

## تولید متالوپروتئیناز ۶۳ کیلودالتونی (gp63) لیشمانیا ماژور در مخمر

### متیلوتروف *Pichia pastoris*

علی اکبر شعبانی<sup>۱،۵\*</sup> (Ph.D)، مک مستر روبرت<sup>۳</sup> (Ph.D)، بهرام کاظمی<sup>۴</sup> (Ph.D)،  
محسن کریمی<sup>۱</sup> (M.Sc)، دلاور شهباززاده<sup>۱</sup> (Ph.D)، فریدون مهبودی<sup>۱</sup> (Ph.D)

۱ - انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، تهران

۲ - مرکز مطالعات بیوتکنولوژی، دفتر همکاری های فن آوری ریاست جمهوری اسلامی ایران، تهران

۳ - دانشگاه بریتیش کلمبیا، دپارتمان ژنتیک پزشکی، کانادا

۴ - دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، بخش بیولوژی مولکولی

۵ - دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و میکروبیولوژی

### خلاصه

سابقه و هدف: باتوجه به مشکلات ناشی از لیشمانیا به عنوان یک انگل داخل سلولی بیماریز که بیش از ۱۲ میلیون نفر را در بیش از ۸۶ کشور جهان مبتلا نموده است و در راستای ارزیابی توانایی گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی (gp63) لیشمانیا ماژور به عنوان یک ایمنوژن در تحریک سیستم ایمنی میزبان و همچنین آنتی ژن تشخیصی، ژن کد کننده مولکول فوق در وکتور دو میزبانه pHIL-S1 به منظور بیان آن ژن در مخمر متیلوتروف *P.pastoris* کلون و بیان گردید و در نهایت خصوصیات مولکول نوترکیب حاصل نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. مواد و روش ها: ژن تغییر یافته gp63 به گونه ای که فقط پروتئین بالغ را کد نماید، در وکتور دو میزبانه (و همچنین پلاسمید puc19) کلون گردید. مخمر *Pichia pastoris* (سویه های KM71 و GS115) با پلاسمید دو میزبانه نوترکیب و همچنین با پلاسمید pHIL-S1 (به تنهایی) ترانسفورم گردید. کلون های ترانسفورم شده در محیط فاقد هیستیدین انتخاب شدند، DNA کروموزومی ترانسفورمنت ها تخلیص گردید و با روش های PCR و Sourthen و Blotting (S. B.)، وارد شدن ژن فوق در کروموزوم مخمر نوترکیب مورد ارزیابی قرار گرفت. ترانسفورمنت های تایید شده، در محیط حاوی گلیسرول BMGY، تا حصول کدورت OD<sub>600</sub>=6 کشت و سپس جهت بیان ژن هترولوگ فوق به محیط حاوی متانول، BMMY، انتقال داده شدند. با افزودن متانول به صورت روزانه، حالت القاء در آنان حفظ گردید. با تخلیص RNA و انجام Northern Blotting (N.B) صحت نسخه برداری و همچنین بیان ژن فوق (تولید پروتئین نوترکیب) با ژل ۱۲٪ SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ، و IFA مورد ارزیابی قرار گرفت. میکروسکوپ الکترونی و ایمونوالکترون میکروسکپی برای تعیین محل داخل سلولی گلیکوپروتئین هترولوگ gp63، در مخمر بیان کننده ژن فوق مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت متالوپروتئیناز نوترکیب (rgp63) و همچنین تأثیر بازدارنده های آنزیمی با SDS-PAGE gelatin gel مطالعه گردید، توانایی مخمر در گلیکوزیلاسیون متالوپروتئیناز نوترکیب (rgp63) نیز سنجش گردید.

یافته ها: PCR و (S. B.) وارد شدن ژن gp63 را به گونه ای صحیح در کروموزوم مخمر نوترکیب تأیید کردند. (N. B.) بر روی RNA تخلیص شده از مخمر نوترکیب صحت نسخه برداری از ژن gp63، ژل ۱۲٪ SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ نیز، بیان ژن فوق (تولید پروتئین نوترکیب) را در مخمر ترانسفورمنت تأیید

نمودند. مطالعه با SDS-PAGE gelatin gel فعال بودن مولکول فوق را اثبات نمود. یدواستامید و EDTA با غلظت ۵ میلی‌مولار از فعالیت این مولکول در ژل مزبور ممانعت نمودند. بررسی‌ها با میکروسکوپ الکترونی وجود ناحیه پروتئینی متراکم را در فضای پریپلاسمی مخمر ترانسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن نشان داد. بررسی‌های ایمونوالکترون میکروسکوپی و IFA نیز تأیید نمودند که ناحیه پروتئینی فوق، همان پروتئین نوترکیب (gp63) می‌باشد. آزمون PNGase-F نیز گلیکوزیله بودن باندهای بیش از ۵۳ کیلودالتونی آن را اثبات نمود. نتیجه‌گیری: گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی تولید شده در مخمر به فرم طبیعی خود بیشتر شباهت دارد، زیرا علاوه بر گلیکوزیله بودن در SDS-PAGE gelatin gel نیز فعال می‌باشد.

### واژه‌های کلیدی: بیان ژن، لیشمانیا، مخمر، الکترون میکروسکوپی، *Pichia pastoris* gp63

#### مقدمه

لیشمانیا، یک انگل داخل سلولی می‌باشد که به صورت مختلف بیش از ۱۲ میلیون نفر را در بیش از ۸۶ کشور جهان مبتلا نموده است و ۳۵ میلیون نفر نیز در معرض ابتلاء به آن هستند [۳]. واکسن‌های زیرواحدی آن با استفاده از مولکول gp63 انگل فوق حداقل در موارد ذیل توانسته است به نوعی از ایمنی و حفاظت در برابر بیماری انگلی فوق منجر شود:

الف - مولکول gp63 انگل فوق، توانایی القاء تک‌آنتی‌سرم اختصاصی (Monospecific) را دارد. آنتی‌سرم فوق به عنوان یک آنتی‌ادهسین (Anti-adhesine) عمل کرده و در تقلیل اتصال انگل به ماکروفاژهای میزبان نقش دارد [۲۱].

