مجلهٔ علوم پزشکی مدرس
دورهٔ ۸ ، شمارهٔ ۱: از ۳۷ تا ٤٤
بهار و تابستان ۱۳۸٤

ساخت پلاسمید بیان‌کننده پروتئین نوترکیب تحت القای حرارتی در اشریشیاکلی

فریبا عطائی[۱]، حسین قنبریان[۲]، علیرضا زمردی‌پور[۳*]، باقر یخچالی[۳]

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

چکیده

هدف: در بیان عامل تحریک‌کننده 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 خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری در پایین دست توالی کدکننده است پروتئین نوترکیب، ساخته شد.

مواد و روشها: دو پلاسمید بیان‌کننده حاوی یک قطعه ۷۵ جفت بازی از پروموتور باکتریوفاژی λPL، یک ژن جهش یافته از رپرسور CI (CI۸۵۷)، 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 ساخته‌شده با بیان hGM-CSF تحت القای حرارتی در اشریشیاکلی آزمایش شده است.

نتایج: نتایج حاصل از آنالیز پروتئینهای باکتریهای نوترکیب (TG۱) حاوی هر یک از دو پلاسمید نوترکیب بعد از شوک حرارتی بر بیان و پردازش کامل GM-CSF انسانی نوترکیب در فضای پریپلاسمی کلونهای به‌دست 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.

نتیجه‌گیری: پلاسمیدهای ساخته‌شده در این تحقیق ابزارهای مناسبی را برای انجام مطالعات مربوط به بیان پروتئینهای نوترکیب در اشریشیاکلی فراهم کرده‌اند.

کلید واژگان: القای حرارتی، پروموتور λPL، ژن CI۸۵۷، ترادف نشانه، بیان پریپلاسمی و hGM-CSF.

۱- مقدمه

علاوه بر میزبان، شاید اصلیترین عامل در بیان انبوه پروتئینهای نوترکیب توالی پروموتور باشد که می‌تواند کنترل دقیق بیان را نیز در سطح رونویسی میسر سازد. برای کنترل فعالیت پروموتورهای مورد استفاده در تولید پروتئینهای نوترکیب به‌طور معمول در مقیاس آزمایشگاهی و مقاصد مطالعاتی از القا کننده‌های شیمیایی استفاده می‌کنند؛ اما به دلیل سمی بودن و عدم صرفه اقتصادی برخی از آنها مانند IPTG برای تولید انبوه پروتئینهایی که بویژه مصرف دارویی دارند، توصیه نمی‌شوند [۱]. به این منظور با

* نشانی مکاتبه: تهران صندوق پستی: ٦۳٤۳-۱٤۱٥٥
E-mail: zomorodi@nrcgeb.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]

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 [۱-۳]. فعالیت این پروموتورها در سیستمهای بیان‌کننده اشریشیاکلی به‌وسیله محصول جهش یافته‌ای از ژن رپرسور CI (CI۸۵۷) و با بهره‌گیری از دمای محیط تنظیم می‌شود. رپرسور CI۸۵۷ در حرارت پایین (۳۰°C) فعال بوده و از بیان ژن تحت کنترل پروموتور λPL جلوگیری می‌کند؛ با افزایش حرارت نیز تا ٤۲°C تغییر شکل پیدا کرده و قادر به اتصال به اپراتور نمی‌باشد [٤-٦]. به این ترتیب برای بیان پروتئین نوترکیب در این سیستم با تغییر حرارت محیط کشت از ۳۰°C به ٤۲°C، شکل و رفتار رپرسور CI۸۵۷ تغییر یافته و قدرت بازدارندگی آن از بین رفته و به این ترتیب رونویسی از ژن تحت کنترل پروموتورهای λPL و λPR افزایش می‌یابد [۷]. در برخی از تحقیقات، از این سیستم به‌طور غیر مستقیم برای بیان پروتئینهای نوترکیب، در یک سیستم دو پلاسمیدی استفاده شده است [۸، ۹]. برای این منظور ژن RNA پلیمراز T۷ را تحت کنترل پروموتور λPL و همراه با ژن CI۸۵۷ بر روی یک پلاسمید با تعداد نسخه‌های کم قرار داده و ژن نوترکیب تحت کنترلT۷ 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 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 پروموتورλPL و T۷ 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 [۱۱]، مراحل اولیه شکل‌گیری یک سیستم بیان‌کننده القای حرارتی تک - پلاسمیدی پروتئینهای نوترکیب تحت کنترل پروموتور λPL انجام شد. این پلاسمید (PZGY۳) بر پایه پلاسمید پرنسخه pBC(SK) ساخته شد و قادر به تولید پروتئین نوترکیب به‌طور مستقیم تحت کنترل پروموتور λPL بود. پروموتور مذکور نیز با استفاده از رپرسور CI۸۵۷ 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 pZGY۳ 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 [۱۲]، نشان داده شد.

