(مقالهٔ پژوهشی)

کلونینگ و بیان ژن اینترفرون آلفا۲bی انسانی در سیستم بیانی اشرشیاکلی

نهضت عبدالرسولی[۱]، حمید رجبی معماری[۲*]، محمد رعایایی اردکانی[۳]، محمدعلی ابراهیمی[۴]، نازنین ابراهیمی[۱]

۱- کارشناس‌ارشد مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی.
۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات
۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی.
۴ استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی.

۱- دانشکدهٔ علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، ایران.
۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.
۳- گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.
۴-گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور تهران، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
حمید رجبی معماری؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۷۱۹۱۹۳
Email: memari@scu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: اینترفرون‌ها وسیلهٔ دفاعی بدن علیه ویروس‌ها هستند که به سرعت در بدن تولید شده، سلول‌های اطراف را به تولید پروتئین‌هایی که تکثیر ویروس را مهار، یا پاسخ ایمنی و رشد سلولی را کنترل می‌کنند، تحریک می‌کنند. با توجه به اهمیت دارویی اینترفرون آلفا ۲b انسانی در ایران و جهان، تولید این دارو در داخل کشور و از طریق بیوشیمیایی امکان‌پذیر اما بسیار مشکل می‌باشد. زیرا تولید این پروتئین توسط سلول‌های سالم بسیار کم انجام می‌شود. هدف از این تحقیق، همسانه‌سازی (Cloning) و بیان ژن اینترفرون آلفا ۲b انسانی در باکتری اشرشیاکلی در یک سیستم بیانی مناسب جهت امکان هدایت پروتئین تولیدشده به فضای پریپلاسمی باکتری است. بیان در پریپلاسم، فضای عالی برای تشکیل پیوندهای صحیح و پیچش صحیح ایجاد می‌کند. ناخالصی پروتئین و فعالیت پروتئازها در پریپلاسم کمتر از سیتوپلاسم است و تخریب و تجزیه پروتئین‌ها در پریپلاسم کمتر اتفاق می‌افتد.

روش بررسی: ژن اینترفرون آلفا۲b پس از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی در ناقل بیانی pET-26b(+) تحت کنترل پروموتور T7 و پپتید نشانه پریپلاسمی pelB و با استفاده از آنزیم‌های برشی NcoI و XhoI کلون گردید و به باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) منتقل گردید. همسانه‌سازی ژن اینترفرون آلفا در ناقل بیانی pET-26b(+) با استفاده از Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی، تأیید شد. سپس بیان ژن اینترفرون آلفا با استفاده از آنالیز بلات نقطه‌ای در فضای پریپلاسمی و به‌صورت پروتئین کل در زمان‌های مختلف پس از القاء با IPTG مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: با استفاده از آنالیز بلات نقطه‌ای تأیید شد که پروتئین نوترکیب اینترفرون آلفا۲b در سیستم بیانی اشرشیاکلی تولید و وارد فضای پریپلاسمی باکتری شده است.

نتیجه‌گیری: این تحقیق می‌تواند امکان تولید پروتئین مهم اینترفرون آلفا۲b انسانی نوترکیب را در شکل صحیح خود و با صرف هزینه‌های بسیار پائین‌تر فراهم آورد.

کلید واژگان: اینترفرون آلفا۲b، pET-26b(+)، اشرشیاکلی، IPTG.

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۴/۱۹ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹۱/۱۱/۲۵ **اعلام قبولی:** ۱۳۹۱/۱۲/۱

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اینترفرون‌ها، پروتئین‌های تولید شده توسط سیستم ایمنی بدن هستند که در پاسخ به عفونت ویروسی، سلول‌های بیگانه، آنتی‌ژن‌ها و یا سلول‌های سرطانی ساخته و رها می‌شوند (۱) و نقش مهمی را در مکانیسم دفاعی بدن علیه ویروس‌ها ایفا می‌کنند (۲). در میان انواع اینترفرون‌ها، اینترفرون آلفا۲ (شامل: آلفا-۲a، آلفا-۲bو آلفا-۲c) به‌طور گسترده برای اهداف پزشکی به‌کار می‌روند (۳). اینترفرون درمانی (همراه با شیمی‌درمانی) برای درمان بسیاری از سرطان‌ها به‌کار می‌رود (۴). هپاتیت B وC نیز اغلب توسط اینترفرون آلفا و در ترکیب با دیگر داروهای ضدویروسی درمان می‌شوند (۵). چندین نوع مختلف از اینترفرون‌ها در حال حاضر برای درمان بیماران آماده شده‌اند. پتانسیل دارویی اینترفرون‌ها با تأیید اینترفرون آلفا-۲a انسانی نوترکیب (rhIFNα2a) به‌نام روفرون A(Roferon-A) در سال ۱۹۸۶ و بعد از آن تأیید اینترفرون آلفا-۲b نوترکیب به‌نام اینترون A(Intron-A) شناخته شد و به عنوان دارو در درمان بیماریهای بدخیم و ویروسی به‌کار رفت (۶،۳). اغلب داروهای نوترکیب اینترفرون آلفا در اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) تولید و تخلیص می‌شوند (۶). اینترفرون آلفا-۲b، از خانوادهٔ اینترفرون‌های نوع یک یا اینترفرون‌های لکوسیتی می‌باشد و از نظر فیزیولوژیکی پروتئین فعالی است که در پاسخ به بسیاری از عوامل عفونی بیان می‌شود و بسیاری از عملکردهای زیستی مثل جلوگیری از همانندسازی ویروس، جلوگیری از پیشرفت سرطان و دیگر عملکردهای ایمونولوژی را انجام می‌دهند و در نتیجه یکی از داروهای زیستی مورد استفاده برای درمان بیماری‌هایی مثل کم‌خونی سلول‌های موئی‌شکل، هپاتیت B مزمن (Chronic hepatitis B) و هپاتیت C مزمن (Chronic hepatitis C) می‌باشند (۷).

