Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٢، تابستان ١٣٩٤، ١٥١-١٤٣

کلون سازی و بیان ژن میدکاین نوترکیب انسانی در اشریشیاکولای سویه‌ی اوریگامی

سعادت الله غفاری .M.Sc[1]، علی اصغر دلدار .Ph.D[2]*، علی بهرامی .Ph.D[2]، عمران اسماعیل زاده .M.Sc[3]، بهارک مهیاد .M.Sc[2]، فاطمه روح الله .Ph.D[1]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
۲- گروه ژنتیک و بیوشیمی دانشگاه صنعتی مالک اشتر تهران
۳- گروه ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: aaa.phd.gene@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۴

چکیده

هدف: هدف این پژوهش کلون سازی و بیان ژن کد کننده‌ی میدکاین انسانی در اشریشیاکولای بوده که پس از انجام مراحل لازم در مقیاس آزمایشگاهی محقق گردید.

مواد و روش‌ها: روش‌ها شامل کشت سلول، استخراج RNA، ساخت cDNA، تکنیک‌های کلون‌سازی، القای بیان با IPTG (ایزوپروپیل‌تیوگالاکتوزیداز)، ارزیابی بیان به‌وسیله‌ی ژل پلی‌اکریل‌آمید و تایید توسط وسترن بلات بود.

نتایج: ژن میدکاین در pET-21a(+) کلون و سپس به اوریگامی منتقل شد. این فاکتور رشد در کلونی حاوی pET-21a(+) نوترکیب پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با هم زدن در ۲۵۰ دور در دقیقه، در سطح سیتوپلاسمی بیان گردید. بیان پروتئین ۱۳ کیلودالتونی دارای دم هیستیدینی از طریق وسترن بلات مورد تایید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: باتوجه به اینکه سویه اوریگامی در ژن های TrxB و gor جهش یافته است، سینوپلاسم محیطی اکسید کننده می باشد، به‌همین سبب باعث افزایش تشکیل باندهای دی سولفید می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که پس از بیان میدکاین، باقی مانده‌های سیتوزین به‌صورت محلول باقی می‌مانند. این شرایط باعث به‌وجود آمدن محیط مناسبی برای فولدینگ صحیح پروتئین و حل شدن آن می‌شود.

واژگان کلیدی: اشریشیاکولای، بیان، پروتئین نوترکیب، کلون سازی، میدکاین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

میدکاین (Midkine : mdk)، سایتوکاین یا فاکتور رشد متصل شونده به هپارین است که وزن مولکولی ۱۳ کیلو دالتون دارد و عضو یک خانواده پروتئینی دو عضوی است که عضو دیگر این خانواده پلیوتروفین (Pleiotrophin : PTN) نام دارد (۱). میدکاین اولین بار به‌عنوان محصول یک ژن پاسخ دهنده به رتینوئیک اسید در یک سیستم تمایز سلول سرطانی رویانی جدا شد (۲). محصول ژن میدکاین که در انسان بر روی کروموزوم 11p11.2 بین ژن دی آسیل گلیسرول کیناز z (Diacyl glycerol Kinase Z) و ژن موسکارنیک استیل کولین رسپتور۴ (Muscarnic acetylcholine Receptor 4) قرار دارد (۱ و ۳)، یک پروتئین ترشحی با فعالیت راه اندازی رشد برای برخی رده‌های سلولی از جمله PC12 است. میدکاین به‌شدت در دوره حاملگی مخصوصا زمانی‌که میانکنش‌های اپی‌تلیال مزانشیمال صورت می‌گیرد بیان می‌شود (۴). میدکاین انسانی (Human Midkine : hmdk) شامل ۱۲۱ اسیدآمینه و از نظر اسیدهای آمینه ضروری و سیستئین غنی است (۱ و ۵) . این پروتئین به‌طور عمده از دو ناحیه تشکیل شده که توسط پیوندهای دی سولفید متصل به‌هم نگه داشته شده‌اند. ناحیه‌ای که در انتهای C قرار دارد (C-Domain)، عمده خاصیت اتصال به هپارین و فعالیت‌های بیولوژیکی را بر عهده دارد (۱).

