرامفینیکل است که از پلاسمید pBC(sk) منشأ گرفته است. این پلاسمید همچنین حاوی یک قطعه ۷۵ DNA جفت بازی در برگیرنده بخشی اصلی از پروموتور λPL است. توالی اخیر از الحاق ۵ الیکونوکلوتیدی، از دو زنجیره مکمل مربوط به توالی پروموتور λPL به طوری طراحی و ساخته شد که جایگاههای برش خورده آنزیم SacI در انتهای<sup>۵</sup> و XbaI در انتهای<sup>۶</sup> آن باشد (شکل ۱-الف). پلاسمید pZGY<sup>۳</sup> همچنین واجد ژن CI857 است که از پلاسمید نوترکیب ۲ pGP1-۲ [۹] منشأ گرفته است. همچنین از پلاسمید نوترکیب pET26-GM-CSF [۱۴] به عنوان منبع cDNA مربوط به hGM-CSF متصل به توالی پیتید نشانه peIB استفاده شد.

برای ساخت پلاسمید اصلاح شده pZGAY<sup>۵</sup>، توالی خاتمه‌دهنده رونویسی با استفاده از آغازگرهای (ZG<sup>۳</sup>)CGGGATCCGAACAAAACTCATCTCA<sup>۵</sup>)' و (ZG<sup>۴</sup>)GGAATTCCGAATTCTGCAGAAGGCCAGTC<sup>۳</sup>)' با روشن PCR از پلاسمید pBAD<sup>۳</sup> تکثیر و پس از برش آنزیمی به پلاسمید pZGY<sup>۳</sup> وارد شد. از الحاق الیکونوکلوتیدهای ZG<sup>۵</sup> ZG<sup>۶</sup> برای ساخت قطعه MCS استفاده شد. برای تسهیل مراحل کلونسازی، توالیها به طریقی طراحی شده‌اند که پس از الحاق به یکدیگر، جایگاههای برش خورده آنزیم BamHI و BglIII در دو انتهای آن ایجاد شود. با استفاده از آن، قطعه مزبور در جایگاه BamHI پلاسمید نوترکیب (pZGAY<sup>۴</sup>) وارد شد (شکل ۱-ب). این قطعه MCS ساخته شده دارای جایگاههای BamHI و

1. Sambrook
2. Rucell
3. invitrogen



شکل ۱ الف: توالی نوکلئوتیدی قطعه پرموتوری  $\lambda$ PL که موقعیت پنج الگونوکلئوتید طراحی شده برای ساخت پرموتور نشان داده شده است؛ ب: توالی قطعه DNA ساخته شده حاوی جایگاه کلونسازی چندگانه (MCS) که در آن موقعیت دو الگونوکلئوتید ZN5 و ZN6 نشان داده شده است.

مطالعات بیان پروتئینی به سویه TG1 از اشريشياکلی منتقل شدند.

### ۲-۳- بررسی بیان پریپلاسمی rhGM-CSF در باکتریهای نوترکیب

پس از تأیید صحت مولکولی ساختار پلاسمیدهای نوترکیب، در اولین مرحله بررسی بیان پریپلاسمی rhGM-CSF بر روی تعدادی از کلونهای جدا شده از سویه TG1 اشريشياکلی حاوی پلاسمید pZGY3 انجام شد. به این ترتیب پروتئینهای این کلونها بعد از رشد و چهار ساعت القا در دمای  $42^{\circ}\text{C}$  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 پرموتور λPL بود (شکل ۳ - الف). همچنین نتایج به دست آمده از آزمایش ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی بادی اختصاصی ضد hGM-CSF نیز اختصاصی بودن آن را مورد تایید 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).

