Archive of SID

فصلنامه علمی – پژوهشی «دانش زیستی ایران» - جلد ۳/ شماره ۱/ بهار ۱۳۸۷

ارزیابی تاثیر جایگزینی کدون‌های نادر با کدون‌های بهینه در ناحیه شروع ترجمه ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی (*hbfgf*) بر میزان بیان این فاکتور در باکتری اشرشیا کلی

مهری عابدی خلیل آباد [۱،*] ، حسن میرزاحسینی [۲]، غلامرضا جوادی نیا [۳]

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲ـ استادیار، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

۳ـ دانشیار ژنتیک انسانی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

محل انجام تحقیق: انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی

***مسؤول مکاتبات:** مهری عابدی خلیل آباد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تلفن: ۰۹۱۲۸۱۵۵۴۷۹ ، پست الکترونیکی: mehr_abedi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۴ تاریخ پذیرش ۸۸/۱/۲۵

چکیده

میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب در باکتری اشرشیا کلی تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد، یکی از مهم‌ترین عوامل، وجود کدون‌های نادر است. دیده شده است که جایگزینی کدون ها در ناحیه شروع ترجمه ژن به شدت بر میزان بیان پروتئین های خارجی درباکتری اشرشیا کلی تاثیر می گذارد. هدف از این تحقیق ارزیابی تاثیر جایگزینی کدون های نادر ناحیه شروع ترجمه ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی (*hbfgf*) با کدون های بهینه، بر میزان بیان این فاکتور درباکتری اشرشیا کلی است .بدین منظور ۵ کدون از کدون های نادر ناحیه شروع ترجمه با کدون هایی با فراوانی بیشتر جایگزین شدند. ژن تغییر یافته در پلاسمید بیانی ساب کلون شد و ساختار حاصل به داخل سه سویه از باکتری اشرشیاکلی ترنسفورم شد . سویه های حامل پلاسمید نوترکیب جهت بیان پروتئین مورد نظر القا شدند. در پایان میزان بیان این فاکتور باا ستفاده از تکنیک های مختلف اندازه گیری و با میزان بیان سویه های حامل پلاسمید دارای ژن وحشی مقایسه شد. تفاوت قابل توجهی در میزان بیان ژن موتانت در مقایسه با ژن وحشی مشاهده شد . این اختلاف فاحش مشاهده شده در میزان بیان ژن موتانت و وحشی موید تاثیر تغییرات ناحیه شروع ترجمه بر میزان بیان این پروتئین نوترکیب درباکتری اشرشیا کلی بود به گونه ای که حتی یک تغییر جزئی در تعداد کمی از کدون ها منجر به یک تغییر شدید در میزان بیان فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی نوترکیب گردید . در مجموع نتایج حاصل بیانگر نقش کلیدی توالی نوکلئوتیدی انتهای N – ترمینال ژن *hbfgf* از طریق تاثیر مستقیم آن بر ساختار دوم mRNA در ناحیه شروع ترجمه بود، بطوریکه تغییرات اعمال شده در این توالی منجر به ایجاد ساختارهای ثانویه پایدار درناحیه شروع ترجمه mRNA ودر نتیجه کاهش کارایی ترجمه این پروتئین نوترکیب گردید.

کلمات کلیدی : فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی ،ناحیه شروع ترجمه ، کدون های نادر ، کدون های بهینه

مقدمه

فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی عضوی از خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی است که لوکوس ژن آن روی کروموزوم ۴ باند q26-q27 قرار گرفته و بیش از ۳۶ کیلو جفت باز طول دارد(۲ ،۱). این ژن واجد ۳ اگزون است که بوسیله ۲ اینترون ۱۶ و ۱۷،۵

www.SID.ir

Archive of SID

کیلو جفت بازی از یکدیگر جدا افتاده‌اند(۳). نواحی بزرگ غیر کدکننده ای در هر دو طرف ´3 و ´5 ژن شناسایی شده اند که مربوط به تنظیم این ژن در مرحله رونویسی و ترجمه می باشند (۴). وجود چند کدون CUG در بالادست کدون اصلی شروع AUG باعث ترجمه چندین ایزوفرم دیگر فاکتور رشد فیبروبلاستی با وزن مولکولی بالاتر، از تنها یک نوع mRNA می شوند (۵).ایزوفرمهای سنگین bFGF یعنی ایزوفرمهای KD ۳۴, ۲۴, ۲۲/۵, ۲۲ واجد سکانس nuclear localizing (nls) می باشند که هدایت‌کننده این فاکتور به داخل هسته است. در حالی که ایزوفرم KD ۱۸ فاقد این سکانس بوده و الزاماً محل تجمع و فعالیت آن سیتوپلاسم می باشد(۶).هیچ یک از ایزوفرمهای FGF-2 دارای پپتید راهنما یا توالی پیام (Signal Sequence) نمی باشند با این حال ثابت شده که انواع سلولهای تولیدکننده ایزوفرمKD ۱۸ قادر به ترشح این فاکتور به فضای خارج سلولی از طریق مکانیسم‌های تاکنون ناشناخته می باشند (۷).هپارین تمایل زیادی برای اتصال به این فاکتور دارد و ضمن حفاظت آن از خطر پروتئازها و دناتوره شدن در تنظیم فعالیتهای آن نیز نقش فعال دارد(۶).این عامل رشد در سلولها و بافتهای مختلف دارای نقش های متعدد موتوژنیک (motogenic) ، رگ‌زایی (angiogenic) و بقا (survival) می‌باشد. در نتیجه می توان دخالت این فاکتور را در بعضی پدیده‌های زیستی مثل تکامل جنینی ، مراحل نموّ ، بهبود زخمها، تومور زایی، مهاجرت و تمایز سلولی مشاهده نمود(۷)این پروتئین(ایزوفرمKD ۱۸) به دلیل پتانسیل های کاربردی مختلف، در صنایع دارویی مورد توجه خاصی قرار گرفته است اما تخلیص این هورمون از منابع طبیعی آن مانند سلولهای اندوتلیال اولیه ، فیبروبلاستها ، سلولهای گلیایی و سلولهای ماهیچه صاف مقرون به صرفه نیست ، لذا دستیابی به روشهایی که بتوان بوسیله آنها میزان بیان و تولید این فاکتور را به عنوان یک پروتئین نوترکیب در باکتری میزبان (اشرشیا کلی) افزایش داد گام بزرگی در جهت تحقق اهداف علوم زیستی مختلف خواهد بود .