میدکاین رشد آکسونی و بقای سلول‌های عصبی رویانی را راه‌اندازی می‌کند و برای رده‌های سلولی فیبروبلاستی هدف و سلول‌های مشتق از نورواکتودرم خاصیت میتوززایی دارد (۶). همچنین به‌عنوان یک عضو از خانواده‌ی جدید فاکتورهای رشد نوروتروفیک و آنژیوژنیک، که بیان آن به‌طور تکوینی تنظیم می‌شود، در آستروسیت‌های جنینی (Fetal Astrocytes) تولید می‌شود (۷). تحقیقات اخیر نشان داده که نوروتروفیک فاکتورها، رشد و تکوین سلول‌های عصبی را در سیستم عصبی مرکزی و سیستم عصبی محیطی راه اندازی می‌کنند و نیز قادر به رشددهی مجدد سلول‌های عصبی آسیب دیده در لوله آزمایش و حیوانات مدل هستند (۸). از طرفی نشان داده شده که انواعی از فاکتورهای رشد در مرحله اولیه بعد از ایسکمی، هم رگ‌زایی و هم نورون‌زایی را تحریک می‌کنند که منجر به بهبود عملکرد بعد از سکته مغزی می‌شود (۹).

دسترسی به این پروتئین در شکل نوترکیب می‌تواند راهی برای بررسی کارآیی آن در مطالعات درمانی برروی سلول و حیوان آزمایشگاهی فراهم آورد. بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند در انواع میزبان‌ها صورت گیرد لیکن اشریشیاکولای گزینه‌ی مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب می‌باشد (۱۰) و سیستم‌های بیانی مختلفی شکل گرفته‌اند که اجازه تولید پروتئین‌های نوترکیب در این میزبان را می‌دهند (۱۱). بنابراین امکان تولید بسیاری از پروتئین‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی در یک محیط کشت ساده و ارزان در این میکروارگانیسم وجود دارد. همچنین سلول‌های اشریشیاکولای را برای دستیابی به پروتئین مربوطه می‌توان به‌راحتی تجزیه و پروتئین مورد بیان را استخراج نمود (۱۲). بسیاری از پروتئین‌هایی که قبلا تصور بر مشکل بودن یا غیر ممکن بودن بیان آن‌ها با تاخوردگی صحیح در اشریشیاکولای بود، در حال حاضر در این باکتری بیان می‌شوند. برای مثال امکان تولید پروتئین‌هایی با پیوندهای دی سولفید چندگانه در فضای پری پلاسمی و یا در سیتوپلاسم سویه‌های جهش یافته‌ای که به‌میزان کافی شرایط اکسید برای تشکیل این پیوندها را دارند فراهم شده است (۱۳). هدف این پژوهش کلون سازی و بیان ژن میدکاین انسانی در باکتری اشریشیاکولای بود که این بیان به‌شکل محلول محقق شد و با لکه گذاری وسترن مورد تایید قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پلاسمیدها و سویه های باکتری: پلاسمید به‌کاربرده شده در این تحقیق pET-21a(+) بوده، سویه‌های E. coli DH5α و E. coli XL1 blue به‌عنوان سویه‌های کلون‌سازی و نیز E. coli BL21 و E. coli origami به‌عنوان سویه‌های بیانی مورد استفاده قرار گرفت.

کشت باکتری: برای E. coli در مراحل کلونینگ و ساخت سازواره‌ها از محیط LB مایع و جامد استفاده شد که در صورت نیاز به آن آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزوده شد. برای القای بیان باکتری‌ها در محیط TB (Terrific Broth) کشت داده شدند.

برای تهیه‌ی این محیط ۱۲ گرم تریپتون، ۲۴ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم گلیسرول در ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر به‌خوبی حل شد. یک محلول ۰/۱۷ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH2PO4) و ۰/۷۲ مولار پتاسیم هیدروژن فسفات (K2HPO4) تهیه شد. محلول‌های مرحله ۱ و ۲ به‌مدت ۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول مرحله ۲ به ۹۰۰ میلی لیتر از محلول مرحله ۱ افزوده شد و مورد استفاده قرار گرفت.

کشت سلول: رده سلولی HEK293 تهیه شده از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران جهت انجام استخراج RNA به‌کار برده شد. کشت سلول‌ها در محیط کشت سلولی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ درصد CO2 انجام شد. DMEM و FBS هردو ساخت شرکت Gibco می‌باشند.

استخراج RNA: RNAی سلول‌های HEK293 (به تعداد تقریبی ۵×۱۰^{۶} سلول) با استفاده از محلول اکیوزول (تولید شرکت BIONEER) طبق دستورالعمل مربوطه استخراج شد و کیفیت آن با استفاده از ژل آگارز ۱/۲ درصد بررسی شد.

