Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره دوم، صفحه ۲۴ -۱۵

بررسی تاثیر کاهش محتوای GC در ناحیه N ترمینال ژن فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی بر میزان بیان آن در باکتری *اشریشیاکلی*

مونا علی بلندی[۱*]، حسن میرزاحسینی[۱]

۱ـ بخش بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران
* [۱]نویسنده مسئول: مونا علی بلندی . بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران. mona.alibolandi@gmail.com

دریافت: ۸۸/۴/۸ پذیرش: ۸۸/۶/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: توالی N- ترمینال ژن پروتئینهای نوترکیب تاثیر بالایی بر میزان بیان آنها در *اشریشیاکلی* دارد. در جهت بررسی این مهم، پرایمر طویلی را بمنظور بازآرائی ناحیه N-ترمینال ژن و کاهش محتوای GC طراحی نمودیم.

روش بررسی: ما pET-1006 (cDNA-*hbfgf* که در pET-22b قرار داده شده) را بعنوان الگو در اختیار داشتیم. کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC در ناحیه N-terminal از cDNA-*hbfgf* توسط روش Site Directed Mutagenesis با تغییر نوکلئوتیدها بدون تغییر در اسیدهای آمینه انجام شد. میزان بیان hbFGF تولید شده توسط ژن موتانت و وحشی با استفاده از تکنیک های SDS-PAGE densitometry ، Western Blot و ELISA اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج بدست آمده نشان می دهد که میزان بیان hbFGF، توسط ژن موتانت در مقایسه با ژن وحشی افزایش یافته است. این اختلاف فاحش در میزان بیان ژن موتانت و وحشی را می‌توان به کارآمدی mRNA برای ترجمه ارتباط داد.

نتیجه گیری: این اختلاف نشان می دهد که کاهش محتوای GC در ناحیه N ترمینال، باعث کاهش پایداری ساختارهای ثانویه و تشدید ترجمه می گردد.

واژه های کلیدی: بازآرائی ژن، محتوای GC، بیان پروتئینهای نوترکیب، فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی

مقدمه

فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ یا FGF-2 و یا basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) یک عامل رشد متصل به هپارین (heparin-binding) بوده که دارای ۵ ایزوفرم می‌باشد. یک ایزوفرم سیتوپلاسمی با وزن مولکولی ۱۸ KD و چهار ایزوفرم هسته‌ای با وزنهای مولکولی بالاتر (۲۲ KD, ۲۲/۵, ۲۴, ۳۴) آن تاکنون شناسایی شده‌اند(۱). این عامل رشد دارای نقشهای متعدد موتوژنیک (motogenic) ، رگ‌زایی (angiogenic) و بقا (survival) در سلولها و بافتهای مختلف می‌باشد. در نتیجه می‌توان دخالت این فاکتور را در بعضی پدیده‌های زیستی مثل مهاجرت، تمایز سلولی، بهبود زخمها، تومور زایی و نیز مراحل نموّ (developmental processes) مشاهده کرد(۲) که البته هریک از این عملکردها وابسته به نوع سلول، ایزوفرم bFGF ، نوع و تعداد گیرنده های سطح سلول و بسیاری عوامل داخل و خارج سلولی دیگر می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

تنها ژن *hbfgf* در باند q26-q27 کروموزوم ۴ شناسایی شده است و اندازهٔ آن بیشتر از kb ۳۶ می باشد(۳و ۴).این ژن حاوی ۳ اگزون می باشد که بوسیله ۲ اینترون kb ۱۶ و kb ۱۷/۵ از یکدیگر جداشده اند(۵).

استفاده از bFGF انسانی(hbFGF) به عنوان یک عامل درمانی در بهبود بیماری Ischemic Cardiovascular بسیار امیدوارکننده بوده است. به علاوه پیشرفتهای زیادی در مورد نقش این عامل رشد در ترمیم بافتها و بهبود گروهی دیگر از بیماریها مثل آلزایمر، پارکینسون به دست آمده است (۶ و ۷).

با وجودی که در ابتدا این عامل رشد از هیپوفیز گاو به دست آمد لکن تولید آن بوسیله بسیاری از انواع سلولها و بافتهای گاو مثل مغز، هیپو تالاموس، کلیه، تیموس و غده آدرنال به اثبات رسیده و از این بافتها تخلیص شده است(۸).

اصولاً تهیه و تخلیص بسیاری از هورمونها یا سایتوکاینهای پپتیدی از منابع طبیعی غیرممکن یا فاقد صرفهٔ اقتصادی می‌باشد لذا با ابداع و پیشرفت تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، جهت‌گیری به سمت تولید محصولات نوترکیب افزایش یافته است. در این میان سایتوکاین hbFGF از این قاعده مستثنی نبوده و هم اکنون چند کمپانی در دنیا مشغول تولید این هورمون از طریق روشهای نو ترکیب می‌باشند.

بطور کلی برای افزایش میزان تولید محصول یک ژن راههای متنوعی پیشنهاد می‌شود که متداولترین آنها عبارتند از: تعویض پروموتور، تغییرسکانس شروع ترجمه یا جایگاه اتصال به ریبوزوم (ribosome binding site = rbs) ، لحاظ کردن Codon Usage (تغییر کدونها بر اساس tRNA غالب در میکروارگانیسم حامل)، کاهش محتوای GC در ناحیه Nترمینال، حذف محدود کدونهای کمیاب، 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 و بالاخره تهیه فیوژن پروتئین می‌باشند.