۲- مواد و روشها

سویه TG۱ از باکتری *اشریشیاکلی* به‌عنوان میزبان در مراحل کلون‌سازی و برای بررسی بیان مورد استفاده قرار گرفت. آنزیمهای برشگر و DNA لیگاز T٤ از شرکت روشه[1] خریداری شدند. از محیط کشت LB[2] برای رشد و تکثیر باکتریهای نوترکیب استفاده شد. در صورت لزوم آمپی‌سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ μg/ml، کانامایسین یا کلرامفنیکل با غلظت نهایی ۳۰-٦۰μg/ml به محیط کشت افزوده شد. برای ساخت محیط انتخابی برای غربالگری کلونهای نوترکیب علاوه بر آنتی‌بیوتیکهای مناسب، از IPTG با غلظت نهایی ۱mM و X-gal با غلظت نهایی ٤۰μg/ml استفاده شد. آنتی بادی 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[3]، تراریختی[4] و ... بر طبق روشهای استاندارد [۱۳] انجام گرفت. برای تخلیص DNA پلاسمیدی نیز از روش تجزیه

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]

(لیز) قلیایی که به‌وسیلهٔ سمبروک[1] و راسل[2] [۱٤] 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 کلنیها 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 به‌طور 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 جفت‌بازی دربرگیرنده بخشی اصلی از پروموتور λPL است. توالی اخیر از الحاق ۵ الیگونوکلئوتید، از دو زنجیره مکمل مربوط به توالی پروموتور λPL به‌طوری 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 CI۸۵۷ است که از پلاسمید نوترکیب pGP1-۲ [۹] منشأ گرفته است. همچنین از پلاسمید نوترکیب pET۲٦-GM-CSF [۱٤] به‌عنوان منبع cDNA مربوط به hGM-CSF متصل به توالی پپتید نشانه pelB استفاده شد.

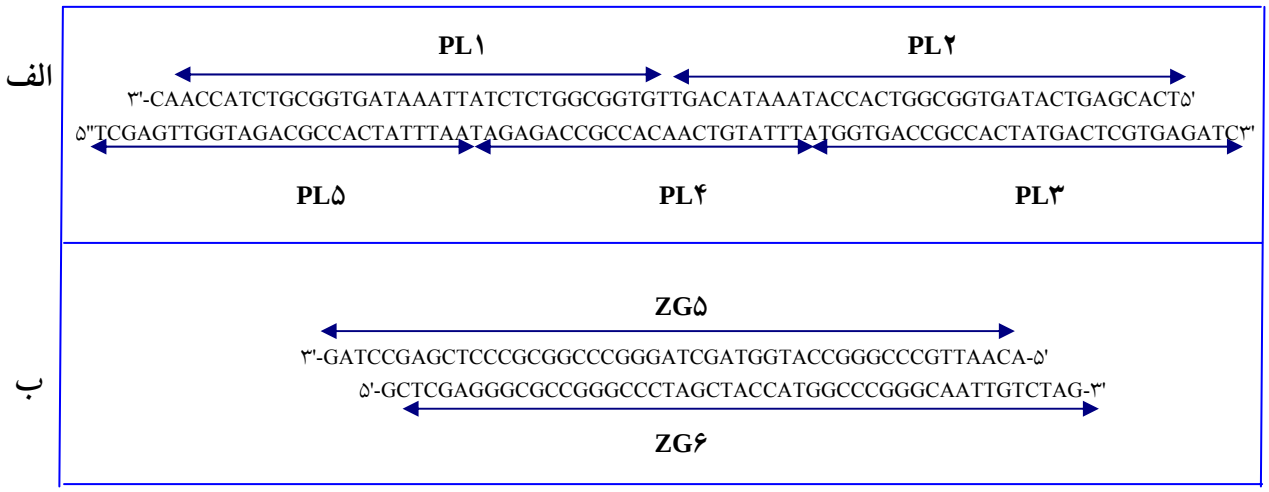
برای ساخت پلاسمید اصلاح شده pZGAY۵، توالی خاتمه‌دهنده رونویسی با استفاده از آغازگرهای ZG۳(۳'CGGGATCCCGAACAAAAACTCATCTCA۵') و ZG٤(۵'GGAATTCCGAATTCTGCAGAAGGCCCAGTC۳') با روش PCR از پلاسمید pBAD[3] تکثیر و پس از برش آنزیمی به پلاسمید pZGY۳ وارد شد. از الحاق الیگونوکلئوتیدهای ZG٦، ZG۵ برای ساخت قطعه MCS استفاده شد. برای تسهیل مراحل کلون‌سازی، توالیها به طریقی طراحی شده‌اند که پس از الحاق به یکدیگر، جایگاههای برش خورده آنزیم *Bam*HI و *Bgl*II در دو انتهای آن ایجاد شود. با استفاده از آن، قطعه مزبور در جایگاه *Bam*HI پلاسمید نوترکیب (pZGAY٤) وارد شد (شکل ۱- ب). این قطعه MCS ساخته شده دارای جایگاههای *Bam*HI، *Sac*I، *Ksp*I، *Sac*II، *Sma*I، *Cla*I، *Kpn*I، *Apa*I، *Dra*II، *Eco*۱۰۹۱ و *Hpa*I است.