## ۳- نتایج

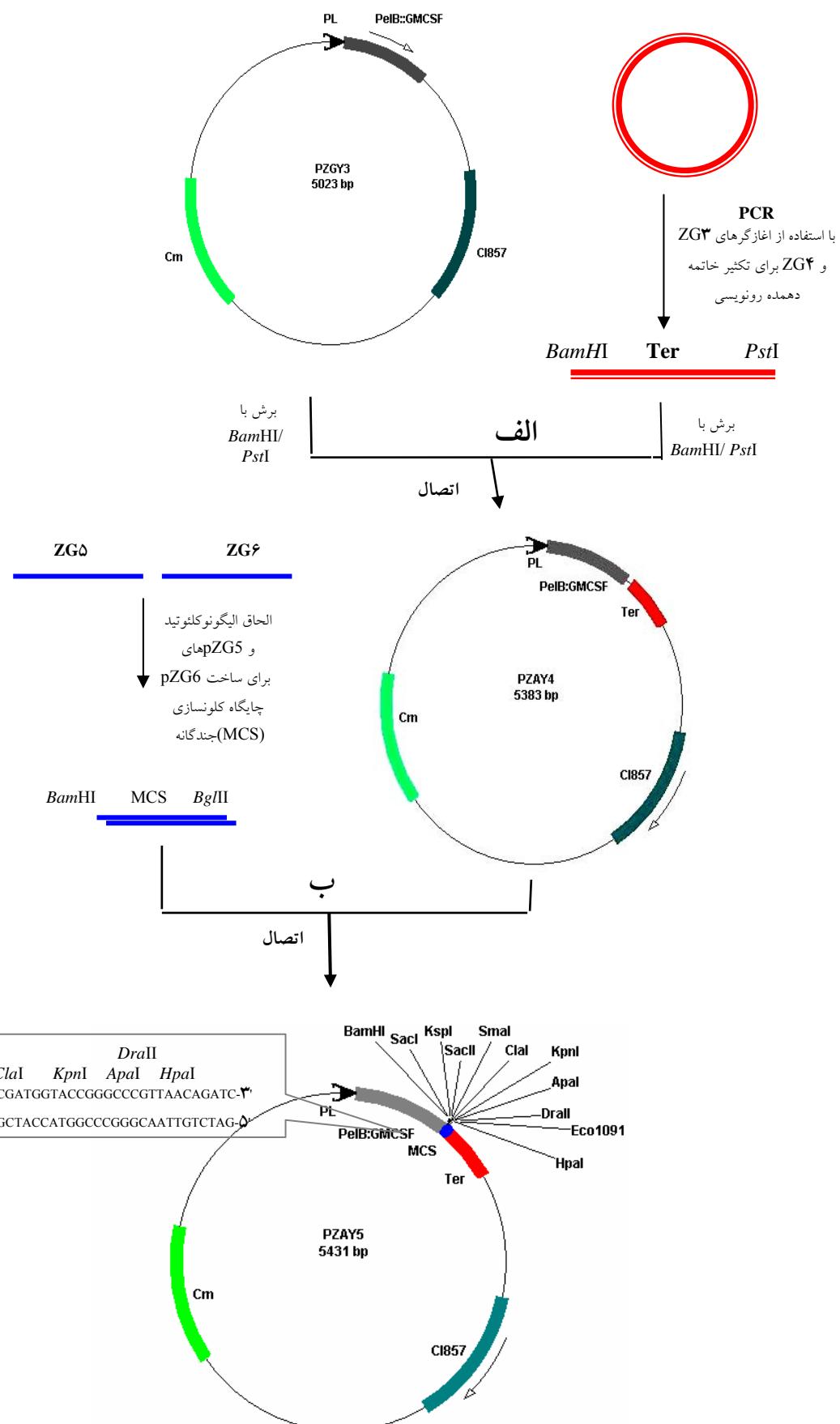
### ۱-۳- ساخت پلاسمیدهای نوترکیب

#### بیان کننده GM-CSF انسانی (pZAY5 و pZGY3)

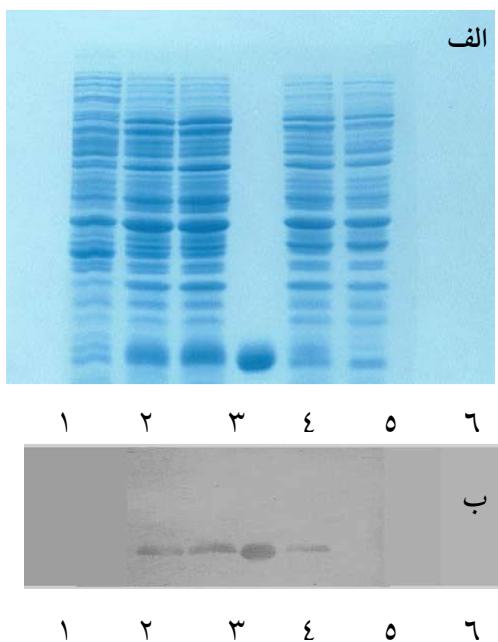
مراحل ساخت و تأیید پلاسمید نوترکیب pZGY3، بر پایه pBC(SK) ساخته شده در کار قبلی گزارش شده است [۱۱]. این پلاسمید شامل قطعه رمز کننده GM-CSF انسانی متصل به پیتید نشانه pelB [۱۴] است که در پایین دست قطعه ۷۵bp جفت بازی از λPL قرار گرفته و همچنین این پلاسمید دارای ژن CI857 رمز کننده رپرسور حساس به حرارت CI است. پلاسمید نوترکیب pZAY5 با قراردادن توالی خاتمه دهنده رونویسی در پلاسمید pZGY3 ساخته شد. این قطعه که با روش PCR و با استفاده از آغازگرهای ZG4 و ZG3 تکثیر شده، با آنزیمهای *Bam*H I و *Pst*I بریده و در فرودست کاست کننده 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 نوترکیب ساخته شده با روش برش آنزیمی و تعیین توالی تأیید و برای استفاده در

جدول ۱ بررسی کمی تأثیر زمانهای مختلف القا (ساعت) بر بیان rhGM-CSF در کلون pZGY3 در دمای  $37^{\circ}\text{C}$