این مطالعه با هدف بهینه‌سازی بیان ژن *hbfgf* در باکتری *اشریشیا کلی*، از میان راههای فوق‌الذکر، تاثیر کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC در ناحیه Nترمینال cDNA-*hbfgf* بر میزان ابراز آن، مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

طراحی پرایمر

cDNA-*hbfgf* توسط ماساهارو سنو از دانشگاه اوکایامای ژاپن تهیه و ارسال شد. جهت کاهش محتوای GC در ناحیه Nترمینال cDNA-*hbfgf* از تکنیک site directed mutagenesis استفاده گردید. بدین ترتیب یک پرایمر برای انتهای ′5 cDNA-*hbfgf* طراحی شد. این پرایمر MIR-1GC نام گرفت و سفارش ساخت آن که کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC را در ۵۰ نوکلئوتید ابتدایی از ۷۲٪ به ۵۲٪ دارا بود، به شرکت MWG آلمان داده شد.

MIR-1GC به گونه ای طراحی شد که درصد GC در ۲۰ کدون ابتدایی، از طریق تبدیل نوکلئوتید سوم کدون پاره ای از اسیدآمینه ها از Gو C به A و T بدون تغییر در توالی اسیدآمینه کاهش یابد. در ابتدای این پرایمر سایت برش برای آنزیم *Nde*I طراحی شد(Forward primer). پرایمر معکوس رونده(Reverse primer) به طول ۳۰ نوکلئوتید برای انتهای ′3 cDNA-*hbfgf* طراحی و سفارش ساخت آن به Institute Bioorganic Chemistry-Moscow داده شد. در ابتدای این پرایمر نیز سایت برش برای آنزیم *Bgl*II طراحی شد. با بکارگیری این پرایمرها و cDNA-*hbfgf* بعنوان الگو در طی پروسه PCR، ژن موتانت تولید گردید.

- توالی اولیه (۱۲کدون ابتدای ژن یا ناحیه N-ترمینال:

5'-ATG-CCC-GCC-TTG-CCC-GAG-GAT-GGT-GGA-TCG-GGC-GCC-ATC-3'

- توالی پرایمر جلورونده همراه با سکانس شناسایی آنزیم *Nde*I (Mir-1GC)

*Nde*I ↓

TACATATG-CCA-GCT-TTA-CCA-GAA-GAT-GGT-GGT-TCT-GGT-GCT-ATA-

- توالی پرایمر معکوس رونده همراه با سکانس شناسایی آنزیم *Bgl*II

www.SID.ir

Archive of SID

*Bgl*II
↓

TACTATTAGATCTTGGCCATTAAAA
TCAGC

ساب کلونینگ mutant hbFGF در T-vector

pGEM®-T Easy Vector از شرکت promega خریداری شد. این وکتور توسط شرکت Promega بوسیله آنزیم*Eco*RV برش خورده و دارای نوکلئوتید تیمین با 3′OH آزاد در دو انتها می باشد. درنتیجه می توان محصولات PCR تولید شده توسط آنزیم *Taq* Polymerase با آدنین آزاد در دو انتها را به راحتی در داخل آن کلون نمود. این وکتور واجد پروموتر بسیار قوی *T7* می باشد بنابراین الزاما باید در داخل *اشریشیاکلی* ای ترانسفورم گردد که دارای ژن *T7* RNA Polymerase برای رونویسی از ژنهای تحت کنترل پروموتر *T7* باشد. همانند بسیاری از وکتورهای دیگر، در این پلاسمید نیز ژن مقاومت به آمپی سیلین تعبیه شده تا در محیط کشت حاوی آمپی سیلین، فقط کلنی های واجد پلاسمید رشد نمایند. بدلیل استفاده از *Taq* Polymerase در این مطالعه، T-Vector برای کلونینگ محصولات PCR مناسب شناخته شد. بدین ترتیب با کمک آنزیم T_4 DNA لیگاز (خریداری شده از شرکت Fermentas)، ژن موتانت *hbfgf* در T-vector قرار گرفت و ساختار T-1008 ایجاد شد. ساختار ایجاد شده به داخل سلولهای *اشریشیاکلی* مهندسی ژنتیکی شده Top10f(خریداری شده از شرکت Invitrogen) ترانسفورم گردید. این سویه از گونه کلی باسیل گرم منفی به منظور تکثیر پلاسمید مورد استفاده قرار گرفت که روی اپرون لاکتوز آن مهندسی ژنتیک صورت گرفته بطوری که قادر به تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز نمی باشد.

T-Vector حامل ژن کدکننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز می باشد بنابراین با ترانسفورم شدن آن به داخل سلولهای Top10f، این سلولها آنزیم بتاگالاکتوزیداز را تولید خواهند نمود. به دلیل اینکه محل قرار گیری محصول PCR با سایت *lacZ* در T-vector همپوشانی دارد، قرار گرفتن ژن در T-vector مانع از بیان ژن *lacZ* خواهد شد بنابراین با استفاده از تکنیک α-complementation می توان کلنی های حاوی پلاسمید و ژن مورد نظر را غربالگری نمود(۹).