برای بررسی بیان rhGM-CSF به‌وسیلهٔ 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 $OD_{٦٠٠}$=۰/۵-۰/۸، القای رونویسی در حرارت ٤۲°C انجام شد و سپس نمونه‌های باکتریی برای بررسی بیان آزمایش شدند. برای تهیه پروتئینهای تام باکتریایی، سلولهای باکتریایی به‌دست آمده از ۱ml از کشت سلولی مطابق روش استاندارد [۱٤] مورد بررسی قرار گرفت. این روش به‌طور خلاصه به شرح زیر انجام شد. پس از سانتریفوژ مخلوط سلولی رسوب حاصل در بافر نمونه[4] (تشکیل شده از ۱۰۰mM Tris-Base (pH=٦/۸)، ٤٪ SDS، گلیسرول ۲۰٪، بتا- مرکاپتواتانل ۱۰٪، برومونفل بلو ۰/۲٪) حل گردید. سپس محلول به‌دست 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 به‌دست آمده از ۱/۵ ml از کشت سلولی ابتدا در ۱۵µl از بافر TES (pH۸) شامل Tris-HCl ۱۰mM، EDTA ۰/۵ mM و ساکارز ۰/۵ M، حل شد و با تکانهای متناوب به مدت ۲۰دقیقه در دمای ٤°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 ٤ °C سانتریفوژ شده و مایع رویی حاوی پروتئینهای پریپلاسمی و رسوب به‌دست آمده حاوی پروتئینهای اسفروبلاستی از یکدیگر جدا شدند. پس از افزودن TCA به میزان ۱۲٪ حجم نهایی به مایع رویی و سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰۰rpm در دمای ٤°C به مدت ۱۰دقیقه پروتئینهای پریپلاسمی باکتریایی رسوب داده شده و در بافر نمونه حل شدند. آزمایشهای SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ براساس روشهای استاندارد انجام پذیرفت [۱٦].

1. Sambrook
2. Rucell
3. invitrogen
4. Sample Solvent

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]



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 ZN۵ و ZG۶ نشان داده شده است.

۳- نتایج

۳-۱- ساخت پلاسمیدهای نوترکیب بیان‌کننده GM-CSF انسانی (pZGY۳ و pZAY۵)

مراحل ساخت و تأیید پلاسمید نوترکیب pZGY۳ ، 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 [۱٤] است که در پایین دست قطعه ۷۵bp جفت‌بازی از λPL قرار گرفته و همچنین این پلاسمید دارای ژن CI۸۵۷ رمز کننده رپرسور حساس به حرارت CI است.