در سال ۱۹۸۶، سازمان جهانی غذا و دارو (Foodand Drug Administration)، IFN-α2b نوترکیب را برای درمان سلول‌های سرطان خون مویی‌شکل (Hairy cell leukemia)، تأیید کرد و در حال حاضر این پروتئین نوترکیب در سیستم بیانی باکتری اشرشیاکلی تولید می‌شود (۸). هم اکنون این پروتئین رتبهٔ سوم مصرف جهانی داروهای پروتئینی بیولوژیک را بعد از انسولین (Insulin) و اریتروپوئیتین (Erythropoietin) دارد (۹،۸).

به‌منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب، سیستم‌های بیانی مختلفی توسط دانشمندان استفاده و به‌طور تجاری بهره‌برداری شده‌اند(۱۰). مزیت‌های بسیاری برای استفاده از سیستم بیانی اشرشیاکلی به اثبات رسیده و آن را یک میکروارگانیسم ارزشمند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سطوح بالا باقی گذارده است. ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی کاملاً شناخته‌شدهٔ این باکتری، تکثیر در زمان کوتاه، آسان بودن دستورزی آن، دانش اثبات‌شدهٔ فرمانتاسیون و نهایتاً ظرفیت بالا برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب (بیش از ۲۰٪ از محتوای پروتئین کل سلولی)، اشرشیاکلی را یکی از پرکاربردترین میزبان‌ها جهت تولید پروتئین نوترکیب ساخته است(۱۲،۱۱). بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی فعالیت زیستی کامل خود را در شکل غیرگلیکوزیله حفظ می‌کنند و بنابراین در اشرشیاکلی می‌توانند تولید شوند. به‌علاوه برخی از پیشرفت‌ها، به‌عنوان مثال، بیان پریپلاسمی، افزایش میزان پروتئین به شکل محلول و تولید پروتئین با تشکیل باندهای دی‌سولفیدی صحیح را امکان‌پذیر ساخته است (۱۴،۱۳).

ناگاتا و همکارانش (۱۹۸۰)، برای اولین‌بار ژن اینترفرون آلفا را در اشرشیاکلی همسانه‌سازی و بیان کردند. در شماری از کلونی‌ها تا ۱۰۰۰ واحد فعالیت ضد ویروسی در هر گرم سلول به دست آمد (۱۵). گودل و همکاران (۱۹۸۰)، نیز اینترفرون آلفا را در پلاسمید PNCV کلون کردند و آن‌را در اشرشیاکلی بیان کردند. pNCV مشتقی از پلاسمید pBR322 است که دارای پروموتر تریپتوفان و پپتید راهنما می‌باشد (۱۵). گودل

Archive of SID

www.SID.ir

(۱۹۸۰) همچنین ژن اینترفرون آلفا را بدون پپتید راهنما در پلاسمید pBR322 کلون بیان کرد (۱۵).

تولید محصولات دارویی مهم از منابع طبیعی آنها اغلب به میزان بسیار اندک و با صرف هزینهٔ بالایی صورت می‌گیرد. با توجه به اهمیت دارویی اینترفرون آلفا ۲b انسانی در ایران و جهان، تولید این دارو در داخل کشور و از طریق بیوشیمیایی امکان‌پذیر اما بسیار مشکل می‌باشد. زیرا تولید این پروتئین توسط سلول‌های سالم بسیار کم انجام می‌شود. بنابراین راه آسانتر برای نیل به این هدف استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک است. در سال‌های اخیر نیز پژوهش‌های گسترده‌ای برای تولید داروهای نوترکیب از طریق میکروارگانیسم‌ها، حیوانات ترانس‌ژنیک، گیاهان و جانداران دریایی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این تحقیق، همسانه‌سازی (Cloning) و بیان ژن اینترفرون آلفا ۲b انسانی در باکتری اشرشیاکلی تحت کنترل پروموتر T7 و پپتید نشانهٔ پریپلاسمی pelB (Periplasmic signal sequence) جهت هدایت پروتئین تولیدشده به فضای پریپلاسمی باکتری است. این تحقیق می‌تواند امکان تولید پروتئین مهم اینترفرون آلفا۲b انسانی نوترکیب را در شکل صحیح خود و با صرف هزینه‌های بسیار پایین‌تر فراهم آورد.

مواد شیمیایی و آنزیم‌ها: مواد مورد نیاز شامل آنزیم‌های برشی NcoI و XhoI و لیگاز (New England Biolabs)، آنزیم پلیمرازی (سیناژن)، مواد لازم برای تهیه و رنگ‌آمیزی ژل آگارز، نشانگرهای مولکولی (سیناژن)، آغازگرها (فزاپژوه)، مواد مورد نیاز برای بلات نقطه‌ای (Roche)، محیط کشت باکتری (Himedia) و آنتی‌بیوتیک‌ها (Duchefa) می‌باشند که از شرکت‌های ذکر شده، تهیه شدند.