از جمله راهکارهای افزایش میزان بیان یک پروتئین نوترکیب در *E. coli* می توان به مواردی همچون تعویض پروموتر، تغییرسکانس شروع ترجمه یا جایگاه اتصال به ریبوزوم (ribosome binding site = rbs)، افزایش میزان پایداری ساختمان ثانویه mRNA مثلاً از طریق فیوز کردن ژن مربوطه با یکی از ژنهای میکروارگانیسم، افزایش تعداد پلاسمیدها، افزایش gene dosage ، افزایش پایداری پلاسمیدها ، تهیه فیوژن پروتئین،کاهش محتوای GC ، لحاظ کردن Codon Usage (تغییر کدونها بر اساس tRNA غالب در میکروارگانیسم حامل) و حذف محدود کدون های نادراشاره کرد . این پژوهش به بررسی تاثیر جایگزینی کدون های نادر ناحیه شروع ترجمه ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی (*hbfgf*) با کدون های بهینه، بر میزان بیان این فاکتور درباکتری اشرشیا کلی می پردازد. تا کنون مطالعات زیادی در زمینه جایگزینی کدونهای نادردر ژنهای مختلف انجام شده است که از آن جمله می توان به مواردی همچون جایگزینی کدون های نادر اسید آمینه آرژنین در موقعیتهای هشتم ونهم cDNA پروتئین تروپونین I ماهیچه اسکلتی مرغ (۸)، جایگزینی کدونهای نادر ۸۸ کدون آغازین ژن زیر واحد آلفای پروتئین فارنزیل ترنسفراز (FTPase) (۹)، جایگزینی ۵ کدون نادر در ژن وحشی آنتی ژن 85B مایکوباکتریوم توبرکلوزیس(۱۰) وجایگزینی دو کدون نادر انتهای ’5 ژن *Sso_gnaD* از باکتری سولفولوبوس سولفاتاریکوس (۱۱) اشاره کرد.

مواد وروش ها

طراحی پرایمر

به منظور جانشینی کدون های نادر با کدون های بهینه درcDNA ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی

www.SID.ir

Archive of SID

انسانی ، از تکنیک Site Directed Mutagenesis که نوعی موتاسیون زایی بر پایه PCR است استفاده شد.توالی نوکلئوتیدی پرایمر پیش رونده (Forward) طراحی شده برای این PCR از دو بخش تشکیل شده بود ; بخش اول در انتهای ۵′ شامل جایگاه برش آنزیم محدودالاثر Nde I بود که توالی نوکلئوتیدی آن عبارتست از CATATG و بخش دوم شامل ۱۷ کدون ابتدایی ناحیه N – ترمینال cDNA ژن *hbfgf* بود که تغییرات مورد نظر در ۱۲ کدون ابتدایی آن اعمال شد ، به این صورت که ۵ کدون از این ۱۲ کدون نادربوده و با کدون های بهینه مربوط به آنها جانشین شدند . پرایمر طراحی شده جهت سنتز به شرکت MWG-Biotech کشور آلمان سفارش داده شد . کدون ها نادر و بهینه و اسید آمینه های مربوط به آنها در جدول ۱ نشان داده شده اند.

جدول ۱. کدون ها نادر و بهینه و اسید آمینه های آنها

شماره کدون	کدون نادر	کدون بهینه	اسد آمینه
۴و۱	CCC	CCG	Pro
۸	GGA	GGC	Gly
۹	TCG	TCT	Ser
۱۲	ATA	ATC	Ile

۱۷ کدون ابتدایی ناحیه N – ترمینال cDNA ژن *hbfgf* و توالی پرایمر پیش رونده (Forward) طراحی شده در زیر نشان داده شده است ، کدون های تغییر یافته بصورت زیر خط دار و نوکلئوتیدهای تغییر داده شده آنها پررنگ تر نشان داده شده اند .

5`-TA-CAT-ATG-CCC-GCC-TTG-CCC-GAG-GAT-GGT-GGA-TCG-GGC-GCC-ATA-CCG-CCC-GGC-CAC-TTC-3

Nde I

5`-TA-CAT-ATG-CCG-GCC-TTG-CCG-GAG-GAT-GGT-GGC-TCT-GGC-GCC-ATC-CCG-CCC-GGC-CAC-TTC-3

Nde I

توالی پرایمرReverse (معکوس رونده) (ساخت انسیتو Bioorganic Chemistry ، مسکو) نیز که جایگاه برش آنزیم محدودالاثر Bgl II بوسیله تکنیک نامبرده در آن قرار داده شده بصورت زیر می باشد :

5`-TAC-TAT-TAG-ATC-TTG-GCC-ATT-AAA-ATC-AGC-3`

Bgl II

Site Directed mutagenesis

به منظور دستیابی هر چه سریعتر به مناسب ترین دمای اتصال(Annealing)، از دستگاه PCR گرادیانت استفاده شد ، در این مطالعه دمای Annealing پایه ، ۶۵ درجه سانتیگراد و عدد گرادیانت ، ۶ انتخاب شد . پس از یک دناتوراسیون ۵ دقیقه ای در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد،۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون ۴۵ ثانیه ای در دمای ۹۵ ، Annealing ۴۰ ثانیه ای در دماهای

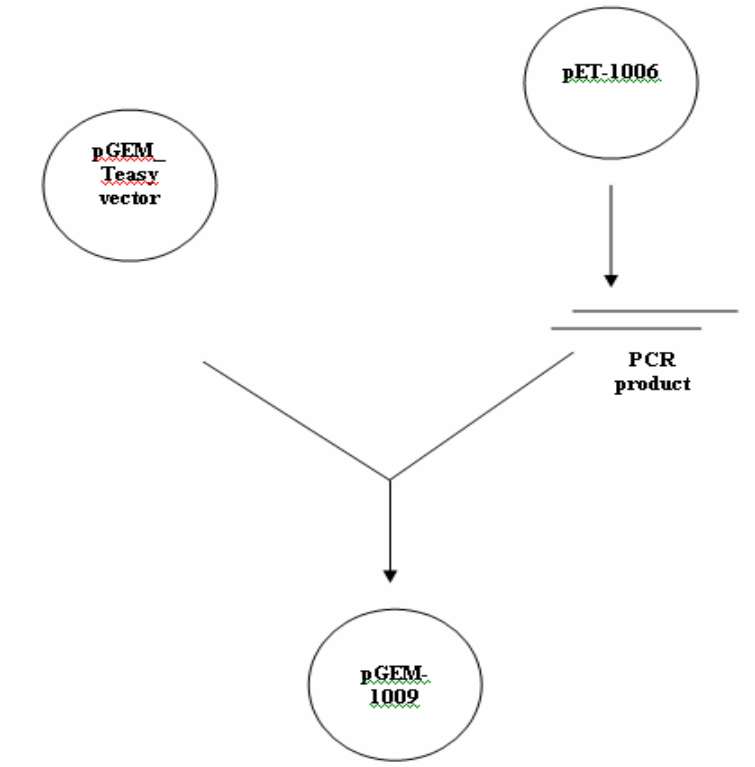
www.SID.ir

Archive of SID

۷۱،۵،۷۰،۶۷،۲،۶۳،۹،۶۰،۵۹ و یک Extention ۳۵ ثانیه ای در دمای ۷۲ طراحی شد ، در پایان این ۳۰ چرخه نیز یک Extention نهایی ۵ دقیقه ای در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شد .