پلاسمید نوترکیب pZAY۵ با قراردادن توالی خاتمه‌دهنده رونویسی در پلاسمید pZGY۳ ساخته شد. این قطعه که با روش PCR و با استفاده از آغازگرهای ZG۳ و ZG٤ تکثیر شده، با آنزیمهای *Bam*HI و *pst*I بریده و در فرودست کاست کدکننده PelB::GM-CSF قرار داده شد (شکل۲). 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 (شکل۲). پلاسمیدهای نوترکیب ساخته شده با روش برش آنزیمی و تعیین توالی تأیید و برای استفاده در مطالعات بیان پروتئینی به سویه TG۱ از اشریشیاکلی منتقل شدند.

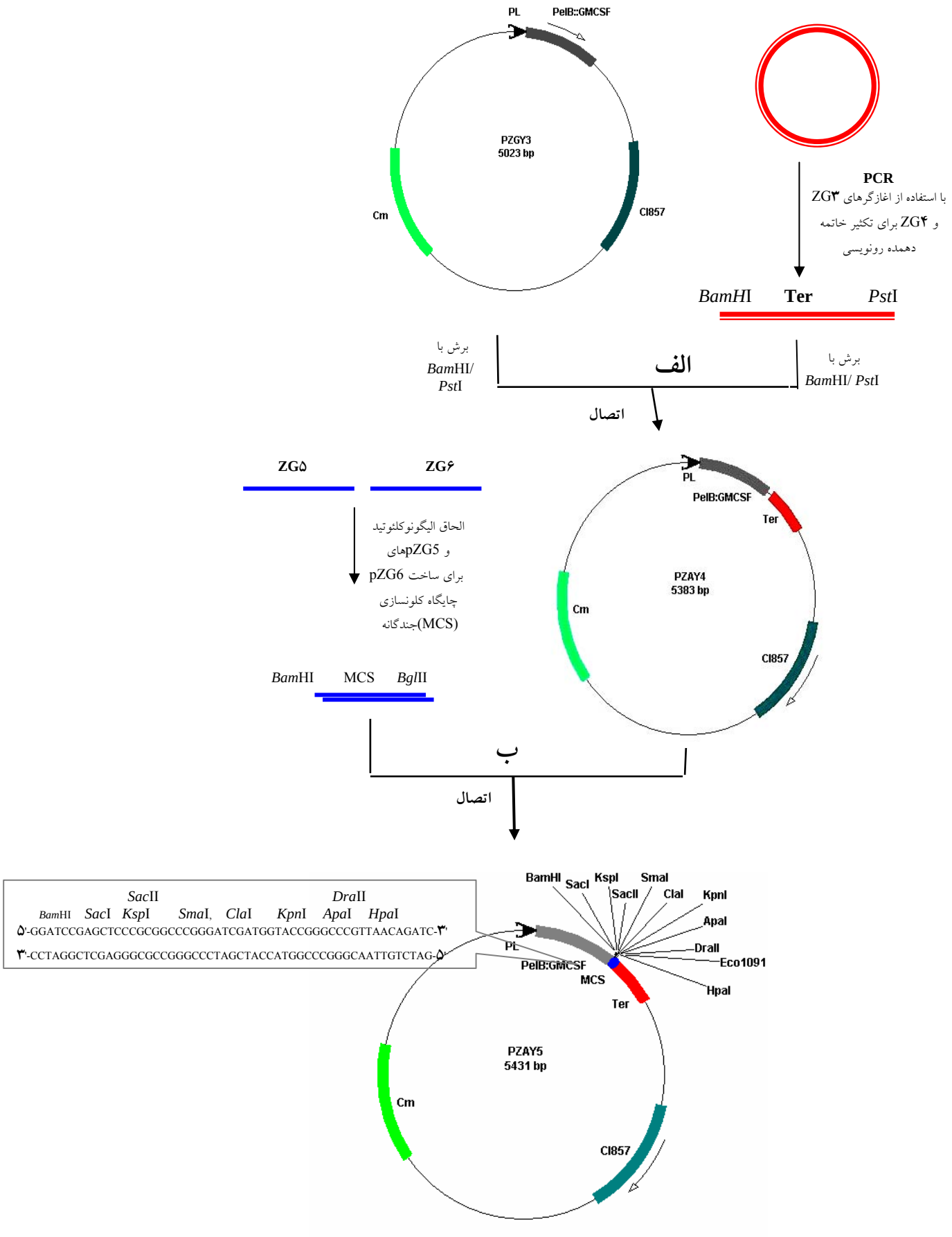
۳-۲- بررسی بیان پریپلاسمی rhGM-CSF در باکتریهای نوترکیب