ساب کلونینگ mutant *hbfgf* در pET-22b

برای ساب کلونینگ mutant *hbfgf* در پلاسمید بیانی pET-22b ، ابتدا ساختار T-1008 تحت برش آنزیمی بوسیله آنزیم های *Nde*I و *Bgl*II (خریداری شده از شرکت Takara) قرار گرفت تا به این وسیله ژن mutant *hbfgf* از آن خارج شود. همینطور پلاسمید pET-22b(خریداری شده از شرکت Novagen) نیز تحت برش آنزیمی بوسیله دو آنزیم *Nde*I و*BamH*I (خریداری شده از شرکت Takara) قرار گرفت. به دلیل هم خوانی داشتن سکانس آنزیم *Bgl*II با سکانس آنزیم *Bam*HI ، انتهای ژن که واجد سکانس *Bgl*II می باشد با سکانس آنزیم *Bam*HI در pET-22b اتصال برقرار می کند، ولی بعد از اتصال این دوجایگاه به یکدیگر، هیچ کدام از دو آنزیم فوق‌الذکر قادر به برش این سکانس نمی‌باشند. واکنش اتصال بوسیله آنزیم T_4 DNA لیگاز انجام و ساختار pET-1008 حاصل شد. جهت بررسی کلونینگ صحیح، این ساختار به داخل سلول های Top10f ترنسفورم گردید (۱۰).

بیان ژن موتانت و وحشی: به منظور بیان پروتئین نوترکیب باید ساختار pET-1008 را به سلول های *E. coli*ای که قادر به سنتز RNA پلیمراز فاژ *T7* هستند منتقل نمود و به مقایسه بیان ژن موتانت با ژن وحشی (cDNA) کلون شده در داخل pET-22b یا همان pET-1006 پرداخت. به همین منظور از سلول های BL21 (DE3) pLySs ، OrigamiB(DE3) و BL21CodonPlus(DE3)-RIL استفاده شد. ساختار pET-1008 و pET-1006 به سه سویه نامبرده از باکتری *Escherichia coli* ترنسفورم شده و برای بیان توسط IPTG القا شدند. پس از جمع آوری سلول ها بوسیله سانتریفوژ، عمل شکست سلولی بوسیله سونیکاسیون انجام و نمونه ها جهت SDS-PAGE ، دنسیتومتری ژل SDS-PAGE ، وسترن بلاتینگ (آنزیمهای اختصاصی شرکت Sigma) و الایزا (کیت الایزای اختصاصی hbFGF ساخت شرکت R&D) مورد

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده قرار گرفتند تا میزان بیان پروتئین مورد نظر توسط این دو ساختار بررسی و با هم مقایسه شود.

یافته ها

گرادیانت PCR و ایجاد ژن موتانت: ساختار pET-1006 (cDNA-*hbfgf* که در pET-22b قرار داده شده) بعنوان الگو و پرایمرهای جلورونده و معکوس رونده طراحی شده طی پروسه PCR مورد استفاده قرار گرفتند. بوسیله شیب دمایی که برای دمای اتصال (Annealing) تنظیم گردید، دمای مناسب اتصال تعیین و ژن موتانت ایجاد شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ بهمراه مارکر 1Kb DNA ladder شرکت فرمنتاز لود شد (تصویر ۱). قطعه 450 bp که تقریبا در تمامی دماها در شیب دمایی تنظیم شده بوجود آمده، همان ژن موتانت hbFGF می باشد.

ساب کلونینگ ژن موتانت در پلاسمید pGEM®-T Easy Vector

نتیجه انتقال ژن موتانت تخلیص شده از روی ژل (محصول PCR) به داخل پلاسمید pGEM®-T Easy Vector ، ایجاد ساختار T-1008 بود. در صورت وجود ژن در داخل پلاسمید، پلاسمید کلنی سفید بالاتر از پلاسمید کلنی آبی بر روی ژل متوقف می شود.

هضم آنزیمی T-1008 به منظور اثبات وجود ژن موتانت در داخل pGEM-T Easy Vector

اگر ژن در داخل پلاسمید باشد، محصول هضم آنزیمی، یک قطعه 450 bp و یک قطعه 3000 bp می باشد. همانطور که در تصویر۲ ملاحظه می شود ستون دوم واجد ژن موتانت می باشد که از داخل پلاسمید خارج شده و دو باند به اندازه های ذکر شده بر روی ژل حاصل شد.

هضم آنزیمی pET-1008 به منظور اثبات وجود ژن موتانت در داخل pET-22b

پلاسمیدهای سنگین تر از pET-22b ، انتخاب شدند و بوسیله آنزیمهای *Bgl*II و *Hind*III برش خوردند. در صورت وجود ژن موتانت در داخل پلاسمید بیانی pET-22b یک قطعه ۶۸۳ bp همانند تصویر ۳ مشاهده می شود.