ب - تزریق زیرجلدی لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌ژن gp63 طبیعی (تخلیص شده از پروماستیگوت‌های مرحله لگاریتمی رشد) لیشمانیا مکزیکانا توانسته است موش‌های Inbred از نوع CBA/ca را حفاظت نماید. حفاظت حاصله از طریق انتقال سلول‌های T، قابل انتقال به موش‌های سالم نیز بوده است [۱۳].

ج - حفاظت موش‌های BALB/C بعد از واکسیناسیون آنها با باسایل واکسن BCG که گلیکوپروتئین gp63 لیشمانیا ماژور را نیز بیان می‌کرده است در مقابل ابتلاء به انگل فوق [۹].

د - بیان ژن gp63 لیشمانیا ماژور در سویه واکسن

خوراکی سالمونلا تیفی موریوم، نیز توانسته تکثیر سلول‌های T کمکی را به سمت سلول‌های زیر واحد ۱ (Th-1) و در نتیجه به سمت ایمنی و حفاظت هدایت نماید [۲۴، ۲۳، ۱۶].

ه - بی‌ضرری (Safety) واکسن زیرواحدی gp63 و همچنین توانایی آن در ایجاد مصونیت نسبی در مدل حیوانی میمونهای Vervet تأیید گردیده است. مولکول gp63 حداقل برای تشخیص سرولوژیک لیشمانیوز جلدی و احشایی نیز مفید گزارش شده است [۱۱].

بنابراین مولکول gp63 حداقل به عنوان یکی از کاندیداهای تهیه واکسن Subunit لیشمانیا مطرح است. از این رو، در راستای طرح مطالعات مولکولی لیشمانیا و همچنین جهت تولید مولکول فوق به مقدار زیاد و مشابه‌تر به فرم طبیعی آن، تصمیم گرفته شد تا گلیکوپروتئین gp63 را در سلولی یوکاریوت (مشابه‌تر به انگل) بیان نماییم.

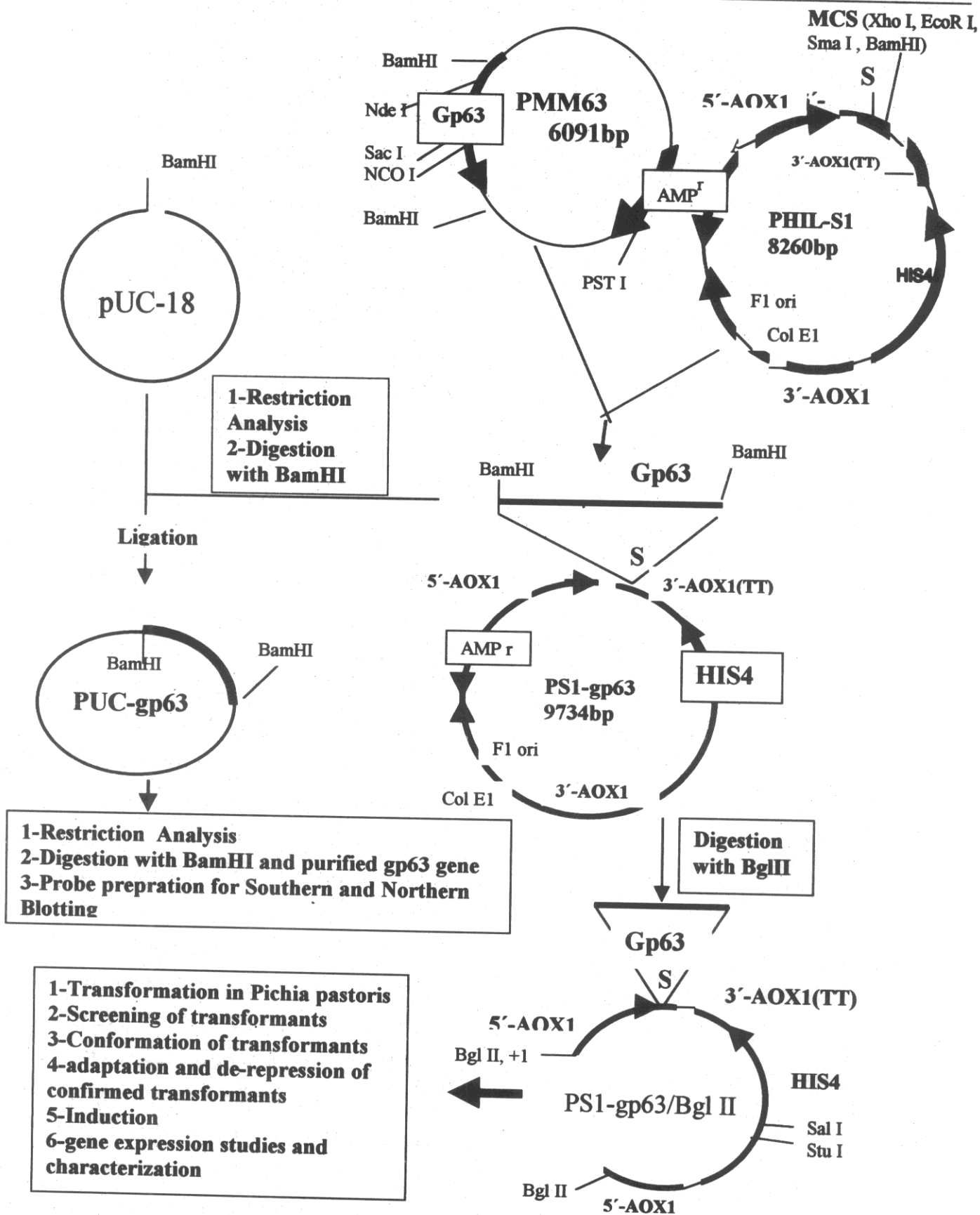
از آنجایی که زمینه ژنتیکی میزبان می‌تواند مواردی از جمله صحت (Authenticity) پروتئین نوترکیب را تحت تأثیر قرار دهد، به گونه‌ای که گاهاً موارد فوق، اهمیت بیشتری از میزان بالای تولید می‌یابد [۱۷]. با توجه به انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای در مخمر به عنوان یک میزبان اوکاریوتی و شباهت این نوع تغییرات در مخمر، به تغییرات پس از ترجمه‌ای انجام شده توسط سلول‌های اوکاریوت عالی‌تر در بسیاری از موارد، مخمر