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 TG۱ اشریشیاکلی حاوی پلاسمید pZGY۳ انجام شد. به این ترتیب پروتئینهای این کلونها بعد از رشد و چهار ساعت القا در دمای ٤۲°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 پروموتورλPL بود (شکل۳ – الف). همچنین نتایج به‌دست آمده از آزمایش ایمونوبلاتینگ با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ضد hGM-CSF نیز اختصاصی بودن آن را مورد تایید کرد (شکل۳- 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 (شکل۳).

جدول۱ بررسی کمی تأثیر زمانهای مختلف القا(ساعت) بر بیان rhGM-CSF در کلون pZGY۳ در دمای۳۷°C

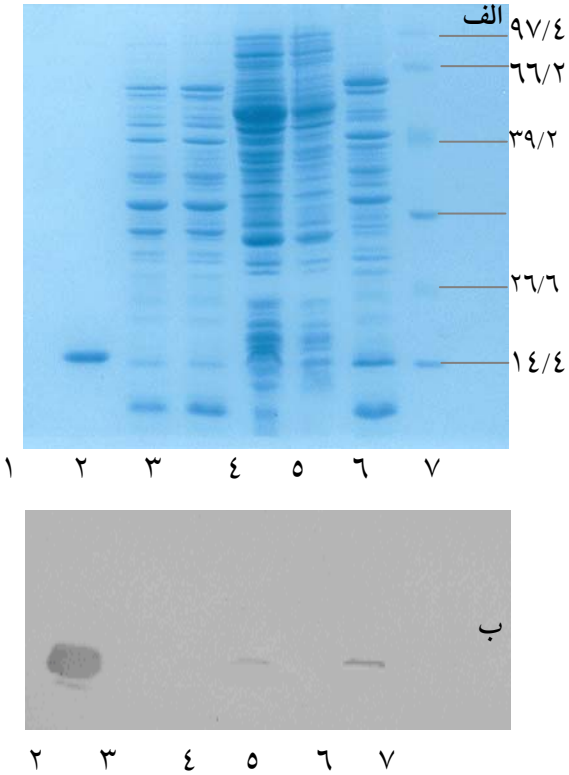
زمان القا (ساعت) / دمای القا	۱	۲	٤	٦	۸	۱۰	۱۲
۳۷°	٪۲	٪٤-٦	٪۸-۱۰	٪۱۲-۱٤	٪۱۰-۱۲	٪۱۰-۱۲	٪۹-۱۱

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]



شکل۲ مراحل ساخت پلاسمید نوترکیب pZAY۵

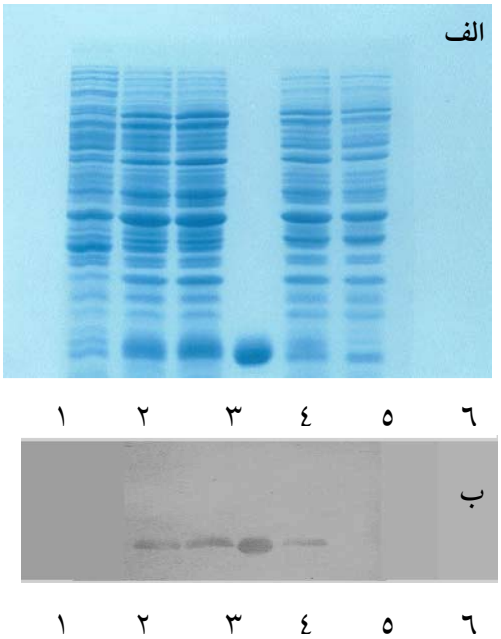
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]