کلونینگ محصول PCR در T.vector

محصول PCR (ژن موتانت فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی) مستقیما در پلاسمید pGEM-Teasy vector (Promega USA), کلون شد،این وکتور یک مولکول حلقوی دو رشته ای است که ۳۰۱۵ جفت باز طول دارد و در داخل ژن Lac Z یک بریدگی با دو انتهای چسبنده (Cohesive) دارد که به نوکلئوتید T ختم می شوند.از طرف دیگربه دلیل استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase در واکنش PCR،محصول PCR دارای دو انتهای چسبنده(3'A) است که به نوکلئوتید A ختم می شود زیرا این آنزیم در پایان پلیمریزاسیون، یک نوکلئوتید A اضافی را به انتهاهای رشته سنتز شده می افزاید ،لذا به راحتی می توان محصول PCR بااین آنزیم را در pGEM-Teasy vector کلون کرد .ساختار حاصل که pGEM-1009 نامگذاری شد در باکتری اشرشیا کلی سویه Top10f'(Invitrogen)ترنسفورم شد و انتخاب کلنی های حاوی ساختار pGEM-1009 بر اساس پدیده α-complementation صورت گرفت (تصویر ۱).



تصویر ۱- کلونینگ محصول PCR (ژن موتانت *hbfgf*) در T.vector و تشکیل ساختار pGEM-1009.

www.SID.ir

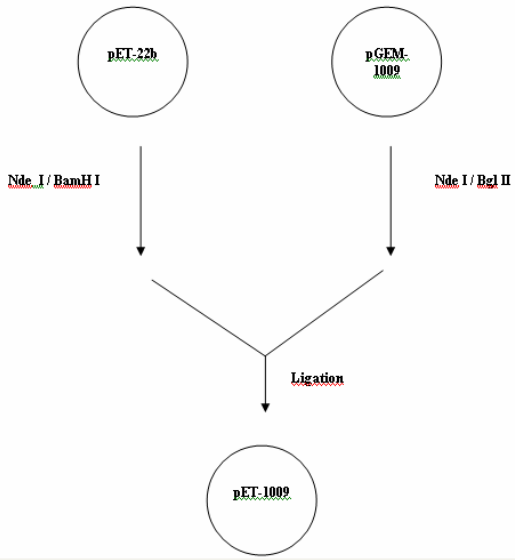
Archive of SID

پدیده α-complementation

همانطورکه ذکر شد پلاسمید pGEM-Teasy vector دارای ژن Lac Z می باشد که کد کننده آنزیم بتا گالاکتوزیداز است و این آنزیم پیوند گلیکوزیدی بین گالاکتوز و گلوکز را می شکند ، بنا براین شاخص انتخابی برای کلونی های حامل پلاسمید نوترکیب ، تولید یا عدم تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز است .با در نظر گرفتن این مساله که این پلاسمید دارای یک بریدگی در داخل ژن LacZ می باشد ، اگر Insert بتواند در داخل این بریدگی قرار گرفته و در پلاسمید کلون شود ، این وکتور دیگردر حضورماده القاگر(IPTG) قادر به تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز نخواهد بود و در نتیجه توانایی شکستن سوبسترای کروموژنیک X-Gal را نخواهد داشت و کلونی ها به رنگ سفید دیده خواهند شد ، اما اگر Insert نتواند در شکاف قرار گیرد ، آنزیم لیگاز دو انتهای بریدگی در محل ژن LacZ را به یکدیگر متصل کرده و ژن Lac Z در حضورIPTG القا شده و آنزیم بتا گالاکتوزیداز تولید شده ماده بیرنگ X-Gal را شکسته و ماده آبی رنگی را تولید می کند ، بنابراین کلونی های فاقد پلاسمید نوترکیب به رنگ آبی دیده خواهند شد.

ساب کلونینگ ژن موتانت *hbfgf* در پلاسمید بیانی pET-22b

پس از تائید حضور ژن *hbfgf* در T.vector توسط هضم آنزیمی با آنزیم(Takara) EcoR I ، باکتری حاوی این پلاسمید جهت استخراج پلاسمید در مقیاس بالا کشت داده شد،پس از استخراج پلاسمید در مقیاس بالا این قطعه توسط هضم آنزیمی با آنزیم های Nde I (Takara) و Bgl II (Takara) ازساختارpGEM-1009 خارج شده و در پلاسمید بیانی pET-22b (Novagen) که تحت هضم آنزیمی با آنزیم های Nde I و BamH I(Takara) قرارگرفته بود، کلون گردید، ساختار نهایی pET-1009 نامگذاری شد (تصویر ۲).لازم به ذکر است که جایگاههای آنزیمی آنزیمهای Bgl II و Bam HI قادر به اتصال به یکدیگر هستند یا اصطلاحاً Complementary یکدیگر می‌باشند ولی بعد از اتصال این دوجایگاه به یکدیگر، هیچ کدام از دو آنزیم فوق‌الذکر قادر به برش این سکانس نمی‌باشند.



تصویر ۲- ساب کلونینگ ژن موتانت *hbfgf* در پلاسمید بیانیpET-22b و تشکیل ساختار pET-1009.

www.SID.ir

Archive of SID

تائید حضور ژن موتانت *hbfgf* در پلاسمید بیانی pET-22b

پس ازساب کلون کردن ژن موتانت *hbfgf* در پلاسمید بیانی pET-22b و ترنسفورماسیون محصول واکنش اتصال در باکتری *E.coli* سویه 'Top10f، به منظور تسهیل انتخاب کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب (ساختار pET-1009) از تکنیک PCR استفاده گردید . این روش امکان بررسی سریع و همزمان تعداد زیادی از کلنی های رشد کرده بر روی پلیت ترنسفورماسیون محصول واکنش اتصال را فراهم می کند ، به این ترتیب که در این روش به جای استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده به عنوان DNA الگو ، کلنی ها مستقیما در واکنش PCR مورد استفاده قرار می گیرند. پرایمرهای مورد استفاده در این PCR همان پرایمرهای Forward و Reverse طراحی شده بودند . تمام کلونی های که نتیجه PCR آنها بیانگروجود ژن موتانت *hbfgf* در ساختار pET-1009 بود به منظور تائید نهایی کشت داده شدند و بعد از تخلیص پلاسمید تحت هضم آنزیمی با آنزیم های Bgl II و Hind III قرار گرفتند .