تعیین سکانس تقریبی ژن *hbfgf* در pET-1008

سکانس تقریبی ژن موتانت *hbfgf* در داخل ساختار pET-1008 جهت اطمینان از وجود و صحت آن توسط شرکت ژن فن آوران تعیین گردید. این توالی با توالی استاندارد ژن *hbfgf* و توالی پرایمر طراحی شده، توسط نرم افزارهای Coromas version2.1 و Bioedit بررسی و مقایسه شد و درستی توالی بدست آمده از ساختار pET-1008 تایید گردید. توالی زیر سکانس ژن *hbfgf* را در ساختار pET-1008 نشان می دهد.

AAGAAGGAGATATACAT
ATG CCA-GCT-TTA-CCA-GAA-GAT-GGT-GGT-TCT-GCT-ATT-CCG-CCC-
GGCCACTTCTTCAAGGACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCCTGCGCATCCACCCCGACGGCCGAGTTGA
CGGGGTCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACTTCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGT
GAGCGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCTAAAAGCGCTACGGATGAGTGTTTCTTTTTG
AACGATTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTGAAACGAACTGGGCA
GTATAAACTTGGATCCAAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGC
TGA

بررسی بیان hbFGF بوسیله SDS-PAGE :

میزان hbFGF تولید شده توسط دو ساختار بیانی pET-1006 و pET-1008 که حامل ژن وحشی و ژن موتانت hbFGF در داخل وکتور pET-22b می باشند، در سویه از *اشریشیاکلی* شامل سلولهای BL21(DE3)PlysS و BL21CodonPlus(DE3)-RIL و OrigamiB(DE3) بوسیلهٔ تکنیک SDS-PAG بررسی شد (تصویر ۴). همانطور که در تصویر مشاهده می شود میزان بیان hbFGF توسط ساختار pET-1008 به مراتب بالاتر می باشد.

نتایج بدست آمده از آنالیز باندها با استفاده از نرم افزار Quanty One:

آنالیز نمونه‌ها بوسیله SDS-PAGE و دنسیتومتری ژل صورت گرفت . بنابراین ژل SDS-PAGE بااستفاده از دستگاه canner و برنامه Quanty One اسکن

www.SID.ir

Archive of SID

(تصویر۵) و با استفاده از همین نرم افزار دنسیتومتری شد. میزان تولید hbFGF توسط ساختارهای بیانی pET-1006 و pET-1008 در سه سویه از *اشریشیاکلی* به شرح ذیل می باشد:

- OrigamiB(DE3)/pET-1006
- ۱۶٪ پروتئین سلولی
- BL21(DE3)PlySs/ pET-1006……
۴٪ پروتئین سلولی
- BL21CodonPlus(DE3)-RIL/pET1006……
۲۰/۴٪ پروتئین سلولی
- OrigamiB(DE3) / pET-1008……
۳۱٪ پروتئین سلولی
- BL21(DE3)PlySs/ pET-1008……
۱۱٪ پروتئین سلولی
- BL21CodonPlus(DE3)-RIL/pET1008……
۲۶٪ پروتئین سلولی

نتایج حاصل از دنسیتومتری بیانگر افزایش قابل توجه بیان (حدودا ۲ برابر) ژن موتانت در مقایسه با ژن وحشی می باشد.

نتایج حاصل از Western Blot: پروتئین هایی که در مرحلهٔ قبل در داخل ژل SDS-PAGE به لحاظ اندازه از یکدیگر جدا شده بودند،بر روی کاغذ نیترو سلولز انتقال داده شدند. نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ در تصویر ۵ آمده است.

مقایسه میزان بیان پروتئین با استفاده از الایزا : با استفاده از آزمایش الایزا، که دارای حساسیت (sensivity) بسیار بالاتری نسبت به تستهای SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ است، نتایج دقیق تری بدست آمد. در ابتدا با استفاده از ارقام بدست آمده از سنجش OD_{450} نمونه استاندارد hbFGF در غلظتهای مختلف، یک منحنی استاندارد ترسیم گردید. سپس با قرار دادن OD_{450} 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.

- OrigamiB(DE3) / pET-1006
……۱۱۰ mg/L
- BL21(DE3)PlySs/ pET-1006……
۳۵ mg/L
- BL21CodonPlus(DE3)-RIL/pET1006……
۱۳۰mg/L
- OrigamiB(DE3) / pET-1008……
۲۸۰ mg/L
- BL21(DE3)PlySs/ pET-1008……
۷۰mg/L
- BL21CodonPlus(DE3)-RIL/pET1008……
۲۲۰mg/L

نتایج حاصل از آزمون الایزا بیانگر تولید حدودا ۲/۵ برابر فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی توسط ساختار pET-1008 (حاوی ژن موتانت) می باشد که این افزایش بیان بسیار چشمگیر بوده و موفقیت بزرگی محسوب می شود.

بحث

در تحقیق حاضر تصمیم گرفته شد برای افزایش بیان hbFGF ، با کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC در ناحیه Nترمینال cDNA این فاکتور رشد به مقایسه میزان بیان ژن موتانت و وحشی بپردازیم.

بدین منظور پرایمری برای ناحیه N ترمینال آن طراحی شد، به گونه ای که کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC از ۷۲٪ به ۵۲٪ در آن درنظر گرفته شده بود. در طی پروسه PCR و بکارگیری pET-1006 (cDNA ژن hbFGF منتقل شده به پلاسمید بیانی pET-22b) بعنوان الگو و پرایمر طراحی شده ، ژن موتانت ایجاد گردید. ژن موتانت نیز به داخل وکتور بیانی pET-22b منتقل شد.