هدف مورد توجه قرار گرفت.

## مواد و روش کار

شکل ۱، ترسیم شماتیکی از مراحل کلونینگ ژن gp63 در مخمر *Pichia pastoris* است. پس از تأیید ژن تغییر یافته gp63، به گونه‌ای که فقط قسمت بالغ پروتئین مزبور را کد نماید [۵]. با استفاده از Restriction map آن، ژن فوق با آنزیم برش دهنده BamHI بیرون آورده شد و پس از الکتروفورز و استخراج از ژل آگاروز، در ناقل دو میزبانه pHIIL-S1 و همچنین pUC18 کلون شد. پلاسمید نوترکیب حاصل pS1-gp63 نام گذاری شد. پس از خطی و دو قطعه نمودن پلاسمید فوق توسط آنزیم برش دهنده (BglII)، قطعه حاوی ژن از ژل آگاروز با روش فنل-کلروفرم و نیز استفاده از کیت Gene Clean، استخراج گردید. سلول‌های پذیرا (صلاحیت‌دار) از سویه‌های KM71 و GS115 مخمر *Pichia pastoris* تهیه شد و برای ترانسفورماسیون قطعه DNA حاوی ژن به روش‌های شیمیایی نظیر لیتیم کلراید مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲-۳ روز در دمای ۳۰ درجه، ترانسفورمانت‌ها بر روی محیط فاقد هیستیدین انتخاب شدند. DNA کروموزومی آنها استخراج شد. پس از استخراج پلاسمید pUC19+gp63 به مقدار لازم و هضم آن توسط آنزیم BamHI، ژن gp63 کلون شده در آن از ژل LMP جدا شد و سپس مقدار ۱ میکروگرم از آن همراه با یک میکروگرم از DNA غیر نشان‌دار همراه کیت DIG-DNA labeling، به روش Random Priming، با دیگوکسیژنین (DIG) نشان‌دار گردید. کمیت و کیفیت پروب تهیه شده با روش لکه‌گذاری نقطه‌ای (Blot Dot Southern) روی غشاء نایلونی در مقایسه با کنترل‌های کیت تعیین شد. این پروب برای غربال‌گری و همچنین تأیید تداخل ژن gp63 در DNA کروموزومی مخمرهای فوق باروش Southern blotting، مورد استفاده قرار گرفت. PCR با پرایمرهای AOX-1 & 5-3 و پرایمرهای طراحی شده برای داخل ژن (PCR3 و PCR4) نیز بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت.

میزبانی مناسب برای بیان ژن‌ها و تولید پروتئین‌های اوکاریوتی می‌باشد. از طرف دیگر علی‌رغم استفاده وسیع و طولی‌المدت از مخمر ساکارومیسس سرویزیه برای مقاصد مختلف در بیوتکنولوژی، از مخمر ناوایی گرفته و تا این اواخر به عنوان یک میزبان اوکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، وجود مشکلات و محدودیت‌هایی در این راستا مانند هیپرگلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب، محققان را به طور جدی بر آن داشته است که در صدد جایگزین نمودن مخمر فوق با جنس‌ها و یا گونه‌های دیگری از این میزبان اوکاریوتی باشند. در این راستا، چندین گونه مخمر متیلوتروف از جمله *Pichia Kluyveromyces*، *Hansenula polymorpha*، *pastoris*، *Yarrowia Schizosaccharomyces pombe*، *dactis lipolytica* کاندیدا می‌باشند که در بین آنها *Pichia pastoris* بدلیل فقدان اتصالات گلیکانی (1-3) Alpha که می‌تواند به عنوان سوبسترا و یا هسته اولیه هیپرگلیکوزیلیشن عمل نماید [۱۳] همچنین توانایی تولید پروتئین نوترکیب با مقادیر بسیار بالا حتی تا مقدار ۱۲ گرم در لیتر [۷] ارجح می‌باشد. لذا از سال ۱۹۸۷ به عنوان یک میزبان اوکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است. در این پروژه هم به منظور تولید گلیکوپروتئین عمده لیشمانیا (gp63) در شرایطی نزدیک‌تر به شرایط طبیعی (تولید آن)، برآن شدیم که از میزبانی یوکاریوتیک که توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای (translational Post-modifications) همانند سایر سلول‌های اوکاریوتی را داراست، استفاده نماییم تا بتوان اهمیت و نقش احتمالی تغییرات فوق را در تولید کامل این آنتی‌ژن گلیکوپروتئینی، که حداقل به عنوان یک جزء اصلی در طراحی واکسن‌های نسل دوم لیشمانیا و همچنین در طراحی کیت‌های تشخیصی این بیماری مطرح است، مورد مطالعه قرار داد. لذا، کلونینگ و بیان این ژن در مخمر متیلوتروف *Pichia pastoris* ارزیابی خصوصیات مولکول نوترکیب حاصل برای تحقق این