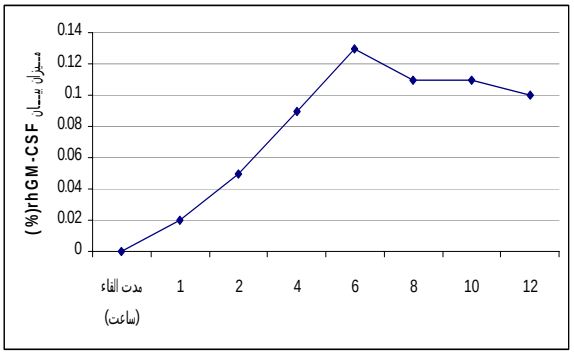
شکل۳ بررسی الگوی تام، اسفروبلاستی و پریپلاسمی کلون pZGY۳ با روشهای الف: SDS-PAGE و ب: وسترن بلاتینگ. ردیف۱: پروتئین GM-CSF به‌عنوان کنترل مثبت، ردیف ۲: باکتری TG۱ حاوی کلون pZGY۲ به‌عنوان کنترل منفی؛ ردیف ۳: نمونه غیر القایی و ردیفهای ٤، ٥ و ٦ بترتیب پروتئینهای تام، اسفروبلاستی و پریپلاسمی؛ ردیف ۷: مارکر پروتئینی low weight

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

پس از اینکه نتایج اولیه از بررسی بیان نشان داد که سیستم ساخته‌شده 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 ٦ ساعت در حرارتهای ۳۷°C ، ٤۰°C و ٤۲°C رشد کرده بودند در مقایسه با شرایط غیر القایی، نشان داد که میزان rhGM-CSF در فضای پریپلاسم در حرارتهای مختلف متفاوت است (شکل٤). در ادامه آزمایشهای انجام شده، شرایط بهینه برای بیان rhGM-CSF و پردازش کامل آن به‌وسیله باکتری حاوی pZGY۳ تعیین شد. بنابراین بهترین دمای شوک حرارتی برای دستیابی به بیشترین بیان rhGM-CSF در دمای ۳۷°C یا ٤۰°C و زمان لازم برای این شوک حرارتی ٦ ساعت تخمین زده شد (شکل ٥).



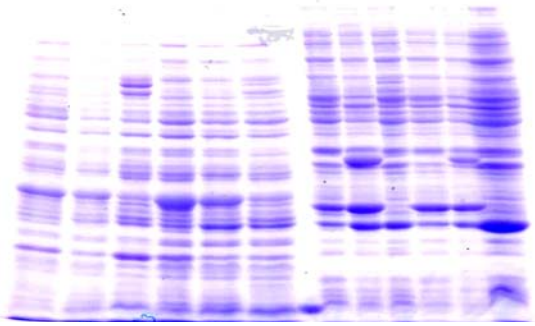
شکل ٤ بررسی الگوی پروتئینهای پریپلاسمی در کلون pZGY۳ در دماهای مختلف القا با روشهای الف: SDS-PAGE و ب: وسترن بلاتینگ. ردیف ۱: نمونه غیرالقایی، ردیفهای ۲، ۳ و ٥: بترتیب القا در دمای ٤۰°C، ۳۷°C و ٤۲°C به مدت ٦ ساعت، ردیف ٤: پروتئین GM-CSF استاندارد، ردیف ٦: باکتری TG۱ حاوی کلون pZGY۲ (فاقد قدرت بیان) به‌عنوان کنترل منفی.



شکل ٥ بررسی الگوی پروتئینهای پریپلاسمی و سیتوپلاسمی در کلونهای pZGY٥ پس از ٦ ساعت القا در حرارت ۳۷°C در مقایسه با کلون pZGY٥ در شرایط یکسان با روش SDS-PAGE. ردیف۱: پریپلاسم کلون ۱ از pZGY٥ در دمای ۳۷°C؛ ردیف۲: پریپلاسم کلون ۲ از pZGY٥ در دمای ۳۷°C؛ ردیف ۳: پریپلاسم کلون pZGY۳ در دمای ۳۷°C؛ ردیف ٤: پریپلاسم کلون ۱ از ٥ pZGY در دمای ٤۰°C؛ ردیف ٥: پریپلاسم کلون ۲ از pZGY٥ در دمای ٤۰°C؛ ردیف ٦: پریپلاسم کلون pZGY۳ در دمای ٤۰°C؛ ردیف ۷: GM-CSF استاندارد؛ ردیفهای ۸ تا ۱۳: الگوی سیتوپلاسمی مربوط به نمونه‌های ردیفهای ۱-٦.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]