تفاوت میزان بیان ژن موتانت و وحشی بسیار قابل توجه و معنی دار بود. به طوری که در بررسی‌ها توسط SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ عملاً باند مشخصی برای محصول ژن وحشی مشاهده شد در حالی که در مورد ژن موتانت باندهای مربوطه بسیار مشخص تر و دارای شدت رنگ بالایی بودند. به علاوه نتایج آزمایش کمّی الایزا نیز مؤید نتایج SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ بود و

www.SID.ir

Archive of SID

حاکی از تولید ۲/۵ برابر hbFGF نوترکیب توسط ساختار pET-1008 بود.

با توجه به اینکه تا مرحلهٔ بعد از رونویسی ژن (Transcription یا ساخت mRNA) شرایط هر دو ژن از لحاظ نوع پروموتر، پلاسمید و سلول *اشریشیاکلی* مشابه در نظر گرفته شده بود، این اختلاف فاحش در میزان بیان ژن موتانت و ژن وحشی را می‌توان به طور تئوریک به دو عامل ارتباط داد (۱۱):

۱. تفاوت در پایداری (Stability of the mRNA) mRNA یا تفاوت در نیمه عمر (half life) .
۲. تفاوت در کارآمدی mRNA برای ترجمه (Efficiency of Translation) .

باید توجه داشته باشیم که این دو ژن دارای سکانس متفاوت در ناحیه Nترمینال 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 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 (۱۲).

عامل دوم یعنی اختلاف در کارآمدی mRNA ها برای ترجمه نیز در واقع ارتباط نزدیکی با عامل اول دارد. به طور کلی قسمتی از ناحیه ′5 هر mRNA که به هنگام ترجمه به ریبوزوم S ۳۰ متصل می‌شود (حدود ۱۵ + تا ۲۰-) در کارآمدی mRNA بسیار نقش دارد (۱۳).

هر چقدر این ناحیهٔ mRNA دارای تمایل بیشتری به ریبوزوم S ۳۰ باشد 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 و ناحیه ′5 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 rbs (ribosome binding site) ممکن است باعث کاهش تولید گردند (۱۴).

در صورت غنی بودن GC در ناحیه Nترمینال، انرژی آزاد در این ناحیه پائین می رود و متعاقب آن، ساختارهای ثانویه پایدار و پیچیده ای ایجاد می شود که در طی مطالعات بسیار، با بازآرایی ژن هدف و تخریب این ساختارها، تاثیر منفی آنها بر میزان ابراز ژن هدف به اثبات رسیده است (۱۵). میزان بالای GC در ′5 ژن هدف، احتمال تشکیل ساختارهای ثانویه و خاتمه ترجمه را افزایش می دهد. بنابراین در این پژوهش با جهشهای نقطه ای در ناحیه Nترمینال و تبدیل نوکلئوتیدها از G , C به A , T بدون تغییر در اسید آمینه های مربوطه سطح بیان بالاتری پیش بینی شد و نتیجه بدست آمده نیز مثبت بود و این فرضیه را تایید می نمود.

به عنوان شاهد این مدعا، طی مطالعه ای، Devlin و همکارانش در سال ۱۹۸۸ با کاهش درصدGC در ناحیه N ترمینال ژن مربوط به G-CSF توانستند بیان پروتیین فوق را از میزان ناچیز به حدود ۱۷٪ کل پروتیین سلول برسانند (۱۶).

همین طور Ishida و همکارانش ژن *leuB* از باکتری *Thermos thermophilus* با درصد GC بالا را با استفاده از روش oligo nucleotide mutation بر پایه PCR ، جهشهایی در سمت ′5 ژن ایجاد نمودند. این جهشهای خاموش در جهت خراب شدن و بهم ریختن ساختارهای ثانویه یا سنجاق سری در ناحیه N ترمینال ژن بود، که منجر به افزایش ابراز آن در میزبان بیانی *E.coli* شد (۱۷).

همچنین در سال ۲۰۰۳ Christian Heinz با کاهش درصد GC در کل ژن *MspA* از باکتری *Mycobacterium Smegmatis* ، بیان آن در میزبان بیانی *E. coli* را ۱۰ بار افزایش دادند (۱۸).

با وجود نظر تأئیدی بعضی از محققین مبنی بر نقش Codon Usage در افزایش تولید برخی ژنها، گروهی عامل ساختمان ثانویه mRNA را بسیار مؤثرتر و تعیین‌کننده‌تر در بیان ژنها دانسته‌اند (۲۲-۱۹). به همین جهت در این پژوهش تنها عامل ساختمان ثانویه mRNA در نظر گرفته شد و تغییرات ایجاد شده در ژن موتانت بر پایه کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC در ناحیه