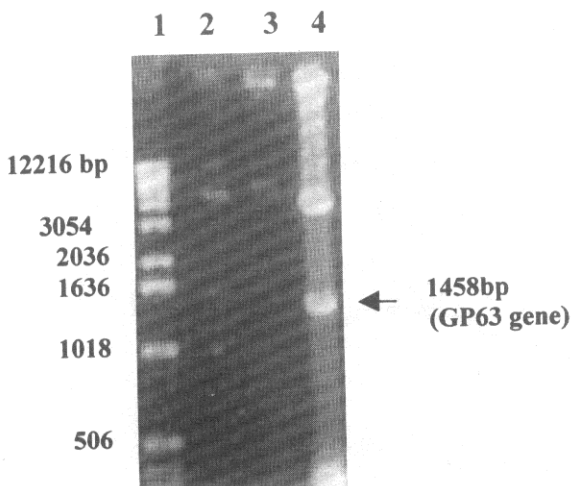


شکل ۱. نمایش شماتیک مراحل کلونینگ ژن gp63 در مخمر *Pichia pastoris*

آن با استفاده از SDS-PAGE gelatin مورد سنجش قرار گرفت. در پایان، آزمون دگلیکوزیلاسیون PNGase-F نیز بر روی مولکول فوق انجام شد.

## نتایج

پس از تأیید ژن تغییر یافته gp63 با ۱۴۵۸bp و بیرون کشیده شدن آن از پلاسمید pPMM63:TEX3 توسط آنزیم BamHI (شکل ۲، ردیف ۴)، به طور هم‌زمان در ناقل دو میزبان PHIL-S1 تأیید شد (شکل ۳) و پلاسمید PUC18 کلون گردید. نتایج حاصل از هضم‌های آنزیمی (Restriction map) پلاسمید نو ترکیب pUC19-gp63 در شکل ۴ آمده است. با توجه به وجود یک سکانس شناسایی و برش در سکانس نوکلئوتیدی این پلاسمید نو ترکیب برای آنزیم‌های SmaI، HindIII، SalI، BamHI و EcoRI هضم پلاسمید مزبور توسط آنزیم‌های فوق منجر به خطی شدن آن می‌گردد. در سایر موارد نیز اندازه قطعات حاصل در مقایسه با مارکر مولکولی 1kb DNA ladder مطابق با موارد مورد انتظار بود.

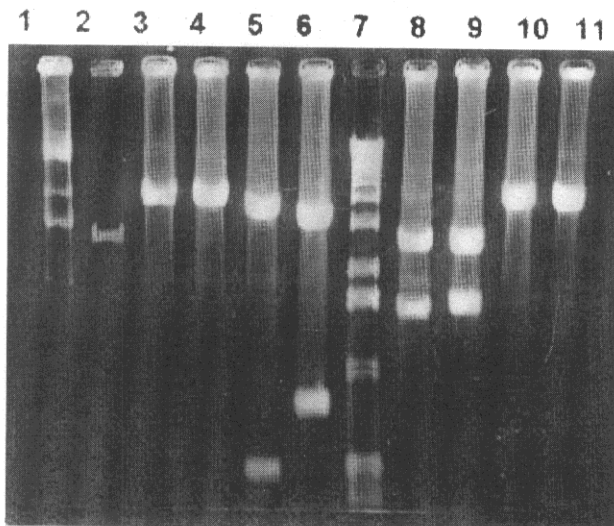


شکل ۲. هضم آنزیمی پلاسمیدهای مختلف pPMM63:TEXT3 با آنزیم BamHI. قطعات DNA با اندازه ۱۴۵۸bp. ژن gp63. از پلاسمیدهای شماره ۹۰ و ۴۲ رها شده است (ردیف‌های ۲ و ۴). ژن gp63 رها شده از پلاسمید شماره ۴۲ (ردیف ۴) برای کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. در ردیف ۱، 1kb DNA Ladder لود شده است.

ترانسفورمانت‌های تأیید شده جهت عادت دادن و سپس القاء، در ابتداء در محیط بافری حاوی حداقل گلیسرول، BMGY، تلقیح شدند. محیط‌های تلقیح شده در انکوباتور ۳۰ درجه همراه با تکان شدید، قرار داده شدند تا این که کدورت آنها به حدود OD<sub>600</sub>=6 برسد. پس از آن سلول‌ها را در شرایط و ظروف استریل سانتیفریژ نموده و سپس آن را به محیط بافری حاوی حداقل متانول BMMY، انتقال داده و مجدداً در همان شرایط انکوبه شد. BMMY همان محیط BMGY می‌باشد، با این تفاوت که به جای ۱٪ گلیسرول، واجد ۰/۵ درصد متانول می‌باشد. حدود یک هفته در آن شرایط می‌ماند. البته متانول نیز به صورت روزانه و بر حسب حجم نهایی محیط القاء در شرایط استریل به آن اضافه می‌گردید. سرانجام سلول‌ها و محیط کشت با سانتیفریژ از همدیگر جدا گردیدند و به رسوب سلولی حاصل Breaking buffer حاوی ممانت‌کننده پروتئاز افزوده شد و پس از شکستن سلول‌ها با سونیکاتور با روش SDS-PAGE، کلون‌های بیان‌کننده ژن فوق در مقایسه با کنترل منفی (مخمر ترانسفورم شده با پلاسمید PHIL-S1 به تنهایی) و همچنین با کنترل مثبت (پروتئین rgp63 تخلیص شده از E.coli) غربال می‌گردیدند. پس از یافتن کلون‌های مثبت با SDS-PAGE، به منظور رد و یا تأیید یافته‌های فوق آزمون S. B. روی آنان انجام گردید. همچنین، برش‌های میکروسکوپی تهیه شده از مخمرهای نو ترکیب تأیید شده با آزمون S. B. (قبل و بعد از القاء)، با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بر علیه gp63، به عنوان آنتی‌بادی اولیه و استفاده از آنتی‌موس کونژوگ با ماده فلئورسانس فلئورسین ایزوتیوسیانات، FITC، مورد آزمون IFA نیز قرار گرفتند. برای تعیین محل تولید پروتئین فوق از میکروسکوپ الکترونی و روش ایمنوالکترون میکروسکوپی (IEM) که تلفیقی از روش‌های سرولوژی و روش‌های الکترون میکروسکوپی می‌باشد، بهره گرفته شد. فعالیت آنزیمی gp63 اثر بازدارنده‌های آنزیمی یدواستامید و EDTA بر فعالیت