جداسازی ژن mdk مقدار ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده از سلول‌های HEK293 طبق دستورالعمل مربوطه با استفاده از کیت ساخت cDNA (Thermo Scientific cDNA K1641) برای ساخت cDNA به‌کار برده شد. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی میدکاین و آنزیم pfu DNA polymerase و دستگاه ترموسایکلر Techne TC-312 ژن میدکاین از cDNA سنتز شده تکثیر و جداسازی شد. به‌منظور بررسی صحت آزمایش‌ها ژن hprt (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase) به‌عنوان ژن استاندارد انتخاب شد. توالی پرایمرهای اختصاصی میدکاین و پرایمرهای hprt در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: پرایمرهای طراحی شده اختصاصی میدکاین و پرایمرهای اختصاصی hprt

پرایمرهای میدکاین	
پیشرو	5’-CGAGCGCATATGAAAAAGAAAGATAAGGTGAAGAAG-3’
معکوس ۱	5’-CTGATACTCGAGGTCCTTTCCCTTCCCTTTC-3’
معکوس ۲	5’-CTGATACTCGAGCTAGTCCTTTCCCTTCCCT-3’
پرایمرهای hprt	
پیشرو	5’-CTTCCTCCTCCTGAGCAGTC-3’
معکوس	5’-AACACTTCGTGGGGTCCTTT-3’

کلون‌سازی ژن در وکتور: از محصول واکنش RT-PCR بر روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز و باند مورد نظر از روی ژل جداسازی و تخلیص شد. ژن تخلیص شده و وکتور pET-21a(+) دارای توالی برش دو آنزیم Nde I و Xho I طی واکنش برش آنزیمی با دو آنزیم مذکور به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. سپس طی واکنش اتصال به‌مدت ۴ ساعت تیمار با آنزیم T4 ligase در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، ژن میدکاین به‌درون وکتور کلون گردید. محصول واکنش اتصال به سویه‌ی Xl1 blue منتقل و در محیط کشت LB Agar حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شد. پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های نوترکیب، صحت کلون‌سازی با استفاده از دو آنزیم مذکور و همچنین توالی یابی تایید شد.

بیان میدکاین نوترکیب: وکتور نوترکیب جهت القای بیان به سویه‌های بیانی اشریشیاکولای منتقل شد و به‌منظور تولید پروتئین به‌صورت محلول، از سویه‌ی اوریگامی استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده TB Broth بود. از کلونی‌های نوترکیب در مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط کشت TB Broth حاوی آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و گردش (shake) ۱۰۰ دور در دقیقه کشت داده شد. پس از اینکه دانسیته‌ی نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸ رسید جهت القای بیان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به ارلن حاوی ۴۰ میلی‌لیتر TB Broth حاوی آمپی سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تلقیح شد و با شرایط بالا کشت داده شد. زمانی‌که دانسیته‌ی نوری به ۰/۸ رسید IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به آن افزوده شد. ارلن در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب با گردش ۲۵۰ دور در دقیقه و سپس به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با همین دور قرار داده شد. در کنار نمونه‌های نوترکیب، نمونه‌ی شاهد یعنی نمونه‌ی دارای پلاسمید بدون قطعه الحاقی، به‌عنوان کنترل منفی مورد

www.SID.ir

Archive of SID

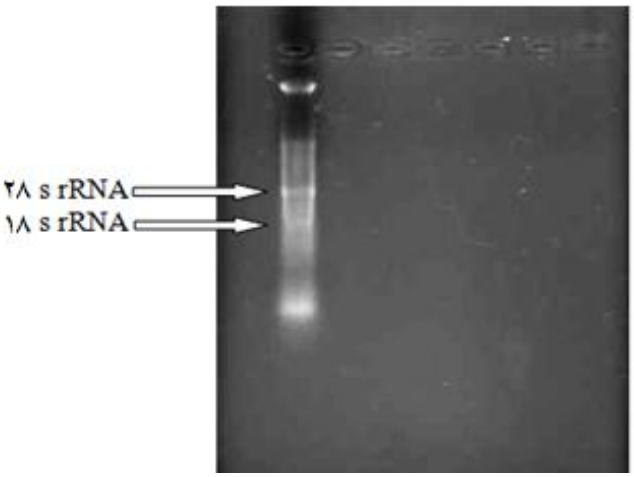
آزمایش قرار گرفت. نمونه‌های به‌دست آمده از کشت باکتری نوترکیب قبل و بعد از القا جهت بررسی بیان ابتدا با استفاده از SDS-PAGE و سپس وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