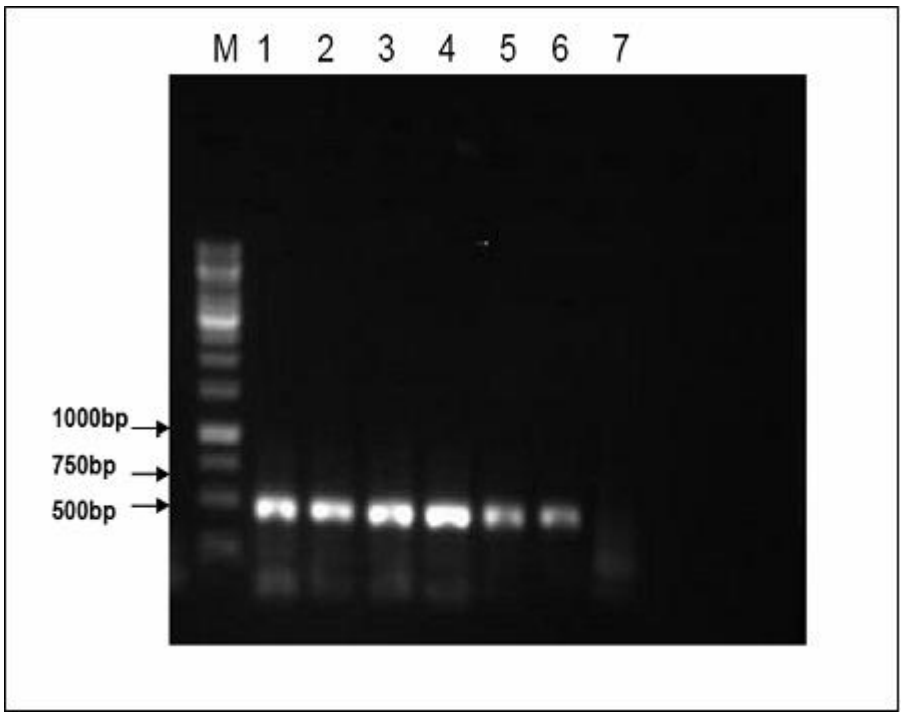
www.SID.ir

Archive of SID

Nترمینال بدون توجه به کاربری (usage) این کدونها در میزبان بیانی صورت گرفت.

نتیجه گیری

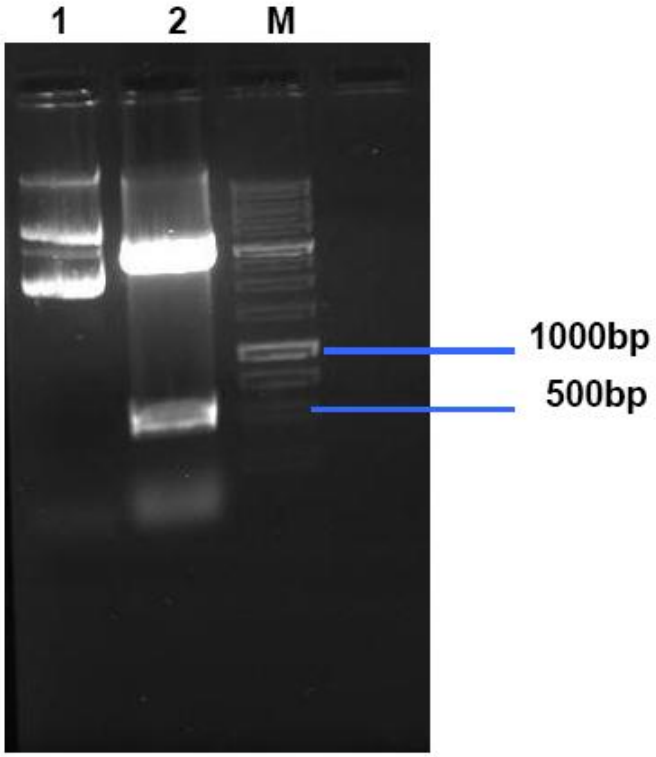
نتایج به دست آمده نشان دهنده تاثیر مثبت جهش های خاموش ایجاد شده درجهت افزایش انرژی آزاد در ناحیه ' ۵ از mRNA می باشد که با ناپایدار نمودن ساختارهای ثانویه در این ناحیه موجب تشدید ترجمه و افزایش میزان بیان پروتئین هدف شده است.



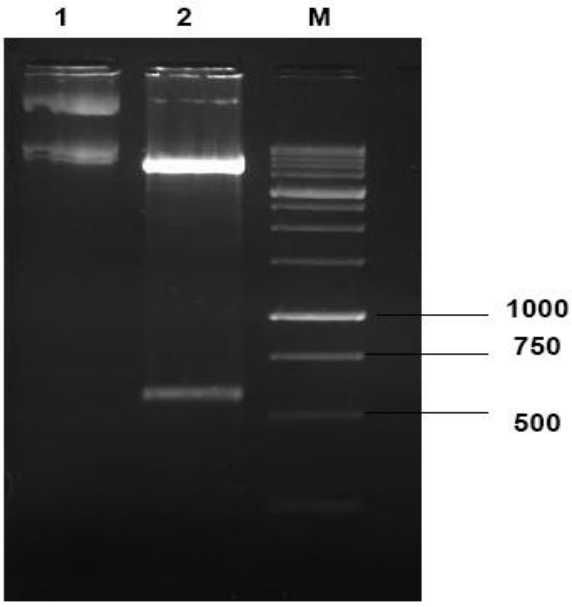
تصویر۱): الکتروفورز ژل آگارز ۱% محصول PCR (گرادیانت دمای Annealing)حاصل پرایمر Mir-1GC . ستون ۱: دمای $59^{\circ}C$ ، ستون ۲: : دمای $60^{\circ}C$ ، ستون ۳: دمای $63.9^{\circ}C$ ستون ۴: دمای $67.2^{\circ}C$ ، ستون۵: دمای $70^{\circ}C$ ، ستون ۶: دمای $71.5^{\circ}C$ ، ستون ۷: کنترل منفی; M: مارکر وزن مولکولی DNA فرمنتاز (1 kb DNA ladder)