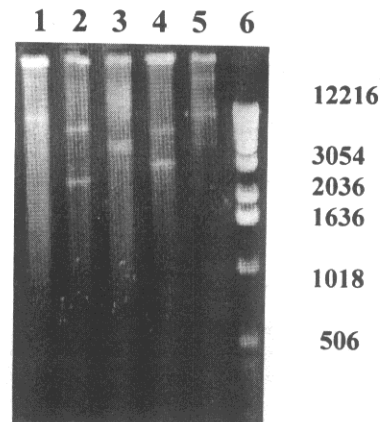
gp63 در جهت صحیح قرار گرفته باشد، قطعات ۶۰۵۸bp و ۳۶۵۷bp حاصل گردد.

کلونینگ ژن gp63 در ناقل دو میزبان PHIL-S1 نیز به همان صورت تأیید گردید. پلاسمیدهای نوترکیبی که پس از هضم با آنزیم BamHI، قطعه DNA با اندازه ۱۴۵۸bp را، رها می‌ساختند، مجدداً توسط آنزیم‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل آنزیمی پلاسمید دو میزبان PHIL-SI به تنهایی هضم گردیدند (شکل ۳).



شکل ۴. تأیید پلاسمید نوترکیب (ردیف pUC19-gp63) توسط هضم‌های آنزیمی، به منظور استفاده از آن در تهیه پروب نشان‌دار. تأیید پلاسمید نوترکیب از طریق هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های BamHI (ردیف ۳)، EcoRI (ردیف ۴)، SmaI (ردیف ۵)، PstI (ردیف ۶) و BamHI & HindIII (ردیف ۸)، EcoRI & HindIII (ردیف ۹)، Sall (ردیف ۱۱). ضمناً در ردیف ۷، ۱Kb DNA Ladder و در ردیف ۱ پلاسمید pUC19 Uncut و در ردیف ۲ pUC19/linear بارگیری شده‌است.

در نهایت پلاسمید نوترکیبی برای ترانسفورمیشن در مخمر انتخاب گردید که علاوه بر تأیید وجود ژن gp63 در آن، قرار گرفتن ژن مزبور در جهت صحیح نیز در آن تأیید شد. پلاسمیدهای نوترکیب فوق توسط آنزیم برش دهنده BglII هضم گردید. با توجه به وجود سکانس مورد شناسایی برای آنزیم فوق در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۲ و ۵۳۹۴ پلاسمید فوق، دو قطعه DNA با اندازه‌های ۶۸۴۷ جفت باز (حاوی ژن gp63) و ۲۸۶۸ جفت باز ایجاد شد. پس از تأیید هضم آنزیمی فوق، و الکتروفورز آن در ژل آگاروز، و انجام ترانسفورماسیون با قطعه ۶۸۴۷ جفت بازی، ترانسفورمانت‌های HIS+ روی

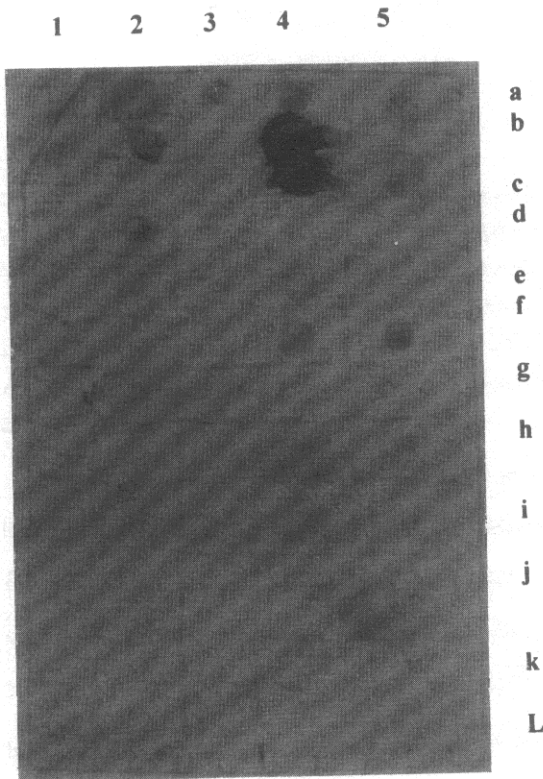


شکل ۳. تأیید پلاسمید دو میزبان PHIL-S1 از طریق هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های BamHI (ردیف ۱ از چپ به راست)، BglIII (ردیف ۲)، EcoRV (ردیف ۳)، PvuII (ردیف ۴). ضمناً در ردیف ۶ DNA 1Kb Ladder و در ردیف ۵ پلاسمید Uncut بارگیری شده‌است. موارد مشاهده شده در مقایسه با شاخص وزن مولکولی DNA ladder 1Kb DNA (ردیف ۶) مبین آن است که قطعات DNA حاصله در موارد ذکر شده کاملاً با موارد مورد انتظار مطابقت کامل دارد.