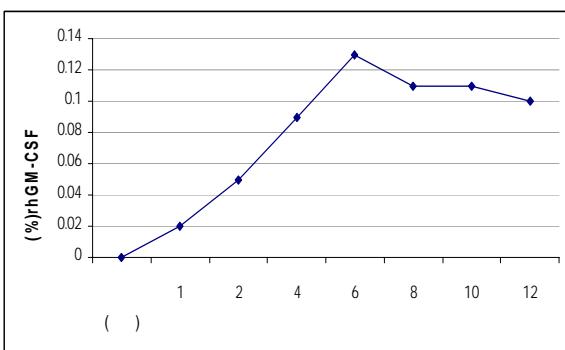
زمان القا (ساعت)								دماه القا
۱۲	۱۰	۸	۶	۴	۲	۱		
%۹-۱۱	%۱۰-۱۲	%۱۰-۱۲	%۱۲-۱۴	%۸-۱۰	%۴-۶	%۲		$37^{\circ}$

شکل ۲ مراحل ساخت پلاسمید نوترکیب<sup>۵</sup>

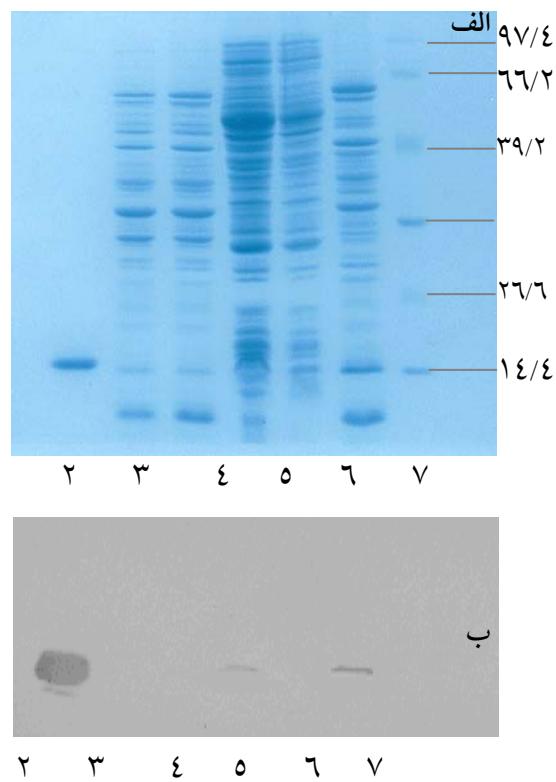
بیان rhGM-CSF در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  یا  $40^{\circ}\text{C}$  و زمان لازم برای این شوک حرارتی ۶ ساعت تخمین زده شد (شکل ۵).



شکل ۴ بررسی الگوی پروتئینهای پرپیلاسمی در کلون<sup>۳</sup> pZGY<sup>۳</sup> در دماهای مختلف القای با روش‌های الف: SDS-PAGE و ب: وسترن بلاستیگ. ردیف ۱: نمونه غیرالقایی، ردیفهای ۲، ۳ و ۵: بترتیب القای در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ،  $40^{\circ}\text{C}$  و  $42^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶ ساعت، ردیف ۴: پروتئین pZGY<sup>۲</sup> استاندارد، ردیف ۶: باکتری TG1 حاوی کلون<sup>۲</sup> GM-CSF (قادقدرت بیان) به عنوان کنترل منفی.