ترنسفورماسیون ساختار pET-1009 و pET-1006 به داخل میزبان های بیانی

هر دو ساختار pET-1009 (ژن موتانت *hbfgf* درپلاسمید pET-22b) و pET-1006 (cDNA-*hbfgf* که در پروژه قبلی آقای دکتر میرزاحسینی در پلاسمید pET-22b کلون شده بود) بر اساس روش Cohen (۱۲) و استفاده از CaCl2 و حرارت ۴۲ °C ، به داخل باکتری اشریشیا کلی سویه های OrigamiB(DE3)plysS (Invitrogen) و BL21(DE3)PlysS (Invitrogen)، BL21(DE3) codonPlus-RIL(Stratagen) ترانسفورم شدند.

E.coli OrigamiB(DE3)plysS

این سویه ، سویه مشتق شده از *E.coli* K-12 است که دارای موتاسیون در ژنهای مربوط به تیروکسین ردوکتاز (*trxB*) و گلوتاتیون ردوکتاز (*gor*) می باشد که سبب افزایش تشکیل باندهای دی سولفیدی در سیتوپلاسم می شود. مطالعات نشان داده است که بیان در این سویه سبب افزایش folding پروتئین تا ۱۰ برابر نسبت به سایر سلولها می شود (۱۳).

E.coli BL21(DE3)PlysS

متداول ترین میزبان بیانی از سویه های *E.coli* ، BL21 می باشد که بطور طبیعی در پروتئاز lon و بصورت مهندسی شده در پروتئاز Omp T نقص دارد ، به همین دلیل میزبانی منحصر بفرد برای تولید پروتئین نوترکیب و بقای آن در سلول می باشد . (۱۴)

E.coli BL21(DE3) codonPlus-RIL

گاهی ژن نوترکیب حاوی کدون هایی است که tRNA مربوط به آنها در *E.coli* کمیاب است ، به همین دلیل در ترجمه شدن ژن اختلال ایجاد خواهد شد . سویه جدیدی از *E.coli* به نام BL21(DE3) codonPlus-RIL ، حاوی وکتور سازگاری به نام ColE-1 همراه با ژنهای مربوط به tRNA اسید آمینه های آرژینین ،لوسین و ایزولوسین می باشد .بیان مربوط به این tRNA ها در این سویه ، به دلیل محدود نشدن ترجمه بوسیله کدون های نادر ، سبب افزایش سنتز پروتئین نوترکیب می شود (۱۴).

القا و بیان

سلولهای واجد ساختارpET-1009 و سلولهای اشریشیا کلی واجد پلاسمید pET-1006 در محیط کشت LB واجد ۵۰ µ g/ml آمپی‌سیلین و در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. وقتی OD600 محیط کشت

www.SID.ir

Archive of SID

به حدود ۰/۵ رسید سلولها بوسیله ۰/۵ mM IPTG القاء شدند. برای جلوگیری از تکثیر سلولهای فاقد پلاسمید تا ۴ ساعت پس از افزودن IPTG هر یک ساعت یک دوز ۱۰ میکرولیتری آمپی سیلین به محیط های کشت اضافه شد ، این عمل باعث ثابت ماندن نسبت سلولهای فاقد و واجد پلاسمید می شود. یک ساعت پس از افزودن آخرین دوز آمپی سیلین، سلولها بوسیله سانتریفوژ 10000rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب گیری شده و تا رسیدن OD600 به ۰,۵ در بافر فسفات سدیم (PBS;pH=7) حل شدند . دیوارهٔ سلولی باکتریها ۳ بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه بوسیلهٔ دستگاه سونیکاتور خرد شده تا پروتئین های محلول موجود در داخل باکتری آزاد شوند. در ادامه با استفاده از تکنیکهای SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ وجود پروتئین hbFGF مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی بیان پروتئین hbFGF با روش SDS-PAGE

مطابق با روش Laemmli (۱۵) به هریک از نمونه‌ها بافر لودینگ پروتئین (pH 6.8 و mM Tris.Cl ۱۰۰ و mM dithiothreitol ۲۰۰ و SDS ۴٪ و bromophenol blue ۰/۲ درصد و Glycerol ۲۰٪) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ˚C ۹۵ جوشانده شدند.سپس در کنار مارکر وزن مولکولی پروتئینی، بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۸٪ نمونه‌گذاری شده و در ولتاژ ۱۰۰ به حرکت درآمدند. در انتهای مسیر حرکت رنگ در ژل، ولتاژ قطع و ژل بوسیله رنگ کوماسی برلیانت بلو R250 رنگ‌آمیزی شد و یا این که بدون رنگ‌آمیزی، جهت انجام تست وسترن بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفت.

وسترن بلاتینگ

بر اساس متد Towbin (۱۶)، پروتئین هایی که در مرحلهٔ قبل در داخل ژل SDS-PAGE بر اساس اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی بر روی کاغذ نیترو سلولز سایز ۰/۲ µm (Schlecher &Schuell) انتقال داده شدند. برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادیها به سطح کاغذ نیترو سلولز، کاغذ به مدت ۱ ساعت در بافر PBS واجد آلبومین سرم گاوی (BSA ٪۰/۵) قرار داده شد. آنتی‌بادی اول که یک آنتی‌بادی خرگوشی ضد hbFGF (SIGMA) با رقت $OD_{600} = 0.5$ در بافر A (BSA 0.5% در بافر PBS + 0/05% Tween 20) به کاغذ اضافه و به مدت یک شب در ˚C ۴ قرار داده شد (به همراه تکان دادن مداوم). بعد از ۳ بار شستشوی کاغذ با بافر A ، آنتی بادی دوم، آنتی بادی بزی ضد آنتی‌بادی خرگوشی و متصل به آنزیم پراکسیداز (Horse Radish Peroxidase) ،(SIGMA) با رقت ۱ به ۳۰۰۰ بر روی کاغذ اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق همراه با تکان دادن متوالی نگه داشته شد. بعد از شستشوی مجدد کاغذ با بافر A (۳ بار)، سوبسترای آنزیم پراکسیداز (0.5 mg/ml diaminobenzidine HCl + H2O2 0.01%) به کاغذ اضافه شد تا محل اتصال آنتی‌بادی ها به پروتئین hbFGF بر روی کاغذ با رنگ قهوه‌ای مشخص گردد.