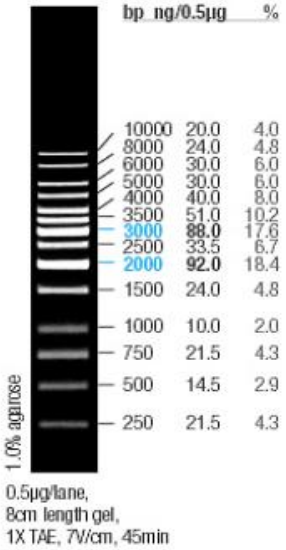
www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۲) : ستون۱: پلاسمید حاوی ژن، ستون۲ : هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم محدودالاثر *EcoR*I، M : مارکر وزن مولکولی DNA فرمنتاز (1 kb DNA ladder)

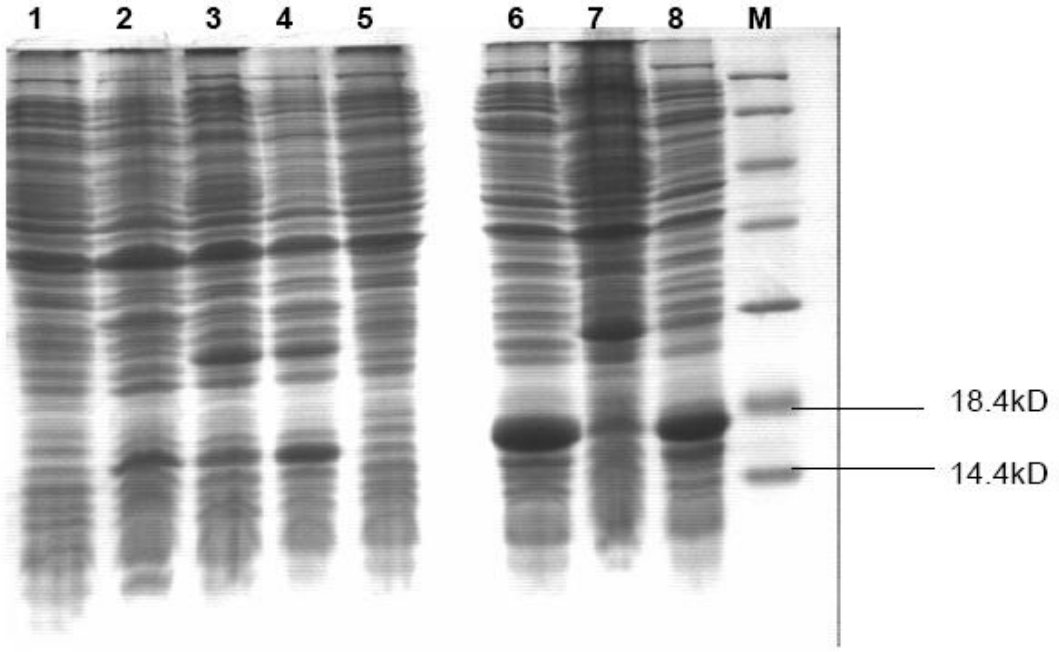




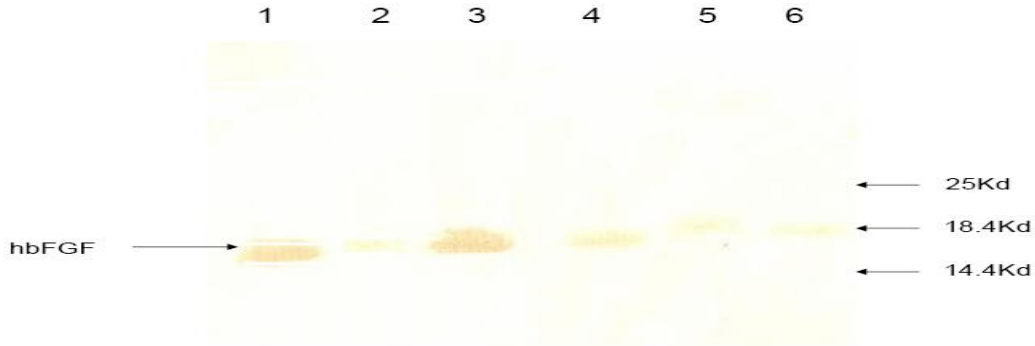
تصویر۳): ستون ۱: پلاسمید pET-1008 ، ستون ۲: پلاسمید pET-1008 که با آنزیمهای *Bgl*II و *Hind*III برش خورده است،، M : مارکر وزن مولکولی DNA فرمنتاز (1 kb DNA ladder)