SDS-PAGE و وسترن بلات: با توجه به اندازه پروتئین میدکاین (۱۳ کیلو دالتون)، ژل پلی اکریل آمید ۱۶ درصد به‌کار برده شد. از دو روش تریسین SDS-PAGE (۱۴) و گلایسین SDS-PAGE استفاده شد. نمونه‌های پروتئین پس از بارگذاری بر روی ژل با اختلاف پتانسیل ۱۲۰ ولت به‌مدت ۶ ساعت الکتروفورز شدند و سپس ژل به‌منظور رنگ آمیزی به‌مدت نیم ساعت در محلول کوماسی بلو قرار داده شد. جهت انجام وسترن بلات بار دیگر نمونه‌ها بر روی یک ژل جدید ران شد. پروتئین‌های جدا شده بر روی ژل، با جریان ۲۰۰ میلی‌آمپر در طول یک شب به غشای پلی وینیلیدین فلوراید PVDF منتقل شدند. بعد از انجام عمل انتقال، غشای PVDF به‌مدت ۲ ساعت در محلول ۲ درصد BSA (Bovine serum albumin) همراه با هم زدن با دور ملایم قرار داده و سپس با بافر TBS-T (Tris Buffer Saline – Tween20) شستشو داده شد. محلول BSA از حل کردن آلبومین سرم گاوی در بافر TBS-T و بافر TBS-T از حل کردن ۶/۰۵ گرم تریس و ۸/۷۶ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر و افزودن ۰/۰۵ گرم توئین ۲۰ به آن در pH=۷/۵ تهیه شدند. سپس غشای PVDF به‌مدت ۹۰ دقیقه در محلول تهیه شده از آنتی بادی اول (Anti His-tag) و بافر TBS-T به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ قرار داده شد. پس از شستشو با بافر TBS-T به‌مدت ۲ ساعت در محلول تهیه شده از آنتی بادی دوم (Anti rabbit conjugate) و TBS-T به نسبت ۱ به ۲۵۰۰ قرار داده شد. مجددا شستشو انجام و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر TMB (Tetramethylbenzidine) محصول شرکت سیگما به غشا افزوده شد.

نتایج

استخراج RNA

محصول به‌دست آمده در این مرحله با توجه به وجود اسمیر RNA در ژل آگارز و نیز وجود دو باند ۲۸S و ۱۸S مربوط به RNAهای ریبوزومی یوکاریوتی مطابق شکل ۱ تایید شد.



شکل ۱: محصول استخراج RNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد. اسمیر و نیز دو باند به‌خوبی مشاهده می‌شوند.

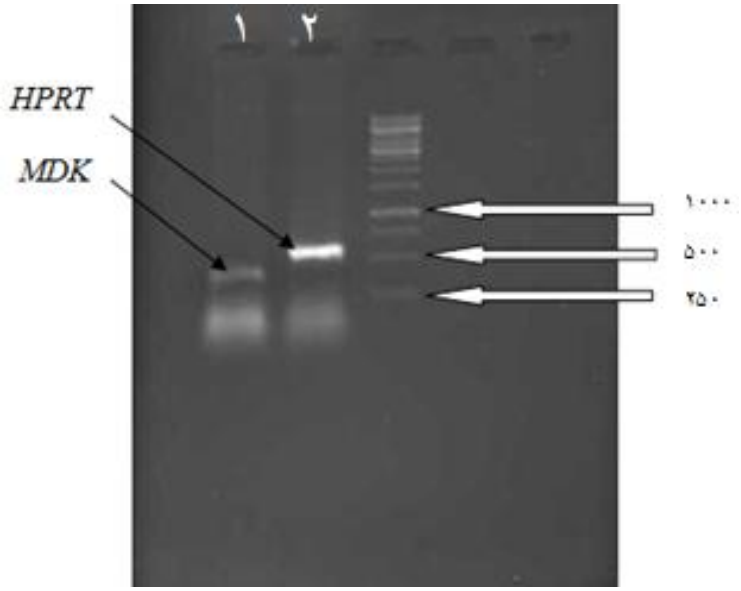
جداسازی و ساخت cDNAی میدکاین

پس از انجام واکنش RT-PCR، مرحله دوم تایید صحت استخراج RNA که همان بیان ژن hprt است به‌همراه سنتز cDNAی میدکاین که نشان دهنده‌ی بیان شدن این ژن می‌باشد، انجام گردید. نتیجه‌ی حاصله در شکل ۲ نشان داد که این ژن یک مولکول mRNA به‌طول ۳۷۰ باز تولید می‌نماید.