تست الایزا

اندازه گیری دقیق‌تر hbFGF تولید شده بوسیله ساختارpET-1009 وpET-1006 در هر یک از میزبان های بیانی ، در کنار نمونه کنترل منفی هریک، بوسیله کیت الایزا اختصاصی hbFGF ساخت شرکت R&D آمریکا انجام شد. بدین منظور در ابتدا با استفاده از OD450 به دست آمده از رقتهای مختلف استاندارد hbFGF موجود در کیت، منحنی استاندارد ترسیم و مقدار هریک از نمونه‌ها با قرار دادن OD450 نمونه در منحنی استاندارد به دست آمد.

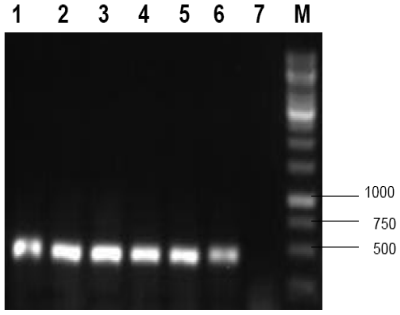
نتایج

Site Directed Mutegenesis

www.SID.ir

Archive of SID

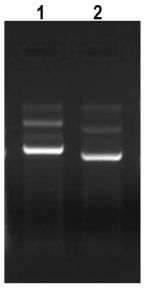
با استفاده از پرایمرهای Forward و Reverse طراحی شده و ساختار pET-1006 به عنوان DNA الگو ،Gradient PCR انجام شد. در صورت اتصال صحیح پرایمرها ، ژن موتانت *hbfgf* به صورت یک باند ۴۵۰ جفت بازی در ژل آگارز دیده خواهد شد . در این پژوهش این باند در کلیه دماهای طراحی شده بخوبی قابل رویت بود که حاکی از تکثیر موفقیت آمیز ژن موتانت *hbfgf* بود (تصویر ۳) .



تصویر ۳ـ الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول PCR (گرادیانت دمای Annealing). ستون۱: دمای c° ۵۹ ، ستون۲: دمای c° ۶۰/۹ ، ستون۳: دمایc° ۶۳/۹ ، ستون۴: دمای c° ۶۷/۲ ، ستون۵: دمای c° ۷۰ ، ستون۶: دمای c° ۷۱/۵ ،ستون۷ : نمونه Blank. وجود باند bp ۴۵۰ بیانگر اتصال صحیح پرایمرها می باشد.

کلونینگ محصول PCR در T.vector

پس ازکلون کردن ژن موتانت*hbfgf* در T.vector و ترنسفورماسیون ساختارpGEM-1009 در باکتری اشرشیا کلی سویه Top10f (Invitrogen) و انتخاب کلنی های سفید بر اساس پدیده α-complementation یا غربالگری سفید آبی ، این کلنی ها همراه با یک کلنی آبی به عنوان کنترل منفی جهت استخراج پلاسمید کشت داده شدند (تصویر ۴) .



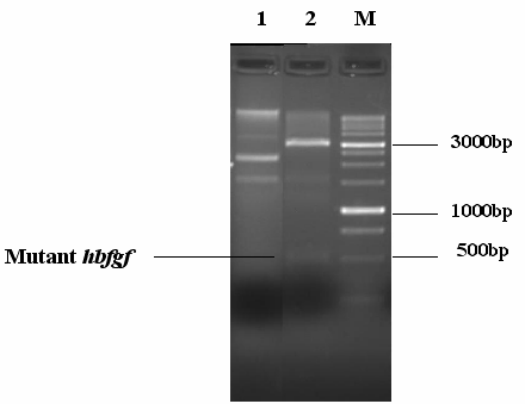
تصویر ۴- الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول استخراج پلاسمید کلنی های سفید و آبی. ستون ۱: پلاسمید استخراج شده از کلنی سفید رنگ. ستون ۲: پلاسمید استخراج شده از کلنی آبی رنگ. به دلیل حضور پلاسمید نوترکیب pGEM-1009 در کلنی سفید، باند مربوط به آن کمی بالاتر از باند پلاسمید کلنی آبی قرار دارد که این خود تایید کلون شدن ژن موتانت *hbfgf* در T-vector می باشد.

تائید حضور ژن موتانت *hbfgf* در T.vector

به منظور تائید حضور ژن موتانت *hbfgf* در T.vector پلاسمیدهای استخراج شده تحت هضم آنزیمی با آنزیم EcoR I قرار گرفتند و محصول هضم آنزیمی در کنار مارکر وزن مولکولی DNA روی ژل آگارز ۱،۵٪ بارگذاری شد . در صورت کلون شدن ژن موتانت *hbfgf* در T.vector ، یک باند ۴۵۰ جفت بازی مربوط به ژن موتانت *hbfgf* و یک باند ۳ کیلو جفت بازی مربوط به لاشه وکتور دیده خواهد شد در غیر این صورت تنها یک باند ۳ کیلو جفت بازی دیده خواهد شد (تصویر ۵). پس از تائید حضور ژن موتانت *hbfgf* در T.vector ، این ژن توسط آنزیمهای Nde I وBgl II از ساختارpET-1009 خارج شد .

www.SID.ir

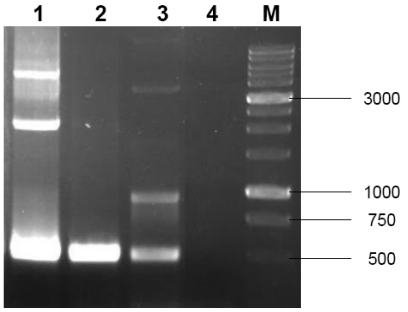
Archive of SID



تصویر ۵ـ الکتروفورز ژل آگارز ۱,۵٪ محصول هضم آنزیمی ساختار pGEM-1009 با آنزیم EcoR I .

تائید حضور ژن موتانت *hbfgf* در پلاسمید بیانی pET-22b

پس از ساب کلون کردن ژن موتانت *hbfgf* در پلاسمید بیانی pET-22b و ترنسفورماسیون محصول واکنش اتصال در باکتری *E.coli* سویه' Top10f ، به منظور تسهیل انتخاب کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب (ساختار pET-1009) از تکنیک PCR استفاده گردید (تصویر ۶).