باکتری‌ها: در این تحقیق از باکتری اشرشیاکلی، سویه‌های DH5α و BL21(DE3) استفاده شد. از سویه DH5α به‌عنوان میزبان برای نگهداری و تکثیر سازه‌های تهیه شده استفاده گردید و از سویهٔ BL21 (DE3) جهت بیان ژن اینترفرون استفاده شد.

آغازگرها: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر DNA طراحی و از طریق شرکت فزابیوتک تهیه شد و عبارت بودند از:

آغازگر پیشرو(Forward primer)

5'- CAT GCC ATG GCATGTGATCTGCCTCAAACC-3'
5'- Anchor seqNcoIAdditonal seqIFN alpha-3'

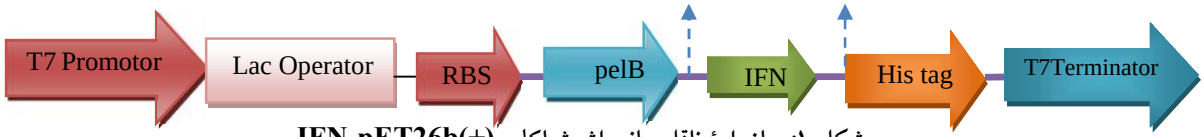
آغازگر معکوس (Backward primer)

5'- TGCAACCGCTC GAGTTGTTGTTCCTTACTTCTTAAAC -3'
5'-Additional seq Anchor seqXhoI2(Glu)IFN alpha-3'

آغازگر پیشرو دارای جایگاه برشی برای آنزیم NcoI و آغازگر معکوس دارای جایگاه برشی برای آنزیم XhoI بود. جهت افزایش کارآیی برش آنزیم‌های برشی، دو توالی اضافی به عنوان لنگرگاه آنزیم به دوطرف آغازگر افزوده گردید. همچنین برای تسهیل در تخلیص پروتئین در مراحل بعدی پژوهش، از فاکتور هگزا شامل دو اسید آمینه گلوتامیک اسید که برای برش در نظر گرفته شده است، پس از توالی Histag در آغازگر برگشت استفاده شد.

ناقل‌ها: در مطالعهٔ حاضر از یک ناقل بیانی به نام pET-26b(+) (شکل ۱) استفاده شد.

این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسین در باکتری، محل‌های برش برای آنزیم‌های NcoI و XhoI، پیش‌بر T7 lac برای افزایش نسخه‌برداری و پپتید نشانهٔ پریپلاسمی pelB برای هدایت پروتئین به فضای پریپلاسمی می‌باشد.



شکل ۱: سازوارهٔ ناقل بیانی اشرشیاکلی IFN-pET26b(+).

Archive of SID
www.SID.ir

روش بررسی

تکثیر DNA و خالص‌سازی محصول PCR: ژن اینترفرون آلفا2b به طول 500bp قبلاً در وکتوری به نام pRSET کلون شده بود. در پژوهش حاضر، از این وکتور و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، برای تکثیر ژن اینترفرون آلفا2b به وسیلهٔ PCR استفاده گردید. برای تخلیص محصول PCR از کیت تخلیص بایونیر استفاده شد.

هضم آنزیمی ناقل و محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی NcoI وXhoI و واکنش اتصال: محصول PCR و ناقل با استفاده از آنزیم‌های برشی NcoI و XhoI (تهیه شده از شرکت Biolabs) به‌طور جداگانه هضم گردیدند و با استفاده از کیت تخلیص از ژل بایونیر خالص‌سازی شدند. و در نهایت محصول PCR در ناقل بیانی pET-26b(+)، با استفاده از آنزیم T_4 DNA Ligase کلون گردید.

ترانسفورماسیون اشرشیاکلی با استفاده از سازه‌های تهیه شده: ابتدا باکتری‌های مستعد شده اشرشیاکلی به روش شوک حرارتی تهیه شدند (۱۶) و همراه با ۱۰۰ نانوگرم از محصول اتصال به آرامی مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. سپس باکتریها به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ^{o}C ۴۲ قرار گرفتند و به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ نگهداری شدند. در مرحلهٔ بعد ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB به میکروتیوب‌ها اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ^{o}C۳۷ درون شیکر انکوباتور قرار گرفتند. در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری ترانسفورم‌شده روی پتری دیش حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) توزیع گردید و در دمای ^{o}C۳۷ به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند.

بررسی بیان ژن اینترفرون آلفا2b: پس از غربال‌گری، یک کلونی برای بررسی بیان پروتئین انتخاب گردید. در این تحقیق، بیان ژن مورد نظر در دو سطح کل پروتئین‌های باکتری و در فضای پریپلاسمی باکتری بررسی شد. در تهیهٔ پروتئین‌های کل، یک کلونی از باکتری تراریخته و رشد یافته بر روی محیط گزینشگر، در ۱ میلی‌لیتر محیط مایع TB حاوی کانامایسین کشت داده شد و در انکوباتور ^{o}C۳۷ شیکردار در دور rpm ۲۵۰ به مدت یک شب قرار داده شد.۵۰ میلی‌لیتر از محیط مایع TB کانامایسین‌دار با ۱ میلی‌لیتر از کشت شب قبل، در ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری استریل، تلقیح و در دمای ^{o}C ۳۷ شیک شد تا زمانی که غلظت آن در $O.D_{600}$ به ۰/۴ تا ۰/۶ رسید. از باکتری‌های کشت داده شده، ۱ میلی‌لیتر در میکروتیوب ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل، ۵۰ میکرولیتر از بافر نمونه (۲x) اضافه شد و تا زمان استفاده در فریزر ^{o}C ۲۰- نگهداری شدند (نمونه‌های غیر القایی به عنوان کنترل منفی). به مابقی کشت IPTG با غلظت نهایی۱ میلی‌مولار اضافه شد و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ^{o}C ۲۲ با هوادهی مناسب انکوبه شدند. در فواصل زمانی ۲، ۴، ۸ و ۱۵ ساعت بعد از القاء، هر بار ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری برداشته و به میکروتیوب منتقل شد. تمامی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۷۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصله در ۵۰ میکرولیتر از بافر نمونه (۲x) حل شده و در فریزر ^{o}C۲۰- نگهداری شدند. (نمونه‌های القایی).