آنزیم‌های مورد استفاده برای این موضوع به گونه‌ای انتخاب گردیدند که دارای محل برش در سکانس ژن gp63 و همچنین در سکانس پلاسمید فوق باشند. پس از مقایسه اندازه قطعات حاصل با مارکر مولکولی 1kb DNA Ladder مناسب‌ترین پلاسمید انتخاب گردید. برای حصول اطمینان از قرار گرفتن ژن gp63 در پلاسمید دو میزبان PHIL-SI در جهت صحیح (پلاسمید نوترکیب PHIL-SI + gp63)، پلاسمیدهای مزبور مجدداً با آنزیم‌های NdeI و NcoI هضم گردیدند.

با توجه به وجود سکانس مورد شناسایی و برش آنزیم NdeI در موقعیت نوکلئوتیدی شماره ۵۶۲۹ در سکانس پلاسمید دو میزبان PHIL-S1 و همچنین در موقعیت نوکلئوتیدی شماره ۶ سکانس تغییر یافته ژن gp63 انتظار بود که از هضم پلاسمید نوترکیب فوق (PHIL-SI-gp63) با آنزیم مزبور، در صورتی که ژن

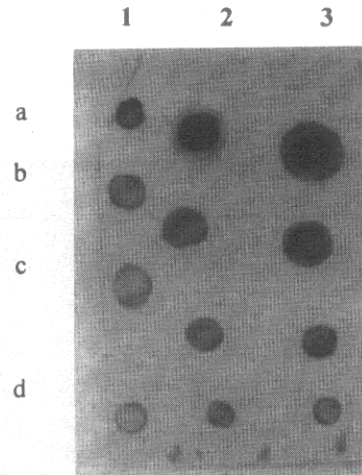
c, Puc19-gp63 و pHIL-SI-gp63 می باشند که با شدت بیشتری ظاهر گردیده اند. پلاسمیدهای فوق بدون ژن gp63 نیز به عنوان کنترل منفی در ستون ۵ به ترتیب در ردیف های g و h گرفته اند. در ستون ۲ ردیف b, DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۶، ردیف c, DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۸ (کنترل منفی)، و ردیف d, DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۱۱۰ می باشد. در ستون ۴ ردیف a, DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۵ می باشد. در ستون ۵، ردیف f, DNA کروموزومی متعلق به کلون GS-I می باشد.



شکل ۶. Dot Southern Blot Hybridization برای غربالگری اولیه کلونهای حاوی ژن gp63. مقدار DNA در هر لکه (DOT) معادل ۲۰ نانوگرم می باشد. نتیجه واکنشگری DNA کروموزومی استخراج شده از ترانسفورمانتهای مختلف، در مقایسه بالکهای (Dots) ستون ۴ ردیفهای b و c به عنوان کنترل مثبت و ستون ۵ ردیفهای g و i به عنوان کنترل منفی ملاحظه می گردد.

پس از شناسایی کلونهای حاوی ژن در این مرحله، DNA کروموزومی آنها استخراج شد و با آنزیم BamHI هضم گردید (شکل ۷-الف). پس از الکتروفورز، به نایلون ممبران انتقال یافته و با استفاده از پروب نشاندار

محیط فاقد هیستیدین انتخاب شدند. DNA کروموزومی آنها استخراج گردید و پس از کنترل غلظت آنها، با استفاده از پروب نشاندار تهیه شده (شکل ۵)، مورد آزمون غربالگری Dot Southern blotting قرار گرفتند (شکل ۶).

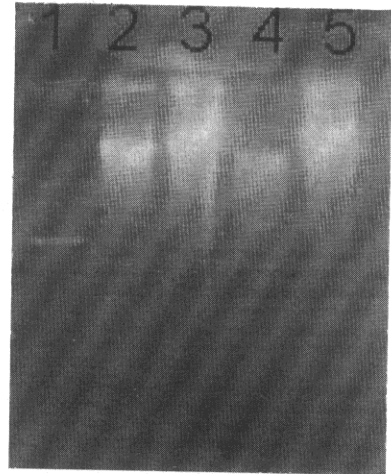


شکل ۵. تخمین کمی و ارزیابی کیفی پروب نشاندار تهیه شده در مقایسه با DNA standard labeled controls. مقدار DNA در هر لکه (DOT). ردیف a یک میکرولیتر (معادل ۵ نانوگرم) می باشد. مقدار DNA در ردیف b، ۱/۱۰ ردیف a می باشد (رقت ۱:۱۰). مقدار DNA در ردیف c، ۱/۱۰۰ ردیف b می باشد (رقت ۱:۱۰۰). مقدار DNA در ردیف d، ۱/۱۰۰۰ ردیف c می باشد (رقت ۱:۱۰۰۰).  
۱- Labeled DNA of Kit - ۲- Prepared prob from gp63 Gene - ۳- Unlabeled DNA of Kit