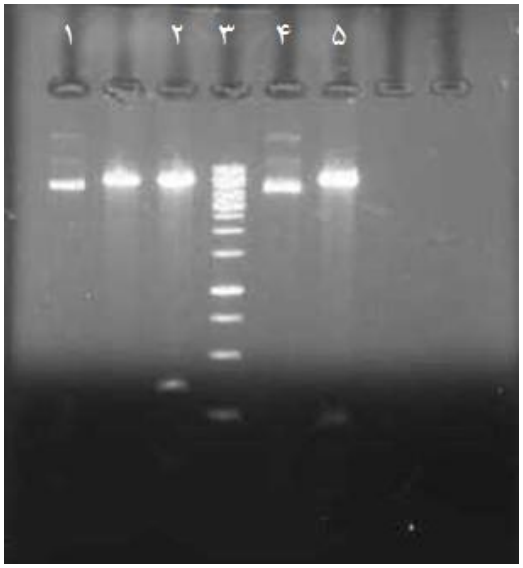
کلون‌سازی ژن در وکتور: وکتور pET-21a(+) پس از انتقال به‌میزبان و تکثیر، استخراج و مورد هضم آنزیمی با دو آنزیم Nde I و Xho I قرار گرفت. قطعه‌ی تکثیر شده نیز با دو آنزیم مذکور برش داده شد. سپس وکتور و قطعه‌ی تکثیرشده، طی واکنش اتصال به‌هم متصل و به‌میزبان منتقل شدند. شکل ۳ وجود قطعه‌ی الحاقی خارج شده از وکتور پس از تکثیر در میزبان را نشان می‌دهد که با همان دو آنزیم ذکر شده مورد برش قرار گرفت. تایید نهایی با توالی یابی انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: محصول RT-PCR بر روی ژل آگارز. چاهک شماره ۱ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی میدکاین حاوی باند با اندازه تقریبی ۴۰۰ جفت باز و چاهک شماره ۲ مربوط به محصول RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن hprt دارای باند با اندازه ۵۵۰ جفت باز می‌باشند. مارکر از نوع ۱ کیلو جفت باز ساخت شرکت Fermentas و دارای محدوده ۲۵۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز می‌باشد.



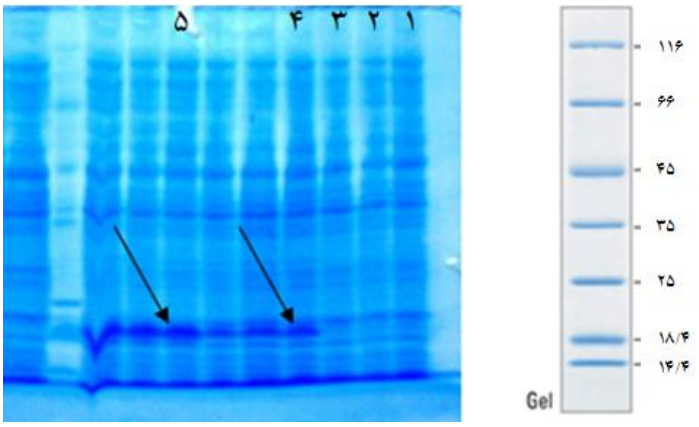
شکل ۳: نتیجه برش آنزیمی pET-21 کلنی‌های نوترکیب در مقایسه با پلاسمید بدون قطعه اضافی با دو آنزیم Nde I و Xho I مشاهده شده بر روی ژل آگارز. نمونه‌ها به‌ترتیب عبارتند از: ۱) pET-21 نوترکیب قبل از برش ۲) pET-21 نوترکیب برش داده شده ۳) مارکر 1KB ۴و۵) یک نمونه دیگر از pET-21 در دو حالت برش خورده و برش نخورده. قطعه مورد نظر که با پیکان نشان داده شده، از نمونه‌ی ۳، جدا شده و در مکان اختصاصی خودش قرار گرفته است. مارکر از نوع ۱ کیلو جفت باز می‌باشد.

القای بیان، SDS-PAGE و وسترن بلات

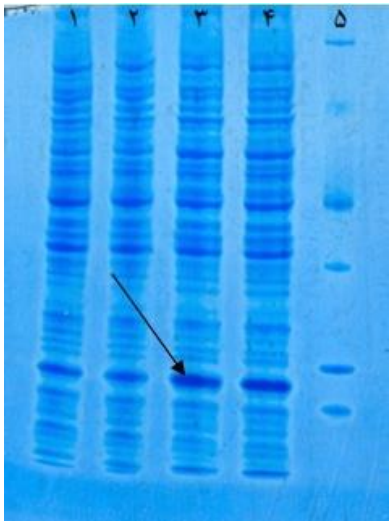
نمونه‌های حاصل از بیان بر روی ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و وجود یک باند در جایگاه حدود ۱۷کیلو دالتون مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی بیان این پروتئین بود. شکل ۴ نشان دهنده‌ی باند مربوط به میدکاین در نمونه‌های القاشده و نیز عدم وجود این باند در نمونه‌های شاهد و قبل از القا است. برای اطمینان از صحت این باند، روش وسترن بلات به‌کار گرفته شد. در شکل ۴ و ۵ نمونه‌های القای بیان بر روی ژل SDS-PAGE و در شکل ۶ نتیجه‌ی وسترن بلات همان نمونه‌ها، بر روی غشای PVDF نشان داده شده است. باندهای مربوط به پروتئین به‌خوبی قابل مشاهده‌اند و در مقایسه با باندهای نمونه‌های قبل از القا بر روی ژل SDS-PAGE وجود پروتئین میدکاین دارای His-tag را اثبات می‌کند.