تهیهٔ پروتئین‌های پریپلاسمی به روش شوک اسمزی: در این تحقیق از نمونهٔ کشت‌های باکتریایی پس از گذشت ۱۵ ساعت از القاء جهت تهیه پروتئین‌های پریپلاسمی استفاده گردید. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونهٔ کشت القاء شده به درون فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ گردید. فاز رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر از بافر A (Tris-Hcl ۰/۱۸۹ گرم، آب مقطر ۳۰ میلی‌لیتر) حل شد و سپس در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از حذف فاز رویی، رسوب سلولی به آرامی در ۰/۵ میلی‌لیتر

www.SID.ir
Archive of SID

از بافر A و سپس در ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر B (سوکروز ۴ گرم، بافر A ۸ میلی‌لیتر، EDTA (۰/۵M، PH:۸)) حل گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و پس از سانتریفیوژ (در دور ۲۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق)، مایع رویی حذف و رطوبت اضافی گرفته شد. بلافاصله ۲ میلی‌لیتر از آب دوبار تقطیر یخ-آب به رسوب سلولی اضافه و حل شد و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه‌ها در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای 4^oC سانتریفیوژ شدند. فاز رویی (حاوی پروتئین‌های پریپلاسمی) و رسوب زیرین (پروتئین‌های سیتوپلاسمی) هرکدام به‌طور جداگانه به میکروتیوب‌های جدید منتقل شدند.

آنالیز ایمونوبلاتینگ: نمونه‌های پروتئین تخلیص‌شده از باکتری، با استفاده از بلات نقطه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های پروتئینی (القایی و غیرالقایی) با استفاده از سمپلر، مستقیماً به‌صورت نقاطی بر روی کاغذ نیتروسلولز قرار داده شدند. پس از خشک شدن نمونه‌ها، بر روی کاغذ نیتروسلولز، محلول western blocking 1x اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ^oC ۱۵ تا ۲۵ قرار گرفتند. محلول مرحلهٔ قبل به آرامی بیرون ریخته شد و محلول $Anti\text{-}His_6Peroxidase$ بر روی نقاط ایجاد شده روی کاغذ نیتروسلولز اضافه گردید و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۱۵تا ^oC۲۵ انکوبه شد. محلول مرحلهٔ قبل به آرامی بیرون ریخته شد و کاغذ نیتروسلولز، ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با TBST1x شست‌وشو داده شد. برای ظهور باندهای پروتئینی بر روی نقاط پروتئینی ریخته شده سوبسترای آنزیم افزوده شد. پس از ظهور باندها، کاغذ با آب مقطر شسته شد و در نهایت ظهور یا عدم ظهور باندهای موردنظر مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

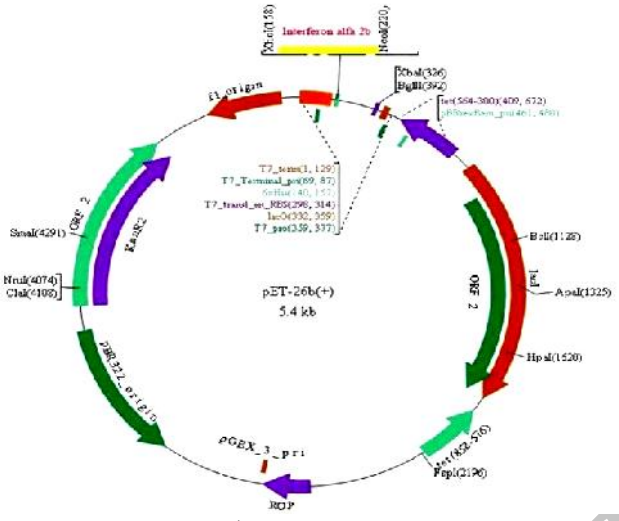
تکثیر ژن اینترفرون آلفا۲b با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی: ژن اینترفرون آلفا۲b با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی‌های انتهای '۳ و '۵ ژن اینترفرون آلفا۲b و محل‌های برشی NcoI در آغازگر پیشرو و XhoI در آغازگر معکوس طراحی شده بود، تکثیر گردید.

انجام عمل همسانه‌سازی و بررسی صحت آن: پس از انجام هضم آنزیمی ناقل و ژن، غلظت ژن اینترفرون و ناقل pET تعیین شد. سپس به نسبت مناسب با یکدیگر مخلوط شدند و با استفاده از آنزیم T4 لیگاز و طی فرایند اتصال، ژن اینترفرون وارد ناقل pET شد و به سلول میزبان باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) منتقل گردید. همسانه‌سازی ژن اینترفرون آلفا۲b در ناقل pET-26b(+)، با استفاده از روش‌های Colony PCR (شکل ۲ الف)، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های NcoI و XhoI (شکل ۲ ب) و تعیین توالی تأیید گردید.