شکل ۵ بررسی الگوی پروتئینهای پرپیلاسمی و سیتوپلاسمی در کلونهای pZGY<sup>۵</sup> پس از ۶ ساعت القای در حرارت  $37^{\circ}\text{C}$  در مقایسه با کلون<sup>۵</sup> pZGY<sup>۵</sup> در شرایط یکسان با روش SDS-PAGE. ردیف ۱: پرپیلاسم کلون ۱ از pZGY<sup>۵</sup> در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ؛ ردیف ۲: پرپیلاسم کلون ۲ از pZGY<sup>۵</sup> در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ؛ ردیف ۳: پرپیلاسم کلون<sup>۳</sup> pZGY<sup>۳</sup> در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ ؛ ردیف ۴: پرپیلاسم کلون ۱ از pZGY<sup>۵</sup> در دمای  $40^{\circ}\text{C}$ ؛ ردیف ۵: پرپیلاسم کلون ۲ از pZGY<sup>۵</sup> در دمای  $40^{\circ}\text{C}$ ؛ ردیف ۶: پرپیلاسم کلون<sup>۲</sup> pZGY<sup>۲</sup> استاندارد؛ ردیفهای ۸ تا ۱۳: الگوی سیتوپلاسمی مربوط به نمونه‌های ردیفهای ۱-۶.



شکل ۳ بررسی الگوی تام، اسفلوبلاستی و پرپیلاسمی کلون<sup>۳</sup> pZGY<sup>۳</sup> با روش‌های الف: SDS-PAGE و ب: وسترن بلاستیگ. ردیف ۱: پروتئین GM-CSF به عنوان کنترل مثبت، ردیف ۲: باکتری TG1 حاوی کلون<sup>۲</sup> pZGY<sup>۲</sup> به عنوان کنترل منفی؛ ردیف ۳: نمونه غیر القایی و ردیفهای ۴، ۵ و ۶ بترتیب پروتئینهای تام، اسفلوبلاستی و پرپیلاسمی؛ ردیف ۷: مارکر پروتئینی low weight

### ۳-۳-۳- بررسی تأثیر دماها و زمانهای مختلف القای بر بیان hGM-CSF در کلون<sup>۳</sup>

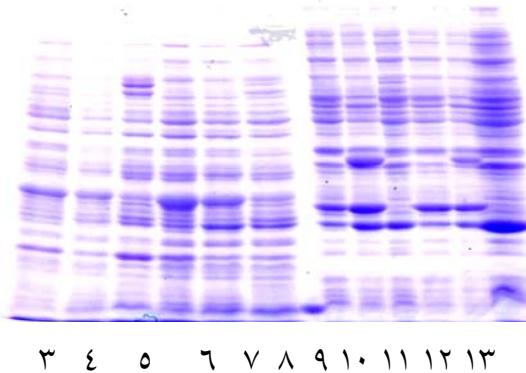
پس از اینکه نتایج اولیه از بررسی بیان نشان داد که سیستم ساخته شده توانایی لازم برای بیان پروتئین نوترکیب را دارد، مجموعه آزمایشهای در جهت دستیابی به دما و مدت زمان مناسب برای القای حرارتی بر روی باکتری حاوی pZGY<sup>۳</sup> انجام شد. بر این اساس در اولین گام میزان بیان پرپیلاسمی پروتئین rhGM-CSF در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشاتی که بر روی باکتریها در شرایط القایی به مدت ۶ ساعت در حرارت‌های  $37^{\circ}\text{C}$ ،  $40^{\circ}\text{C}$  و  $42^{\circ}\text{C}$  رشد کرده بودند در مقایسه با شرایط غیر القایی، نشان داد که میزان rhGM-CSF در فضای پرپیلاسم در حرارت‌های مختلف متفاوت است (شکل ۶). در ادامه آزمایش‌های انجام شده، شرایط بهینه برای بیان hGM-CSF و pZGY<sup>۳</sup> کامل آن به وسیله باکتری حاوی pZGY<sup>۳</sup> تعیین شد. بنابراین بهترین دمای شوک حرارتی برای دستیابی به بیشترین