www.SID.ir

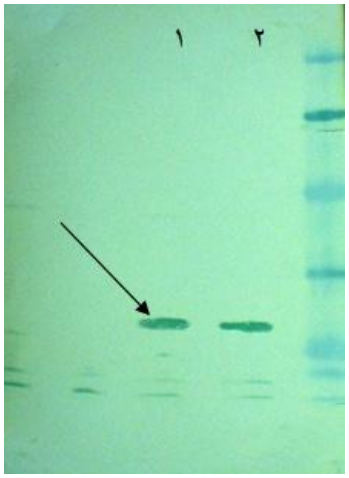
Archive of SID



شکل ۴: نتیجه بیان پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE. در شکل سمت چپ ۱) کلونی دارای پلاسمید بدون ژن در محیط TB قبل از القا ۲) کلونی دارای پلاسمید بدون ژن در محیط TB بعد از القا ۳) کلونی نوترکیب در محیط TB قبل از القا ۴) کلونی نوترکیب در محیط TB ۱۶ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بعد از القا ۵) کلونی نوترکیب در محیط TB ۱۶ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بعد از القا و پس از گذشت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. مارکر به‌کار رفته مارکر پروتئین ساخت شرکت Fermentas با محدوده ۱۴ تا ۱۱۶ کیلو دالتون می‌باشد که مقیاس آن در شکل سمت راست نشان داده شده است.



شکل ۵: نتیجه SDS-PAGE جهت انجام وسترن بلات. ۱ و ۲ نمونه‌های قبل از القا و نیز ۳ و ۴ بعد از القای بیان هستند که باند پروتئین نوترکیب بر روی آن قابل رویت است. شماره ۵ مارکر به‌کار رفته همان مارکر پروتئین شکل ۴ است.



شکل ۶: نتیجه وسترن بلات نمونه‌های شکل ۵ بر روی غشای PVDF. در ستون‌های ۱ و ۲ باندهای مربوط به پروتئین میدکاین به‌خوبی قابل رؤیت است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این تحقیق با توجه به فعالیت‌های مهم میدکاین و با توجه به بیان پایین این پروتئین ارزشمند در سیستم بیانی میزبان اصلی آن، امکان کلون‌سازی و بیان آن در میزبان‌های دیگر مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. استفاده از سویه‌ی اوریگامی طبق آنچه که در منابع آورده شده و در ادامه به آن پرداخته شده است، امکان تولید پروتئین به‌صورت محلول را می‌دهد (۱۵).

جهت استخراج *mRNA*ی میدکاین می‌بایست از بافت یا سلولی استفاده می‌شد که به‌میزان کافی بیان این پروتئین را حاصل کند. با توجه به این که میدکاین در طول دوران حاملگی در بافت‌های مختلفی بیان می‌شود و با رسیدن به اواخر بارداری به‌تدریج از شدت بیان آن کاسته می‌شود، تا آنجاکه پس از زایمان و تا دوران بلوغ میزان بیان آن تنها در بافت‌های محدود و به‌میزان بسیار کم دیده شده است (۱، ۳ و ۱۶)، که از آن جمله می‌توان به بافت‌هایی مانند مغز استخوان و کلیه اشاره نمود (۵ و ۱۶)، بنابراین از میان گزینه‌های مورد مطالعه توجه بیشتر به‌سمت سلول‌های طبیعی مغز استخوان، خون محیطی و رده سلولی *HEK293* معطوف شد. رده‌ی سلولی *HEK293* به‌دلیل اینکه منشا جنینی داشته و از بافت کلیه جدا شده، به‌علاوه از حیث ریخت شناسی یک رده سلولی عصبی محسوب می‌شود و نیز سلول سرطانی متازتاز دهنده می‌باشد، جهت استخراج *mRNA* مورد استفاده قرار گرفت. حصول نتیجه‌ی رضایت‌بخش از وجود *mRNA*ی میدکاین در این رده سلولی و اطمینان از بیان این ژن در آن، نشان دهنده‌ی بیان میدکاین در رده‌های سلولی سرطانی است. لذا می‌توان از آن به‌عنوان یک مارکر سرطان استفاده کرد و با بررسی این ویژگی در سلول‌های طبیعی بدن و مقایسه‌ی آن‌ها با رده های سلولی هم منشا روش‌هایی جهت تشخیص و ردیابی سرطان ابداع کرد (۱۷ و ۱۸).