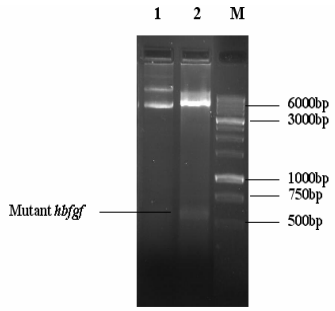


تصویر ۶ ـ الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ محصول PCR ، ستون۱: کنترل مثبت PCR (pGEM-1009) ، ستون ۲: پلاسمید pET-1009 ، ستون ۳: کلنی مشکوک به دارا بودن ساختار pET-1009 .ستون۴:کنترل منفی (بدون DNA الگو). وجود باند ۴۵۰ جفت بازی درستونهای ۲ و ۳ همانند کنترل مثبت (ستون۱) موید حضور ساختار pET-1009 در کلنی انتخاب شده است.

تمام کلونی های که نتیجه PCR آنها بیانگروجود ژن موتانت *hbfgf* در ساختار pET-1009 بود به منظور تائید نهایی کشت داده شدند و بعد از تخلیص پلاسمید تحت هضم آنزیمی با آنزیم های Bgl II و Hind III قرار گرفتند و سپس در کنار مارکر وزن مولکولی DNA روی ژل آگارز ۱,۵٪ بارگذاری شدند.در صورت حضور ژن موتانت در ساختار pET-1009 یک باند ۵۷۹ جفت بازی مربوط به ژن موتانت *hbfgf* و بخشی از وکتور و یک باند ۶ کیلو جفت بازی مربوط به لاشه وکتور دیده خواهد شد در غیر این صورت تنها یک باند ۶ کیلو جفت بازی دیده خواهد شد (تصویر ۷).

مقایسه بیان دو ژن موتانت و وحشی

هر دو ساختار واجد ژنهای موتانت و وحشی (pET-1009 وpET-1006) به داخل سه سویه از باکتری اشرشیا کلی شامل BL21(DE3)PlysS ،OrigamiB(DE3)plysS وBL21(DE3) codonPlus-RIL ترانسفورم شده و برای بررسی میزان تولید محصول هر ساختار در باکتری اشریشیا کلی از تکنیکهای SDS-PAGE (تصویر ۸) و وسترن بلاتینگ (تصویر ۹) استفاده گردید.



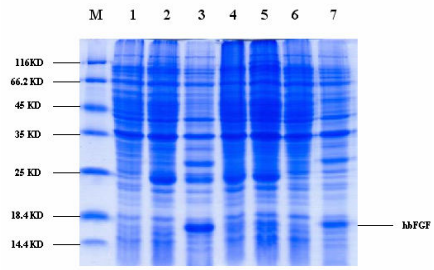
تصویر ۷ـ الکتروفورز ژل آگارز ۱,۵٪ محصول هضم آنزیمی ساختار pET-1009 با آنزیمهای Bgl II و Hind III.

www.SID.ir

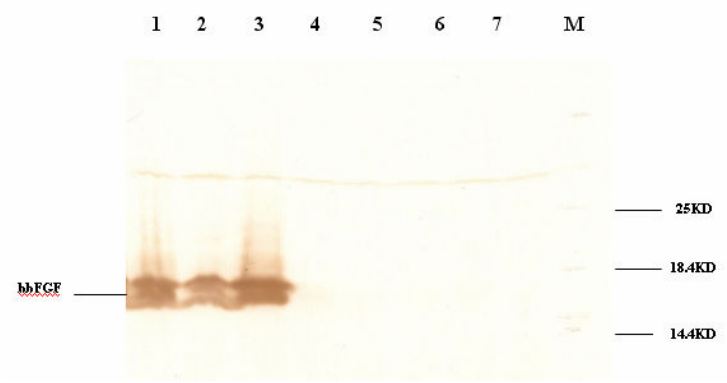
Archive of SID

نتایج حکایت ازتولید محصول توسط cDNA-*hbfgf* (ساختارpET-1006) در هر دو آزمایش SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ می‌کند. بالعکس هیچ باند مشخصی در مورد محصول ژن موتانت(ساختار pET-1009) در این دو آزمایش مشخص نگردید.

همانطور که در تصویر دیده می شود، سلول BL21CodonPlus(DE3)-RIL-pET-1006 (ستون۳) بیشترین میزان hbFGF را بیان نموده است و میزان بیان hbFGF در ساختار pET-1009 ناچیز می باشد.



تصویر ۸- SDS-PAGE ستون۱: OrigamiB(DE3)PlysS بدون پلاسمید(نمونه ی منفی) ستون۲: BL21CodonPlus(DE3)-RIL-pET-1009، ستون۳: BL21CodonPlus(DE3)-RIL-pET-1006، ستون ۴: BL21(DE3)PlysS-pET-1009، ستون ۵: BL21(DE3)PlysS-pET-1006، ستون۶: OrigamiB(DE3)PlysS-pET-1009، ستون۷: OrigamiB(DE3)PlysS-pET-1006.



تصویر ۹ــ Western Blotting. ستون۱ : OrigamiB(DE3)PlysS-pET-1006، ستون۲: BL21(DE3)PlysS-pET-1006، ستون ۳: BL21CodonPlus(DE3)-RIL-pET-1006، ستون ۴: OrigamiB(DE3)PlysS-pET-1009، ستون۵: BL21(DE3)PlysS-pET-1009، ستون ۶: BL21CodonPlus(DE3)-RIL-pET-1009، ستون۷: OrigamiB(DE3)PlysS بدون پلاسمید.

مقایسه ساختارها از لحاظ میزان بیان hbFGF

در مورد آزمایش الایزا، که دارای حساسیت (sensivity) بسیار بالاتری نسبت به تستهای SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ است، نتایج روشن تری بدست آمد. در ابتدا با استفاده از ارقام بدست آمده از سنجشOD450 نمونه استاندارد hbFGF در غلظتهای مختلف، یک منحنی استاندارد ترسیم گردید. سپس با قرار دادن O.D450 حاصله از هر یک از سوشها در منحنی استاندارد، عددی به دست آمد که با ضرب کردن آن در مخرج کسر رقت هر نمونه، مقدار هورمون برای هر یک مشخص شد(جدول۲). ستونهای دوم، سوم و چهارم این جدول به ترتیب مربوط به کسر رقت، عدد OD450 و بالاخره مقدار محاسبه شده برای هر شش نمونه می باشند. تفاوت فاحش مقدار هورمون ما بین ساختار pET-1006 و pET-1009 را به وضوح در این جدول نیز می توان دید.