براساس شرایط بهینه رشد و القا که از مطالعه کلون pZGY۳ به‌دست آمد، در مرحله بعد باکتریهای حاوی پلاسمید pZGY۵ (حاوی توالی خاتمه رونویسی) به موازات باکتریهای گروه اول (حاوی پلاسمید pZGAY۳) در شرایط یکسان در دمای ۳۰°C رشد داده شده و سپس به‌مدت ٦ ساعت تحت شوک حرارتی ۳۷°C و ٤۰°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 ٦ 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 ٤۰°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.



۳ ٤ ٥ ٦ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳

شکل ٦ بررسی الگوی پروتئینهای پریپلاسمی و سیتوپلاسمی در کلونهای pZAY۵ پس از ٦ ساعت القا در حرارت ۳۷°C در مقایسه با کلون pZAY۵ در شرایط یکسان با روش SDS-PAGE. ردیف۱: پریپلاسم کلون pZAY۵-۱ در دمای ۳۷°C، ردیف۲: پریپلاسم کلون pZAY۵-۲ در دمای ۳۷°C، ردیف ۳: کلون pZGY۳ در دمای ۳۷°C، ردیف ٤: پریپلاسم کلون pZAY۵-۱ در دمای ٤۰°C، ردیف ٥: پریپلاسم کلون pZAY۵-۲ در دمای ٤۰°C، ردیف ٦: پریپلاسم کلون pZGY۳ در دمای ٤۰°C، ردیف ۷: GM-CSF استاندارد، ردیفهای ۸ تا ۱۳: الگوی سیتوپلاسمی مربوط به نمونه‌های ردیفهای ۱ تا ٦

٤- بحث

در تحقیق حاضر اساس یک وکتور بیان کننده جدید بر مبنای پروموتور λPL 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 به‌مدت ٦ ساعت در دمای ۳۷°C و یا ٤۰°C اتفاق می‌افتد. اما این شرایط در آزمایشگاه و در مقیاس پایین به‌دست آمد و دستیابی به شرایط بهینه نیاز به انجام آزمایشهایی در مقیاس بالا و درنظر گرفتن عوامل مؤثر دیگر در رشد و بیان دارد.

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

استفاده از یک نوع پلاسمید در این سیستم برخلاف سیستمهای معرفی شده به‌وسیله ریچاردسون و تابور[1] [۹] و گوپتا[2] و همکاران [۸] که تولید پروتئین نوترکیب را با استفاده از دو نوع پلاسمید به‌طور همزمان در یک میزبان نشان داده بودند، میزان بار متابولیک بر سلول میزبان را بمراتب کاهش داد و موجب افزایش پایداری پلاسمیدی در باکتریهای نوترکیب شد. علاوه براین به‌دلیل حضور یک پلاسمید 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 به‌دنبال خواهد داشت. پروموتور قوی λPL که در سیستم حاضر استفاده می‌شود به‌وسیله آنزیم RNA پلیمراز باکتریایی شناخته شده و می‌تواند به‌طور مستقیم برای بیان پروتئین استفاده شود به این ترتیب نیازی به استفاده از سویه‌های خاص از اشریشیاکلی به عنوان میزبان نیز وجود ندارد[٥]. پلاسمید pZAY۵ 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.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]

۵- منابع

[1] Makrides SC. Strategies for achiving 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 λPL and N gene untranslated region. Biochemical and Biophisical Research Communications 1990; 2: 711-717.

[3] Remaut E, Stanssens P, Fiers W. Plasmid vectors for high-efficiency expression contr- olled by the PL promoter of coliphage lambda. *Gene* 1981; 15: 81-93.

[4] Burnett V, Springer D. High level expression of human histon H_4 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, 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 *scherichia coli* using the T7 system under the control of heat inducible λPL promoter. J. Biotechnol 1999; 68: 125-134.

[9] Tabor S, Richardson C.A bacteriophage T7 RNA polimerase/promoter system for controlled enclusive 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.

1. Richardson & Tabor
2. Gupta

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-27]