پس از الحاق ژن به حامل، صحت کلون‌سازی با *PCR* ارزیابی و تایید شد و پلاسمیدهای دارای قطعه ژن هدف به‌سویه *Bl21* و اوریگامی انتقال یافت.

میزبان *Bl21* به‌دلیل اهمیتش در بیان پروتئین در شرایط متنوع به‌کار برده شد و بیان این پروتئین به‌صورت محلول در این باکتری مشاهده نشد. با توجه به اینکه بلافاصله بعد از بیان برخی از پروتئین‌های نوترکیب در این باکتری تشکیل توده‌های به هم پیوسته یا اینکلوژن بادی می‌دهند به‌نظر می‌رسد که میدکاین نیز به‌دلیل نیاز به تشکیل پیوند دی‌سولفید برای داشتن ساختار محلول و فعال، شرایط مساعدی برای تشکیل توده‌های پروتئینی را داراست و به‌همین دلیل در فاز محلول مشاهده نمی‌شود (۱۵). برای دستیابی به پروتئین بیان شده به شکل محلول وکتورهای نوترکیب در سویه اوریگامی نیز وارد شد.

TrxB و *gor* دو آنزیمی هستند که در احیای سیستئین پروتئین‌های موجود در سیتوپلاسم نقش دارند (۱۳ و ۱۹) و اختلال در فعالیت آن‌ها که در سویه‌ی اوریگامی صورت گرفته است باعث تسهیل در شکل گیری پیوند دی‌سولفید و محلول شدن پروتئین می‌گردد.

باکتری‌ها پس از اتمام شرایط القای بیان، لیز شده و پروتئین‌های سیتوپلاسمی به‌صورت محلول مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی پروتئین از طریق دو روش به‌کارگیری ژل *SDS-PAGE* شامل روش تریسین *SDS-PAGE* و روش متداول گلایسین *SDS-PAGE* انجام شد. براساس یافته‌های شاگر و همکارانش (۱۴) روش تریسین برای جداسازی و مشاهده پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین کاربرد دارد و به‌جهت کوچک بودن اندازه میدکاین در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.

در مشاهده پروتئین بیان شده بر روی ژل اختلافاتی از حیث اندازه در محل قرارگیری پروتئین با آنچه که با توجه به اندازه‌ی واقعی پروتئین پیش‌بینی می‌شد، مشاهده شد و باند مربوط به بیان، بالاتر از جایگاه مورد نظر قرار گرفت. علت این پدیده که در بیان این پروتئین توسط یان و تیم همکار نیز مشاهده شده است (۱۵)، می‌تواند مربوط به کانفورماسیون‌های متعدد پروتئین و نیز اتصالات دی‌سولفید بین مونومرهای پروتئین و تشکیل دایمر باشد. همچنین وجود توالی هیستیدینی در پایان زنجیره‌ی پروتئین به تغییر ساختار فضایی آن و تغییر سرعت حرکت آن بر روی ژل کمک می‌کند. لذا با توجه به‌وجود دو نمونه‌ی کنترل منفی به‌موازات نمونه‌های بیانی و نیز نتیجه‌ی وسترن بلات می‌توان از ماهیت پروتئین بیان شده اطمینان داشت.

بر روی ژل اکریل آمید نمونه‌های کنترل منفی درست در ناحیه‌ی بیانی مورد نظر دارای باند هستند که در نتیجه وسترن بلات این باند مشاهده نمی‌شود و قطعا یکی از پروتئین‌های

www.SID.ir

Archive of SID

موجود در باکتری بوده که اتفاقا هم‌وزن میدکاین بوده و به‌موازات آن قرار گرفته است. این مشاهده نیز مشابه نتایج یان (۱۵) می باشد.

نتیجه گیری

همان‌گونه که ذکر گردید پروتئین میدکاین، در زمینه‌های مختلف دارای کاربردهای متنوعی است. با توجه به تولید اندک، و همچنین در برخی مواقع تولید غیراختصاصی این پروتئین در شرایط بدن، استفاده از سیستم‌های بیانی به‌خصوص سیستم‌های باکتریایی می‌تواند قدمی موثر در جهت تولید این پروتئین ارزشمند باشد. چنانچه انتظار می‌رفت تولید این پروتئین در باکتری *E. coli* محقق شد. امید است در آینده با تدابیری که در جهت بهینه سازی روند تولید این پروتئین اندیشیده می‌شود، این باکتری به سویه‌ای مناسب با میزان بیان بالای این پروتئین، تبدیل گردد.

تشکر و قدردانی

از همکاری تکنیکی آقای حسین خواجه علی در تهیه این مقاله سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

1. Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2010; 86(4): 410-25.

2. Miyashiro M, Kadomatsu K, Ogata N, Yamamoto C, et al. Midkine expression in transient retinal ischemia in the rat. Curr Eye Res. 1998; 17(1): 9-13.