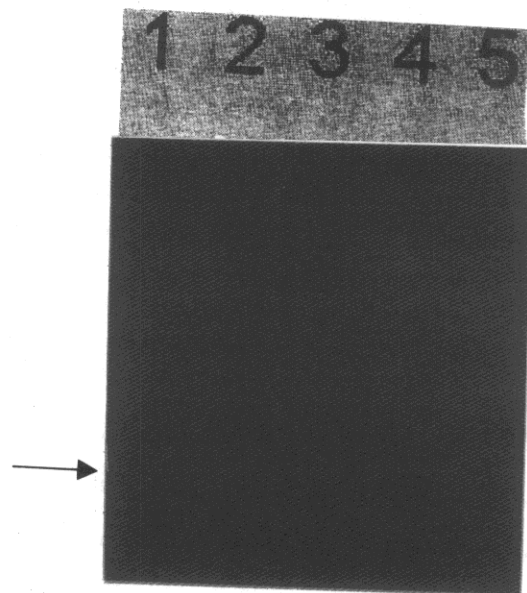
در ستون ۱ شکل ۵، رقت های مختلف پروب (کاوشگر) نشان دار تهیه شده از ژن gp63 می باشد که الگوی آن از پلاسمید Puc19-gp63 (شکل ۴) جدا شده بود. شدت و ضعف و یا به عبارتی درجه واکنشگری هر یک از لکه ها (DOT) در مقایسه با کنترل های کیت (شکل ۵، ستون های ۲ و ۳) مشاهده می شود. همانگونه که ملاحظه می گردد، کاوشگر تهیه شده حتی تا رقت ۱:۱۰۰۰ از کیفیت مطلوبی برای واکنش هیبریدیزاسیون برخوردار بود.

شکل ۶ دو رگه گیری را با روش لکه گذاری نقطه ای با DNA-پروپ تهیه شده از روی ژن gp63 (با روش Random priming) نشان می دهد. ستون های ۲ و ۴ ردیف های d و b به ترتیب DNA جایگزین شده را نشان می دهند. مقدار DNA در هر لکه (Dot) معادل ۲۰ نانوگرم می باشد. Dot های ستون ۴ ردیف های b و

الف



ب



شکل ۷. نتایج حاصل از هضم آنزیمی DNA کروموزومی مخمرهای نو ترکیب با آنزیم BamHI (قسمت الف) و سپس انجام سادرن بلاتینگ با آنها (قسمت ب). هدف از انجام این آزمایش، تأیید تداخل ژن gp63 در DNA کروموزومی مخمر بود.

۱ - gp63 gene، ۲ - DNA کروموزومی مخمر فاقد ژن gp63 کلون شماره ۲۸ به عنوان کنترل منفی (-) CTRL، ۳، ۴، ۵ DNA کروموزومی مخمرهای مظنون به داشتن ژن gp63، کلونهای شماره ۲۴، ۲۵، و ۲۶

تهیه شده (از ژن gp63) آزمون Southern blotting روی DNAهای کروموزومی فوق انجام شد (شکل ۷ - ب).

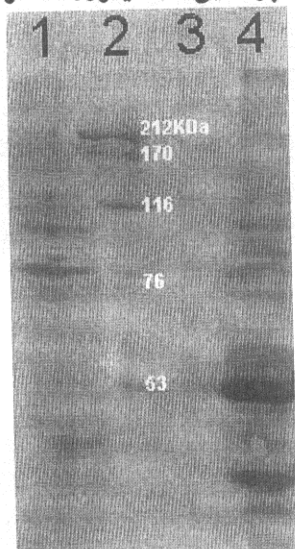
همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد مشاهده

باندی با اندازه مشابه باند مشاهده شده در مورد کنترل مثبت (ژن gp63) در ردیف ۵ در مورد DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۶ (ردیف ۵) و عدم مشاهده باند فوق در مورد کنترل منفی (ردیف ۲) دال بر ورود ژن gp63 در DNA کروموزومی مخمر می‌باشد.

شکل ۷-ب، Southern blot hybridization را با DNA-probe نشان می‌دهد. ستون ۱، DNA (ژن gp63) حاصل از برش پلاسمید نو ترکیب pHIL-S1-gp63 متعلق به کلون شماره ۲۶ با آنزیم BamHI (ستون ۵)، و ستون‌های دیگر DNA کروموزومی هضم شده متعلق به کلون شماره ۲۸ (ستون ۲) و سایرین را نشان می‌دهد. هیبریدیزاسیون فقط با DNA موجود در ستون‌های ۱ و ۵ متعلق به ژن gp63 و DNA کروموزومی کلون ۲۶ مخمر انجام شد. مضافاً به این که، DNA probe مذکور در همان منطقه (اندازه مولکولی) که با کنترل مثبت (ژن gp63) هیبرید شده است با DNA کروموزومی مخمر متعلق به کلونی شماره ۲۶ نیز هیبرید شده است. اما با DNA ستون‌های دیگر که مربوط به کلون‌های دیگر است پروب مذکور هیبرید نشده است. این پدیده مبین تداخل (Integration) ژن در DNA کروموزومی کلون شماره ۲۶ می‌باشد. ناگفته نماند که DNAهای کروموزومی مورد استفاده برای این منظور با استفاده از خرده شیشه استخراج شده‌اند و بنابراین مشاهده باندهای بیشتر DNA حاوی ژن gp63 هم، دور از انتظار نخواهد بود. PCR با پرایمرهای 3- & 5-AOX-1 و اما با DNA ستون‌های دیگر که مربوط به کلون‌های دیگر است پروب مذکور هیبرید نشده است. این پدیده مبین تداخل (integration) ژن در DNA کروموزومی کلون شماره ۲۶ می‌باشد. ناگفته نماند که DNAهای کروموزومی مورد استفاده برای این منظور با استفاده از خرده شیشه استخراج شده‌اند و بنابراین مشاهده باندهای بیشتر DNA حاوی ژن gp63 هم، دور از انتظار خواهد بود. PCR با پرایمرهای 3- & 5-AOX-1 و پرایمرهای طراحی شده برای داخل ژن (PCR3 و PCR4) نیز تداخل ژن gp63 را در DNA کروموزومی مخمر (کلون



استفاده شده برای وسترن بلا تینگ، و آنتی بادی نشان دار شده با FITC و انجام آزمون IFA بر روی آنان (شکل ۸)، فلورسانس مشاهده شده در نمونه های مثبت قبلی و منطبق بر همان نواحی مشاهده شده در آزمون های قبلی (شکل ۹ - الف) و عدم رؤیت آن در نمونه قبل از القاء و نمونه فاقد ژن حتی پس از القاء (شکل ۹ - ب) مبین بیان ژن و تأیید وجود پروتئین در سیتوزول سلول ترانسفورم شده می باشد.