بحث

www.SID.ir

Archive of SID

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر جایگزینی کدون های نادرناحیه شروع ترجمه ژن *hbfgf* با کدون های بهینه بر میزان بیان این فاکتوردر مقایسه با ژن وحشی درباکتری اشرشیا کلی بود، به این منظوریک پرایمر بلند۵۹ نوکلئوتیدی با ۵ کدون تغییریافته که در مقایسه با ژن وحشی آمینو اسید های یکسانی را کد می کردند طراحی شد ، این پرایمر ناحیه شروع ترجمه را به منظور مطالعه تاثیر جایگزینی کدون های نادر با کدون های بهینه تغییر داد ، ژن تغییر یافته و وحشی هر یک بطور جداگانه در وکتور بیانی(pET-22b) ساب کلون شدند(ساختارهای pET-1009 وpET-1006) ، ساختارهای حاصل به داخل۳ سویه از باکتری اشرشیا کلی ترنسفورم شدند ، میزان تولید محصول این دو ساختار تفاوت قابل ملاحظه ای با یکدیگر داشت به طوری که در بررسی‌ها توسط SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ عملاً باند مشخصی برای محصول ژن موتانت مشاهده نشد در حالی که در مورد cDNA-*hbfgf* باندهای مربوطه بسیار مشخص و دارای شدت رنگ بالایی بودند (تصاویر ۸ و ۹). با توجه به اینکه تا مرحلهٔ بعد از رونویسی ژن (Transcription یا ساخت mRNA) شرایط هر دو ژن از لحاظ نوع پروموتر، پلاسمید و باکتری اشریشیاکلی مشابه در نظر گرفته شده بود، این اختلاف فاحش در میزان بیان دو ژن را می‌توان به دو عامل ارتباط داد(۱۷) :

جدول ۲- تایج تست الایزا.

Construct	Dilution rate	OD (450)nm	Volume(mg/L)
OrigamiB(DE3) plysS pET-1006	1/10000000	0.392	1.1
OrigamiB(DE3) plysS pET-1009	1/10000000	0.186	0.52
BL21(DE3)PlyS pET-1006	1/10000000	0.371	0.9
BL21(DE3)PlyS pET-1009	1/10000000	0.172	0.48
BL21CodonPlus(DE3)-RIL pET-1006	1/10000000	0.463	1.3
BL21CodonPlus(DE3)-RIL pET-1009	1/10000000	0.195	0.54

تفاوت در پایداری (Stability of the mRNA) mRNA یا تفاوت در نیمه عمر (half life)

۱) تفاوت در کارآمدی mRNA برای ترجمه (Efficiency of Translation)

باید توجه داشته باشیم که این دو ژن دارای سکانس و در نتیجه mRNA های متفاوت می‌باشند. تفاوت در سکانس mRNA الزاماً منتج به تفاوت در ساختمان ثانویه (Secondary Structure) mRNA و نیز تفاوت در حساسیت این ساختمانهای ثانویه به اگزونوکلئازها می‌گردد. به طور طبیعی mRNA ها در هر نوع سیستم پروکاریوتی یا

www.SID.ir

Archive of SID

یوکاریوتی دارای نیمه عمرهای متفاوت می‌باشند که ساختمان ثانویه mRNA و در نتیجه استعداد تخریب آنها به وسیله نوکلئازها در این زمینه تعیین کننده است(۱۸). عامل دوم یعنی اختلاف در کارآمدی mRNA ها برای ترجمه نیز در واقع ارتباط نزدیکی با عامل اول دارد. ساختار دوم mRNA یک فاکتور کلیدی در تعیین کارایی شروع ترجمه در پروکاریوتهاست ، به نظر می رسد بیان ژنهای متعدد در باکتری اشرشیا کلی بطور معکوس با پایداری ساختار دوم ناحیه شروع ترجمه mRNA آنها ارتباط داشته باشد ، به عبارت دیگر کارایی ترجمه مستقیما" بوسیله در دسترس بودن unfolded TIR تعیین می شود (۱۹). ناحیه شروع ترجمه در اشرشیا کلی به عنوان توالی شاین دالگارنوبا یک فاصله مناسب از کدون شروع با ۶ نوکلئوتید اضافی به ترتیب در بالا دست و پایین دست هر یک از این عناصر تعریف می شود (۲۰) . ژنهای یوکاریوتی در باکتری اشرشیا کلی، ناحیه شروع ترجمه فعالی ندارند لذا هر گونه تغییر وجایگزینی نوکلئوتیدها در این ناحیه در صورت تغییر در پایداری ساختار دوم آن بدون توجه به موقعیت آن تغییر در ساختار سنجاق سری بر بیان ژنهای خارجی در اشرشیا کلی اثر می گذارد (۱۹ و۲۰).دیده شده که علاوه بر توالی شاین دالگارنو توالی دیگری در ناحیه شروع ترجمه که در پایین دست کدون شروع قرار گرفته است ، مکمل بخشی از توالی 16s rRNA در زیر واحد 30s ریبوزوم می باشد ، وجود و مکمل بودن هر چه بیشتر این توالی باعث افزایش پایداری کمپلکس mRNA- ریبوزوم و در نتیجه افزایش کارایی ترجمه می شود (۲۰) .چرا که از یک طرف باعث افزایش اتصال ریبوزومها بطور متوالی به mRNA می‌شود (تشکیل پلی زوم) و از طرف دیگر mRNA را از دسترس اگزونوکلئازها دور نگه می‌دارد و در نتیجه می‌توان تولید محصول بیشتر را انتظار داشت. به علاوه اینکه ایجاد ساختمان‌های ثانویه به هم پیچیده‌تر و پایدارتر به خصوص در ناحیه شاین دالگارنو (SD) mRNA از یک سو می‌تواند با کاهش دادن دسترسی نوکلئازها باعث افزایش تولید شود و از سوی دیگر با مشکل کردن اتصال ریبوزومها به توالی (ribosome binding site) rbs ممکن است باعث کاهش تولید گردند (۲۱) . به نظر می رسد بالاترین سطح بیان زمانی حاصل می شود که ساختار دوم ناحیه شروع ترجمه به گونه ای باشد که توالی شاین دالگارنو ، کدون شروع (AUG) و توالیهای پایین دست آن در نواحی دو رشته ای mRNA پنهان نشده باشند (۲۲) .

به منظور کاهش پایداری ساختار دوم mRNA و در نییجه نمایان شدن توالیهای نامبرده استراتژی های مختلفی بکار گرفته شده است که از آنجمله می توان به Codon Optimization یا Codon Replacement در توالیهای پایین دست کدون شروع در ناحیه شروع ترجمه اشاره کرد . در سالهای اخیر توجه ویژه ای به این استراتژی شده است و آزمایشهای مختلفی بر اساس آن طراحی شده است که از آن جمله می توان به موارد زیر اشاره کرد .