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۴): الکتروفورز یک بعدی (SDS-PAGE 18%)
ستون۱:(Negative) pET-1006[OrigamiB(DE3)] ، ستون ۲:(Positive)pET-1006[OrigamiB(DE3)]،
ستون ۳: pET-1006[BL21(DE3)PlySs](Positive)،
ستون ۴: pET-1006[BL21CodonPlus(DE3)-RIL(Positive)، ستون ۵: بدون پلاسمید،
ستون ۶: pET -1008[OrigamiB(DE3)](Positive)،
ستون ۷: pET-1008[BL21(DE3)PlySs](Positive)، لاین۸: pET1008[BL21CodonPlus(DE3)-RIL ،
ستون ۹: مارکر وزن مولکولی پروتئین فرمنتاز (cat no# SM0453)



تصویر۵): آنالیز وسترن بلاتینگ، ستون ۱: pET-1008 [OrigamiB(DE3)]، ستون ۲: pET-1008 [BL21(DE3)PlySs]، ستون ۳: pET1008 [BL21CodonPlus(DE3)-RIL]،

ستون ۴: pET-1006 [OrigamiB(DE3)]، ستون ۵: pET-1006[BL21(DE3)PlySs]،

ستون ۶: pET1006 [BL21CodonPlus(DE3)-RIL]

www.SID.ir

Archive of SID

Reference

1- Okada-Ban M, *Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. Int J Biochem Cell Biol.* 2000 ; 32(3):263-267.

2- Ornitz DM, Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M. *Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 1996; 271(25): 15292 – 15297.

3- Mergia A, Eddy R, Abraham JA, Fiddes JC, Shows TB. *The genes for basic and acidic fibroblast growth factor are on different human chromosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; 138: 644-651.

4- Lafage-Pochitaloff M, Galland F, Simonetti J, Prats H, Mattei MG, Birnbaum D. *The human basic fibroblast growth factor gene is located on the long arm of chromosome 4 at bands q26-q27. Oncogene Res.* 1990; 5: 241-244.

5- Abraham JA . *Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J.* 1986; 5: 2523-25 28.

6- Abe K , Saito H. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacological Research*, 2001; 43(4): 307-312.

7- Faktorovich, EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. *Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fobroblast growth factor. Nature,* 1990; 347: 83-86.

8- Knoerzer W, Binder H, Schneider K, Gruss P, McCarthy J. *Expression of synthetic genes encoding bovine and human allows efficient processing by methionine aminopeptidase in Escherichia coli. Gene.* 1988; 65(1): 13-22

9- *basic fibroblast growth factors (bFGFs) in Escherichia coli. Gene*. 1989; 75: 21-30.

10- Primrose SB, Twyman RM, Old RW. *Principle of gene manipulation.* 6th Edition, Blackwell publishing. 2002; 34-35.

11- Sambrook J , Russell DW. Chapter 1. *Molecular cloning laboratory manual*. Third edition. 2001; 116-118.

12- Thomas G, Von Gabian A, Nilsson G, Andersson M, Lundstrom M, Lund B. Lundgren E. *Expression of an interferon-α gene variant in E.coli using tandemly repeated synthetic ribosomal binding sites. DNA.* 1987; 6 (1): 41-46.

13- Nivinskas R. *Post-transcriptional control of bacteriophage T4 gene 25 expression: mRNA secondary structure that enhances translational initiation. J Mol Biol.* 1999; 7;288(3): 291-303.

14- Morita M, Kanemori M, Yanagi P. *Heat-induced synthesis of Q32 in E.coli: Structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. J. Bacteriology*. 1999; 81 (2): 401-410.

15- Gross G, Hollatz I. *Coliphage lambda to terminator lowers the stability of mRNA in E.coli hosts. Gene.*1988; 10; 72 (1-2): 119-128.

16- Zhang W, Xiao W, Wei H, Zhang J, Tian Z. *mRNA secondary structure at start AUG codon is a key limiting factor for human protein expression in Escherichia coli. Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 349: 69-78

17- Devlin PE, Drummond RJ, Toy P, Mark DE, Watt KW. *Alternation of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and*

18- Ishida M, Oshima T. *Overexpression of genes of an extreme thermophile Thermus thermophilus in Escherichia coli Cells. Journal of Bacteriology.* 1994;176(9): 2767-2770.

19- Heinz C, Karosi S, Niederweis M. *High-level expression of the mycobacterial protein MspA in Escherichia coli and purification of the recombinant protein. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2003; 790(1): 337-348

20- Gross G, Mielke C, Hollatz I., Blocker H, Frank R. *RNA primary sequence or secondary structure in the translational initiation region controls expression of two variant interferon -β genes in E.coli. J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17627-17636.

21- Spanjaard RA, Van Dijk, MC, Turion AJ, Van Duin J. *Expression of the rat interferon-alpha 1 gene in E.coli controlled by the secondary structure of the translation – initiation region. Gene.* 1989; 15; 80 (2): 345-351.

22- Milev PV, Georgiev OI, Tzarnoretchki PO, Hadjiolov AA. *Cloning and high level expression of a synthetic gene for human basic fibroblast growth factor. Journal of Biotechnology.* 1992; 22: 299-310.

23- Schmidt M, Viaplana E, Hoffmann F, Marten S, Villaverde A, Rinas U. Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *Escherichia coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway. *Biotechnology and Bioengineering.* 1999; 66(1): 61-67.

www.SID.ir