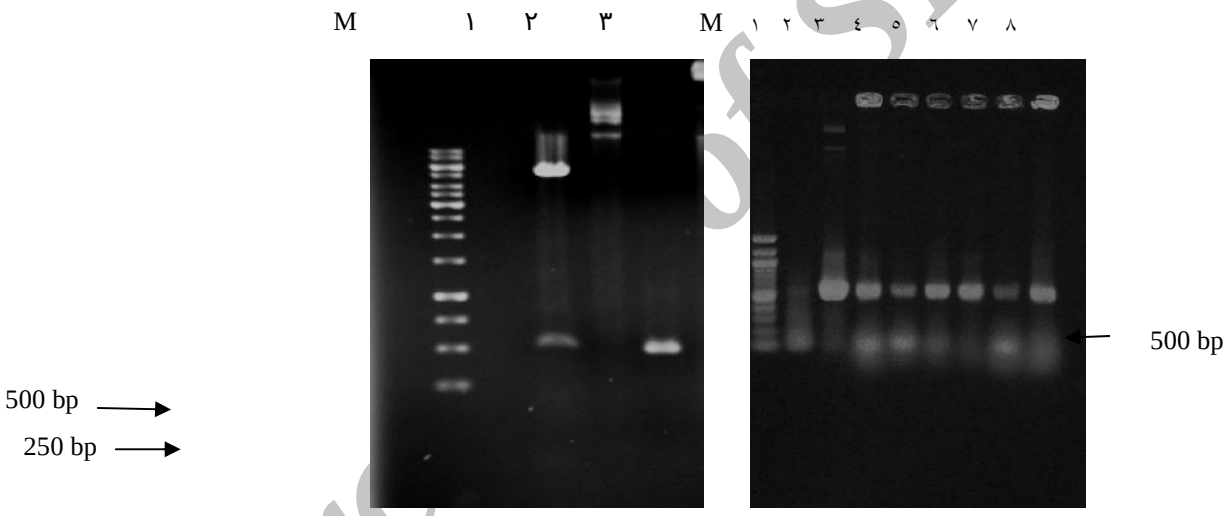
بررسی بیان ژن اینترفرون آلفا با استفاده از بلات نقطه‌ای: در این روش، سوسپانسیون‌های باکتریایی در زمان‌های مختلف ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۵ ساعت پس از افزودن IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار تهیه و از هر کدام به میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی کاغذ نیتروسلولز برده شد و پس از افزودن آنتی‌بادی منوکلونال به نام Anti-His6-peroxidaze (خریداری شده از شرکت Roche آلمان) علیه پروتئین مورد نظر و افزودن سوبسترا به نام BM Blue POD (Roche آلمان)، بیان ژن در زمان‌های مختلف مشاهده گردید در حالیکه در کنترل منفی (باکتری حاوی ناقل بدون ژن) بیان ژن دیده نشد (شکل ۳-الف).

بررسی ترشح ژن اینترفرون آلفا در فضای پری‌پلاسمیک: بیان سیتوپلاسمی و پریپلاسمی پروتئین اینترفرون آلفا، ۱۵ ساعت پس از القاء مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا به روش شوک اسمزی اجزای این دو فضا از یکدیگر جدا گردید و سپس با استفاده از روش بلات نقطه‌ای مشخص شد که اینترفرون آلفا۲b وارد فضای پریپلاسمی باکتری شده است (شکل۳-ب).

Archive of SID
www.SID.ir

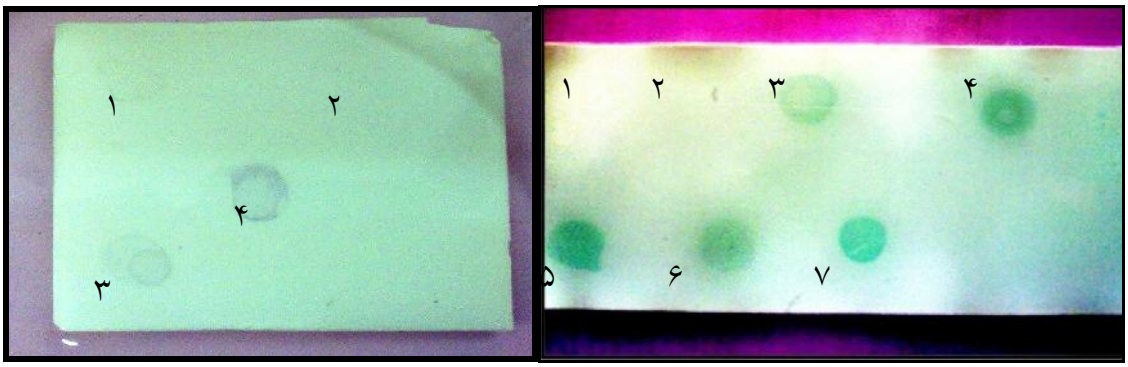


شکل ۱: نقشهٔ ناقل بیانی pET-26b(+) و محل وارد شدن ژن اینترفرون آلفا. این ناقل دارای ژن مقاومت به کانامایسین (nptII)، و محل‌های برشی NcoI و XhoI ، پیش‌بر lacT7 و پپتید نشانهٔ پری‌پلاسمی pelB است.