پرومотор  $\lambda$ 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 پرپلasmی *E.coli* است. با قرار گرفتن GM-CSF cDNA انسانی در این وکتورها بیان پرپلasmی hGM-CSF نوترکیب تحت القای حرارتی نشان داده شد. بررسیهای انجام شده که بیشترین بیان پروتئین GM-CSF انسانی در این سیستم تحت یک شوک حرارتی به مدت ۶ ساعت در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و یا  $40^{\circ}\text{C}$  اتفاق می‌افتد. اما این شرایط در آزمایشگاه و در مقیاس پایین به دست آمد و دستیابی به شرایط بهینه نیاز به انجام آزمایشها در مقیاس بالا و درنظر گرفتن عوامل مؤثر دیگر در رشد و بیان دارد.

با هدف افزایش کارایی این پلasmید، یک توالی خاتمه‌دهنده رونویسی و یک جایگاه کلون‌سازی چندگانه جدید به ساختار آن افروده شد. مقایسه الگوی بیانی باکتریهای حاوی هر یک از دو پلasmید 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 پلasmید در این سیستم برخلاف سیستمهای معرفی شده به وسیله ریچاردسون و تابور<sup>۱</sup> [۹] و گوپتا<sup>۲</sup> و همکاران [۸] که تولید پروتئین نوترکیب را با استفاده از دو نوع پلasmید به طور همزمان در یک میزبان نشان داده بودند، میزان بار متابولیک بر سلول میزبان را بمراتب کاهش داد و موجب افزایش پایداری پلasmیدی در باکتریهای نوترکیب شد. علاوه بر این به دلیل حضور یک پلasmید 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. پرومотор قوی  $\lambda$ 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 اشريشياکلى به عنوان میزبان نیز وجود ندارد<sup>[۵]</sup>. پلasmید pZAY<sup>۵</sup> 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.

براساس شرایط بهینه رشد و القا که از مطالعه کلون pZGY<sup>۳</sup> به دست آمد، در مرحله بعد باکتریهای حاوی پلasmid (حاوی توالی خاتمه رونویسی) به موازات باکتریهای گروه اول (حاوی پلasmid pZGAY<sup>۳</sup>) در شرایط یکسان در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  رشد داده شده و سپس به مدت ۶ ساعت تحت شوک حرارتی  $37^{\circ}\text{C}$  و  $40^{\circ}\text{C}$  قرار گرفته. الگوی پروتئینهای تام و پرپلasmی 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  $40^{\circ}\text{C}$  در هر دو گروه است. مقایسه الگوی پروتئینهای سیتوپلasmی و پرپلasmی این کلونها نیز نشانگر پردازش کامل پروتئینها در هر دو گروه کلون است.



شکل ۶ بررسی الگوی پروتئینهای پرپلasmی و سیتوپلasmی در کلونهای pZAY<sup>۵</sup> پس از ۶ ساعت القا در حرارت  $37^{\circ}\text{C}$  در مقایسه با کلون pZAY<sup>۵</sup> در شرایط یکسان با روش SDS-PAGE. ردیف ۱: پرپلasm کلون ۱ pZAY<sup>۵-۱</sup> در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ , ردیف ۲: پرپلasm کلون ۲ pZAY<sup>۵-۲</sup> در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ , ردیف ۳: کلون pZGY<sup>۳</sup> در دمای  $37^{\circ}\text{C}$ , ردیف ۴: پرپلasm کلون pZAY<sup>۵-۱</sup> در دمای  $40^{\circ}\text{C}$ , ردیف ۵: پرپلasm کلون pZGY<sup>۳</sup> در دمای  $40^{\circ}\text{C}$ , ردیف ۶: پرپلasm کلون pZGY<sup>۳</sup> در دمای  $40^{\circ}\text{C}$ , ردیف ۷: GM-CSF استاندارد، ردیفهای ۸ تا ۱۳: الگوی سیتوپلasmی 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  $\lambda$ 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 H<sub>4</sub> 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  $\lambda$  promoter vectors for overproduction of proteins in *E. coli*. *Gene* 1996; 176: 49-53.
- [7] Curless E, Pope J, Loredo 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  $\lambda$ 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, Shoja 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, Shoja 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.

1. Richardson & Tabor  
2. Gupta