Ronaldo B.Quaggio و همکارانش در سال ۱۹۹۲ کدون های نادر اسید آمینه آرژنین در موقعیتهای هشتم ونهم cDNA پروتئین تروپونین I ماهیچه اسکلتی مرغ را که در باکتری اشرشیا کلی کلون شده بود با کدونهای اپتیمم این اسید آمینه جایگزین کردند ، نتیجه این جایگزینی سطح بالایی از بیان این پروتئین را درباکتری اشرشیا کلی نشان داد(۸).در سال ۱۹۹۸ گروهی دیگر از دانشمندان با جایگزینی کدونهای نادر ۸۸ کدون آغازین ژن زیر واحد آلفای پروتئین فارنزیل ترنسفراز (FTPase) موفق به دستیابی به سطوح بالایی از این پروتئین نوترکیب درباکتری اشرشیا کلی گردیدند(۹).طی مطالعات David L.Lakey در سال ۲۰۰۰ ، جایگزینی ۵ کدون نادر در ژن وحشی آنتی ژن 85B مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ، منجر به افزایش ۵۴ برابری تولید این پروتئین نوترکیب درباکتری اشرشیا کلی شد (۱۰).Seonghun Kim و همکارانش در سال ۲۰۰۶ دو کدون نادر انتهای 5' ژن Sso_gnaD از باکتری سولفولوبوس سولفاتاریکوس را

www.SID.ir

Archive of SID

با کدونهای اپتیمم جایگزین کردند، این ژن تغییر یافته در باکتری اشرشیا کلی سطوح بالاتری از بیان را نشان داد(۱۱). در مقابل موارد ذکر شده ، طی مطالعه Xiaoqiu Wu و همکارانش در سال ۲۰۰۳ ، جایگزینی اکثریت کدونهای نادر در ژن پروتئین شبه هیستونی(Ssh10) باکتری سولفولوبوس شیباتا و پروتئین شبه گلوتاردوکسین (mtGrx) از باکتری متانوباکتریوم ترمواتوتروفیکوم منجر به کاهش چشمگیری در میزان بیان این پروتئینها شد (۲۳).

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده بیانگر جلوگیری از شروع ترجمه کارآمد توسط ساختار های ثانویه پایدار در ناحیه ' ۵ از mRNA می باشد و تاکید به این نکته دارد که می بایست در طراحی ژن سنتتیک برای افزایش بیان در *E. coli* ، ساختار های ثانویه mRNA و نقش مهم آنها را در بیان ژن در نظر گرفت.

منابع مورد استفاده

1. Mergia, A., 1986. The gene for basic and acidic fibroblast growth factor are on different human chromosomes. Biochem. Biophys Res Commun 138: 644-651.
2. Lafage-Pochitaloff, M., 1990. The human basic fibroblast growth factor gene is located on the long arm of chromosome 4 at bands q26-q27. Oncogene Res 5: 241-244.
3. Abraham, J. A., 1986. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J 5: 2523-25 28.
4. Kurokawa, T., 1987. Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast growth factor. FEBS Lett 213: 189-194.
5. Arnaud, E., 1999. A new 34-kiloDalton isoform of fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. Mol Cell Biol 19: 505-514
6. Yosuke, O., 2000. Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. Clin Invest 105: 1085–1093.
7. Mignatti, P., 1991. Basic fibroblast growth factor released by single isolated cells stimulate their migration in an autocrine manner. Proc. Natl Acad Sci USA 88: 11007-11011.
8. Ronaldo, B., Quaggio, Jesus A., Ferro, Patricia, B., Monterio, and Fernando C., Reinach. 1993. Cloning and expression of chiken skeletal muscle troponin I in Escherichia coli :The role of rare codons on the expression level. Protein Science 2:1053-1056.
9. Zimmerman, K, K., Scholten, J, D., Huang, C. C., Fierke, C. A., Hupe, D. J., 1998. High level expression of rat farnesyl protein transferase in Echerichia coli as a translationally coupled heterodimer. Protein Expression and Purification 14:395-402.
10. David, L., Lakey, Rama K. R., Voladri, Kathryn M., Edwards, Cynthia Hager, Buka Samten, Robert, S., Wallis, Peter F., Barnes, Douglas, S., Kernodle 2000. Enhanced production of recombinant Mycobacterium tuberculosis antigens in Escherichia coli by replacement of Low-usage codons. Infection and Immunity. 20: 233-238.
11. Seonghun Kim, sun Bok Lee., 2006. Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in Escherichia coli. Protein Expression and Purification. 50:49-57.
12. Cohen, S, N., 1972 Nonchromosomal antibiotic resistance in bactera: Genetic trasformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc Nath Acad Sci 69: 2110.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Bessette P, H., Åslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G., 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. Proc Natl Acad Sci 96:13703-13708.
14. Grodberg, J., Dunn, J, J., 1988. OmpT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. J Bacteriol 170:1245-1253
15. Laemmli, U, K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
16. Tobin, H., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76: 4350.
17. Thomas, G., von Gabian, A., Nilsson, G., Andersson, M., Lundstrom, M., Lund, B. and Lundgren, E., 1987. Expression of an interferon-α gene variant in E. coli using tandemly repeated synthetic ribosomal binding sites. DNA. 6: 41-46.
18. Nivinskas, R., 1999. Post-transcriptional control of bacteriophage T4 gene 25 expression: mRNA secondary structure that enhances translational initiation. J Mol Biol 288: 291-303.
19. Maarten, H., DE S., Van Duin, J., 1990. Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: A quantitative analaysis. Proc Natl Acad Sci 87: 7668-7672.
20. Michael, L., Sprengart, Hans P. Fatscher and Eckart Fuchs 2000. The initiation of translation in E.coli: apparent base pairing between the 16srRNA and downstream sequences of the mRNA. Nucleic Acids Research 18: 1719-1723.
21. Gross, G., Hollatz, I., 1988. Coliphage lambda to terminator lowers the stability of mRNA in E.coli hosts. Gene 10: 119-128.
22. Clive, R., Wood, M., Boss, A., Thakor, P., Spencer E, J., 1984. The influence of messenger RNA secondary structure on expression of an immunoglobulin heavy chain in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research 12: 3937-3950.
23. Xiaoqiu W, U., Hans, J., Kurt, D., Berndt, U, O., 2004. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in Escherichia coli: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. Biochemical & Biophysical Research communications 313: 89-96.

www.SID.ir