شکل ۲- الف: تأیید حضور ژن اینترفرون آلفا در اشرشیاکلی با استفاده از تکنیک Colony PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن اینترفرون آلفا. چاهکM- نشانگر مولکولی ۱۰۰bp چاهک۱-کنترل آب (کنترل منفی) چاهک ۲-کنترل مثبت (ناقل pETIFNα). چاهک‌های ۸-۳-کلونی‌های باکتری حاوی ژن اینترفرون آلفا. ب) تأیید حضور ژن اینترفرون آلفا در اشرشیاکلی با استفاده از هضم آنزیمی. چاهک M، نشانگر مولکولی ۱kb به ترتیب با سایزهای 2500.3000.3500.4000.5000.6000.8000.10000bp 250.500.750.1000.1500.2000. ، چاهک ۱، خروج ژن اینترفرون از پلاسمید پس از انجام هضم آنزیمی، چاهک ۲، پلاسمید فاقد ژن، چاهک ۳، ژن اینترفرون آلفا.

www.SID.ir



الف ب

شکل ۳-الف) تأیید بیان ژن توسط تکنیک بلات نقطه‌ای، ۱) ناقل pET26b(+) فاقد ژن اینترفرون آلفا قبل از القاء، ۲) ناقل pET26b(+) حاوی ژن اینترفرون آلفا قبل از القاء، ۳)، ۴)، ۵)،۶)و۷)ناقلpET26b(+) حاوی ژن اینترفرون آلفا۲b به ترتیب ۱، ۲، ۴، ۸و۱۵ ساعت پس از القاء با IPTG. ب) تأییدحضور ژن در فضای پری‌پلاسمی باکتری توسط تکنیک بلات نقطه ای. ۱) ناقل pET26b(+) فاقد ژن اینترفرون آلفا قبل از القاء، ۲) ناقلpET26b(+) حاوی ژن اینترفرون آلفا قبل ازالقاء ۳)ناقل pET26b(+) حاوی ژن آلفا۲b، ۲ساعت پس از القاء، ۴) تأیید انتقال پروتئین اینترفرون آلفا ۲b در فضای پریپلاسمی

بحث

امروزه تقاضای زیادی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب انسانی جهت درمان و تشخیص وجود دارد. بدین منظور سیستم‌های بیانی باکتریایی، قارچی، حشره، پستانداران و گیاهان برای تولید این پروتئین‌ها به کار می‌روند. در حال حاضر پروتئین‌های با ارزش دارویی و اقتصادی ترجیحاً در سلول‌های باکتریایی تولید می‌شوند و در نسبت‌های بیانی بالا، پروتئین‌های نوترکیب به شکل اجسام نامحلول (اینکلوژن‌بادی) رسوب داده می‌شوند و برای کاربردهای بعدی مجدداً ریفولد می‌شوند(۱۷). به دلیل ارزش درمانی بسیار بالای اینترفرون‌ها، چندین سیستم بیانی (اشرشیاکلی، باسیلوس سابتیلیس، استرپتومایسس لیویدانس، مخمر، سلول‌های آلوده‌شده با باکلوویروس و سلول‌های پستانداران) برای تولید، تعیین خصوصیت و دستورزی اینترفرون‌ها توسعه یافته‌اند (۳، ۱۷). در این میان، سیستم‌های بیوسنتزی با هزینهٔ تولید پایین که اینترفرون را با ارزش درمانی بالا تولید می‌کنند بسیار مطلوب‌اند (۱۷).

مکان تولید پروتئین در سلول نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. پروتئین نامتجانس (Heterologous protein) می‌تواند در سیتوپلاسم یا در پریپلاسم تولید شده و یا به خارج از سلول ترشح شود (۷). ایجاد اجسام نامحلول (Inclusion body)، یکی از مشکلات عمده در مسیر تولید پروتئین به‌صورت سیتوپلاسمی است. زیرا دوباره تاخوردن (Refolding) پروتئین‌های مجتمع شده کار مشکل و دشواری است. عدم اطمینان از اینکه آیا پروتئین‌های تاخورده، فعالیت زیستی خود را به‌دست می‌آورند و کم‌شدن بازده پروتئین‌های دوباره تاخورده و تخلیص شده از جمله مشکلات بیان سیتوپلاسمی است (۷و۱۸). همچنین به‌علت حضور پروتئازها در سیتوپلاسم تخریب پروتئین قابل حل بیشتر است (۷). به همین دلیل در این پژوهش بیان پریپلاسمی پروتئین اینترفرون آلفا 2b مورد بررسی قرار گرفت. بیان پریپلاسمی پروتئین دارای چندین مزیت مهم می‌باشد. تخلیص پروتئینی که به صورت پریپلاسمی تولید می‌گردد راحت‌تر است. بیان پروتئین در فضای پریپلاسمی فضای عالی برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و پیچش صحیح ایجاد می‌کند. همچنین ناخالصی پروتئین و فعالیت پروتئازها نیز در فضای پریپلاسمی کمتر از سیتوپلاسم است (۱۸).