3. Muramatsu T. Midkine: a promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system. Curr Pharm Des. 2011; 17(5): 410-23.

4. Mitsiadis TA, Salmivirta M, Muramatsu T, Muramatsu H, et al. Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. Development. 1995; 121(1): 37-51.

5. Zhang ZH, Du LJ, Xiang D, Zhu SY, et al. Expression and purification of bioactive high-purity human midkine in Escherichia coli. J Zhejiang UnivSci B. 2009; 10(2): 79-86.

6. Take M, Tsutsui J, Obama H, Ozawa M, et al. Identification of nucleolin as a binding protein for midkine (MK) and heparin-binding growth associated molecule (HB-GAM). J Biochem. 1994; 116(5): 1063-8.

7. Mishima K, Asai A, Kadomatsu K, Ino Y, et al. Increased expression of midkine during the progression of human astrocytomas. Neurosci Lett. 1997; 233(1): 29-32.

8. Deister C, Schmidt CE. Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. J Neural Eng. 2006; 3(2): 172-9.

9. Talwar T, Srivastava MV. Role of vascular endothelial growth factor and other growth factors in post-stroke recovery: Ann Indian Acad Neurol. 2014 Jan; 17(1): 1-6.

10. Cornelis P. Expressing genes in different Escherichia coli compartments. Curr Opin Biotechnol. 2000; 11(5): 450-4.

11. Tof I. Recombinant DNA Technology in the Synthesis of Human Insulin. Little Tree Pty. 2007; 12(2): 211-220.

12. Reece RJ. Analysis of genes and genomes, 2004; 18(3): 314-321.

13. Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(24): 13703-8.

14. Schägger H. tricine–sds-page. Nature protocols. 2006; 1(1): 16-22.

15. Yan WK, Goette M, Hofmann G, Zaror I, et al. High-level soluble expression, purification and characterization of active human midkine from Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2010; 70(2): 270-6.

16. Tsutsui J, Uehara K, Kadomatsu K, Matsubara S, et al. A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. Biochem Biophys Res Commun. 1991; 176(2): 792-7.

17. Jono H, Ando Y. Midkine: A Novel Prognostic Biomarker for Cancer. Cancers. 2010; 2(2): 624-41.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Ma Z, Li H, Wang B, Shen Q, et al. Midkine mRNA level in peripheral blood mononuclear cells is a novel biomarker for primary non-small cell lung cancer: a prospective study. Journal of cancer research and clinical oncology. 2013; 139(4): 557-62.

19. Levy R, Weiss R, Chen G, Iverson BL, et al. Production of Correctly Folded Fab Antibody Fragment in the Cytoplasm of Escherichia coli trxBgor Mutants via the Coexpression of Molecular Chaperones. Protein expression and purification. 2001; 23(2): 338-47.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Summer 2015; 6(2): 143-151

Cloning and expression of human recombinant midkine gene in *Escherichia coli* Origami strain

Gaffari S. M.Sc.[1], Deldar A. Ph.D[2*], Bahrami A. Ph.D[2], Esmaeilzadeh E. M.Sc.[3], Mahyad B. M.Sc[2], Rooh allah F. Ph.D[1]

1. Islamic Azad university of Tehran, medical branch
2. Maleke-Ashtar university of Tehran, Biochemistry and genetic group
3. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran

* Email corresponding author: aaa.phd.gene@gmail.com

Received: 30 Jul. 2014 Accepted: 25 Nov. 2014

Abstract

Aim: The aim of this research was cloning and expression of human Midkine coding gene (mdk) in Escherichia coli that achieved in a laboratory-scale experiment.

Material and Methods: Methods were included cell culture, RNA extraction, cDNA synthesis, cloning techniques, induction of expression by IPTG (isopropyl thiogalactosidase), expression evaluation using polyacrylamide gel and confirmation by Western blot techniques.

Results: Midkine gene was cloned in pET-21a (+) and then transformed into Origami strain of E. coli. This growth factor was expressed in cytoplasmic level by a colony containing pETmdk recombinant after 16 hours incubation at 18°C and 250 rpm mixing. Expression of histidine tagged 13 kD protein confirmed by Western blotting technique.

Conclusion: Because Origami strain is trxB and gor genes mutant strain its cytoplasm is an oxidizing environment. Due to this, it enhances disulfide bond forming, therefore it seems that after expression of midkine, cysteine residues make an intra-molecular disulfide bridge and remains in soluble form. These conditions provide suitable environment for the proper folding of the protein and consequently solubilization of the protein.

Key words: Escherichia coli, expression, recombinant protein, cloning, Midkine

www.SID.ir