Archive of SID
www.SID.ir

بنابراین، هدف از این تحقیق در وهلهٔ اول، همسانه‌سازی و بیان ژن اینترفرون آلفا ۲b در یک سیستم بیانی مناسب و شناخته شده و در مرحلهٔ بعد، بررسی امکان ترشح اینترفرون آلفا۲b در فضای پریپلاسمی توسط پپتید راهنمای pelB، با نظر به خالص‌سازی آسان پروتئین تولید شده در باکتری اشرشیاکلی بود. سیستم بیانی pET26b(+) که در تحقیق حاضر استفاده شد، یکی از قوی‌ترین سیستم‌ها برای همسانه‌سازی و بیان پروتئین‌های نوترکیب در اشرشیاکلی است. زیرا این ناقل دارای پروموتر قوی T7 جهت افزایش نسخه‌برداری ژن هدف، پپتید نشانه pelB جهت هدایت پروتئین تولید شده به فضای پریپلاسمی- که از مناسبترین مکان‌ها برای تشکیل نهایی پروتئین ساخته شده است- و نیز توالی ۶ نوکلئوتیدی Histag جهت تسهیل در استخراج پروتئین تولید شده با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، می‌باشد. با انجام این تحقیق با هدف بهینه کردن تولید پروتئین اینترفرون آلفا۲b در باکتری اشرشیاکلی می‌توان زمینه را برای تولید سایر پروتئین‌ها فراهم کرد. با توجه به تحقیقات سایر محققان، می‌توان عنوان کرد که ناقل‌های pBR322، دارای برچسب خاصی جهت تسهیل در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب تولید شده نیستند، اما ناقل مورد استفاده در این پژوهش (pET26b(+)) علاوه بر بیان بالا تحت پروموتر T7lac، دارای برچسب پلی‌هیستیدین (His-tag) می‌باشد که پروتئین نوترکیب تولید شده به‌صورت متصل به آن را می‌توان با گذراندن از ستون‌های کروماتوگرافی ویژه، خالص‌سازی کرد و بر خلاف تحقیقات قبل که خالص‌سازی امری دشوار بود، در اینجا خالص‌سازی بسیار راحت‌تر صورت خواهد گرفت. در ضمن در پایان کار می‌توان نشانه پلی‌هیستیدین را با استفاده از جایگاه پروتئازی هگزا شامل دو اسید آمینه گلوتامیک‌اسید که در پرایمر معکوس در نظر گرفته شده است حذف نمود.

مایر و همکاران (۱۹۸۲)، ژن سنتتیک اینترفرون آلفا ۲b را تحت کنترل پروموترهای Lac و Lacuv5 بیان کردند (۱۵). این پروموتر نسبت به پروموتر T7lac که در تحقیق حاضر از آن استفاده شد، ضعیف‌تر است و بیان ژن توسط این پروموتر نسبت به سیستم بیانی تحقیق حاضر، ممکن است در سطح پایین‌تری صورت بگیرد. اکرمی ابرقویی و همکاران (۱۳۷۹)، ژن IFNα2b، به‌صورت cDNA و توالی پپتید نشانهٔ مصنوعی همراه (که باعث ترشح پروتئین می‌شود) را از پلاسمید pALCA1SIFN که یک پلاسمید ناشناخته در اشرشیاکلی می‌باشد بیرون آورده و برای بیان مستقیم ژن اینترفرون آلفا به ناقل بیانی pET24d(+) که یک سیستم شناخته شده در اشرشیاکلی است و دارای پروموتر قوی فاژ T7 است، وارد کردند. با وارد کردن pET24d(+) در اشرشیاکلی سویهٔ BL21(DE3)، بیان ژن اینترفرون آلفا۲b به‌وسیلهٔ بلات نقطه‌ای و وسترن بلات مورد تأیید قرار گرفت. در بررسی این سیستم بیانی، نتایج به دست آمده نشان داد که ظاهراً اینترفرون آلفای تولید شده وارد فضای پریپلاسمی نشده و پپتید راهنما از اینترفرون جدا نشده است (۱۵). درحالی که در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از بلات نقطه‌ای نشان داد که پروتئین اینترفرون آلفای تولید شده وارد فضای پریپلاسمی شده است. مزیت ناقل بیانی pET26b(+)، که در تحقیق حاضر از آن استفاده شد در این است که این ناقل دارای توالی آمینواسیدی pelB است که باعث هدایت پروتئین IFNα2b تولید شده به فضای پریپلاسمی می‌شود. در حالی که ناقل بیانی pET24d(+) فاقد این توالی است. بهروان و همکارانش (۲۰۰۴)، cDNAی اینترفرون آلفا ۲b را از mRNA لکوسیت‌های خون انسانی تهیه کردند و پس از هضم با آنزیم‌های برشی، در ناقل بیانی pET21b تحت کنترل پروموتر T7 کلون کردند. در این تحقیق، ژن اینترفرون آلفای نوترکیب انسانی بدون پپتید نشانه و مستقیماً از DNA لکوسیت انسانی تکثیر شد و به درون اشرشیاکلی سویه BL21 کلون گردید. بیان ژن اینترفرون در این سیستم بیانی توسط آنالیز SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. در این تحقیق، ژن اینترفرون به‌صورت

Archive of SID

www.SID.ir

سیتوپلاسمی بیان شد و به‌دلیل نبود پپتید نشانه نتوانست وارد فضای پریپلاسمی شود (۱۹).

از معایب پروموترهای با القای حرارتی، یکی عدم انجام القای کارآمد در دمای پایین است و دیگری، القای پاسخ‌های شوک حرارتی است. پاسخ شوک حرارتی اشرشیاکلی منجر به تولید پروتئین‌هایی می‌شود که اغلب، پروتئازهای سلولی هستند و می‌توانند جداسازی پروتئین‌های نوترکیب را با مشکل مواجه کنند.

با انجام موفق این تحقیق و با توجه به کاربردهای درمانی اینترفرون آلفا2b و همچنین مزیتهای باکتری اشرشیاکلی به‌عنوان میزبان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در فضای پریپلاسمی، این سیستم می‌تواند جایگزین مناسبی جهت تولید این پروتئین ارزشمند دارویی نسبت به سایر سیستم‌های تولید پروتئین باشد.

منابع

1-Jadhav T, Jahidul Md. Cloning and production of Interferon alpha (IFNalfa). Report Version(1).Skövde University; 2009.

2-Gresser I, Maury C, Carnaud C, De Maeyer E, Maunoury MT, Belardelli F. Anti-tumor effects of interferon in mice injected with interferon-sensitive and interferon-resistant Friend erythroleukemia cells. VIII. Role of the immune system in the inhibition of visceral metastases. Int J Cancer 1990;46(3):468–74.

3-Salunkhe S, Soorapaneni S, Prasad KS, Raiker VA, Padmanabhan S. Strategies to maximize expression of rightly processed human interferon alpha2b in Pichia pastoris. Protein Expr Purif 2010;71(2):139-46.

4-Goldstein D, Laszlo J. The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. CA Cancer J Clin 1988;38(5):258–77.

5-Cooksley WG. The role of interferon therapy in hepatitis B. MedGenMed 2004;6(1):16-25.

6-Rabhi-Essafi I, Sadok A, Khalaf N, Fathallah DM. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon alpha as a GST-fusion protein in E.coli. Protein Eng Des Sel 2007;20(5):201-9.

7-Ramanan RN, Tik WB, Rajabi Memari H, Azaman SNA, Ling TC, Tey BT, et al. Effect of signal sequences and promoters in producing recombinant human interferonα-2b in E.coli. Afr Biotechnol J 2010;9(3):285-92.

8-de Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, et al. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. J Leukoc Biol 2001;69(6):912–20.

9-Arlen PA, Falconer R, Cherukumilli S, Cole A, Cole AM, Oishi KK, et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. Plant Biotechnol J 2007;5(4):511-25.

10-Tissot G, Canard H, Nadai M, Martone A, Botterman J, Dubald M. Translocation of aprotinin, a therapeutic protease inhibitor, into the thylakoid lumen of genetically engineered tobacco chloroplasts. Plant Biotechnol J 2008;6:309-20.

11-Goeddel DV. Expression of heterologous proteins in E.Coli. Methods Enzymol 1990;185:3-7.

12-Hodgson J. Expression systems: A user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. BioTechnol 1993;11:887-93.

13-Frommer WB, Ninnemann O. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. Ann Rev Plant Phys 1995;46(2):419-44.

14-Fuh G, Mulkerrin MG, Bass S, McFarland N, Brochier M, Bourell JH, et al. The human growth hormone receptor. Secretion from Escherichia coli and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. J Biol Chem 1990;265(6):3111-5.

15-AkramiAbarghuei H. Cloning & Expression of human interferon alpha2 in E.coli [dissertation]. Tehran: Tarbiat Moddares Univ; 1998. [In Persian]

16-Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p.1448.

17- Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol 2005;115(2):113-28.

18-Kiani J. [Principles of expression recombinant proteines in E.coli]. Tehran: Andishe zohur; 2005. p.125. [In Persian]

19-Behravan J, Ahmadpour H. Cloning and characterization of directly amplified antiviral gene interferon alpha-2b (HuIFNalpha-2b) from human leukocytes chromosomal DNA. Arch Pharm Res 2004;27(7):776-80.

Archive of SID
www.SID.ir

Production of Human Alpha 2b Interferon in *E.coli* Expression System

Nehzat Abdolrasouli [1], Hamid Rajabi Memari[2*], Mohammad Roayaei Ardakani[3], Mohamad Ali Ebrahimi [4], Nazanin Ebrahimi[1]

1-MS Biotechnology.
2-Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding.
3-Associate Professor of Biology.
4-Assistant Professor of Agricultural Biotechnology.

1-Department of Agricultural Biotechnology, Payam Nur University, Karaj, Iran.
2-Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
3-Department of Biology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
4-Department of Agricultural Biotechnology, Payam Nur University,Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Hamid Rajabi Memari
Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
Tel:+989163719193
Email:memari@scu.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Interferons are part of the body's defense system against viruses. These proteins are generated in the body, and then they trigger the cells around them to produce inhibitor proteins against virus replication. The purpose of this study was cloning and expression of the human interferon alpha-2b gene in preplasmic space of *Escherichia coli*.

Subjects and Methods: In this research, Alpha 2b interferon gene was cloned in a pET-26b(+) expression vector, under the control of T7 promoter and pelB periplasmic signal peptide sequence using NcoI and XhoI restriction enzymes. The expression vector was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3).Cloning of alpha interferon gene confirmed using colony PCR, digestion and DNA sequencing.Gene expression of alpha interferon was examined by SDS-PAGE and Dot blot analysis. Also the possibility of periplasmic targeting was determined using SDS-PAGE and dot blot analysis at 15 hrs after induction.

Results: The results showed that Alpha 2b interferon was produced in bacterial expression system and targeted to periplasmic space.

Conclusion: Our study showed that the production of pharmaceutical recombinant protein in preplasmic space of bacterial expression system is fissible and can be ustilized as a cheaper source and more efficient than conventional expression systems.

Keywords: Interferon-α2b, *pET-26b(+)*, Escherichia coli, *IPTG*.

►*Please cite this paper as:*
Abdolrasouli N, Memari HR, Roayaei Ardakani M, Ebrahimi MA, Ebrahimi N. Production of Human Alpha 2b Interferon in E.coli Expression System. Jundishapur Sci Med J 2013;12(3):325-334

Received: July 10, 2011 **Revised: Feb 13, 2013** **Accepted: Feb 19, 2013**

www.SID.ir