شکل ۸. نتایج الکتروفورز مایع رویی حاصل از شکسته شدن سلول ها مخمر القاء شده در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. مشاهده باندهای پروتئینی هم اندازه و بزرگتر (ردیف ۴) از rgp63 تخلیص شده از E.coli (ردیف ۳) و عدم رویت آنها در مایع رویی حاصل از شکسته شدن سلول های کنترل منفی بعد از القاء (ردیف ۱) تأیید کننده بیان ژن gp63 در مخمرهای متعلق به کلون شماره ۲۶ می باشد. ردیف ۲ سایز مارکر پروتئینی HMW می باشد.

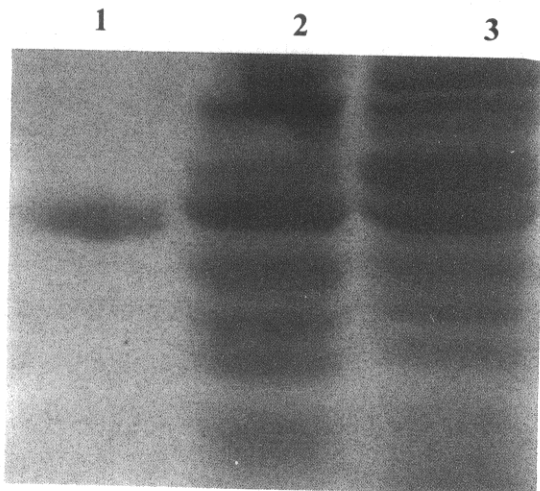
آزمون سنجش فعالیت آنزیمی در SDS-PAGE

gelatin gel فعال بودن متالوپروتئیناز نو ترکیب را نیز نشان داد (شکل ۱۰). همان گونه که مشاهده می گردد، نواحی هضم شده از ژل فوق توسط نمونه های متعلق به ترانسفورمنت شماره ۲۶ (ردیف های ۲ و ۳) حاوی مقادیر ۶۰ و ۱۰ میکرو لیتر از مایع رویی (به ترتیب) در منطقه ای مشابه ناحیه هضم شده توسط ۶۰ و ۱۰ میکرو لیتر از Crud lysate انگل (ردیف های ۴ و ۵) از نظر اندازه (وزن مولکولی) دال بر فعالیت آنزیمی مولکولی rgp63 تولید شده توسط مخمر می باشد، زیرا رنگ آمیزی نواحی هضم شده توسط کوماسی بلو امکان پذیر نمی باشد. عدم فعالیت آنزیمی در نمونه ای که قبلاً فعالیت داشته است، پس از مجاورت آن با یدواستامید و

تأیید کردند. پس از کشت کلون های مزبور در محیط حاوی گلیسرول و سپس انتقال آنها به محیط حاوی متانول، محیط کشت و القاء و همچنین رسوب سلولی آنها از جهت تولید پروتئین نو ترکیب rgp63 با ژل SDS-PAGE، ۱۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در محیط کشت و القاء آنها، حتی پس از تغلیظ با TCA و یا فیلترهای آمیکون پروتئینی هم اندازه و یا بزرگتر از rgp63 تخلیص شده از E.coli، که با آنتی بادی اختصاصی هم واکنش نماید، مشاهده نگردید. ولی در مایع رویی حاصل از شکسته شدن رسوب سلول های القاء شده باندهای پروتئینی هم اندازه و سنگین تر (شکل ۸، ردیف ۴) از پروتئین نو ترکیب rgp63 تخلیص شده از E.coli (شکل ۸، ردیف ۳)، مشاهده گردید. پروتئین فوق در نمونه کنترل منفی که با پلاسמיד pHIL-S1 به تنهایی ترانسفورم شده بود، حتی پس از القاء مشاهده نگردید (شکل ۸، ردیف ۱). عدم وجود باند پروتئینی مزبور در نمونه های رشد یافته در محیط حاوی گلیسرول به تنهایی (همان نمونه ها) به عنوان نمونه های قبل از القاء بیانگر آن است که القاء با متانول سبب تولید پروتئین فوق گردیده است. این مشاهده با موارد مورد انتظار، یعنی؛ کلون نمودن ژن gp63 تحت کنترل پروموتور ژن الکل اکسیداز-۱ مخمر مطابقت کامل دارد. این مشاهده با موارد مورد انتظار، یعنی؛ کلون نمودن ژن gp63 تحت کنترل پروموتور ژن الکل اکسیداز-۱ مخمر مطابقت کامل دارد. وسترن بلا تینگ وجود دو باند پروتئینی با قابلیت واکنش گری با آنتی بادی اختصاصی و در اندازه های مشابه و سنگین تر از پروتئین نو ترکیب بیان شده در E.coli و عدم وجود باندهای پروتئینی مشابه در نمونه کنترل منفی و همچنین نتایج آزمون ایمونوالکترون میکروسکوپی دال بر تأیید تولید پروتئین نو ترکیب فوق توسط مخمرهای متعلق به کلون های یاد شده می باشد.

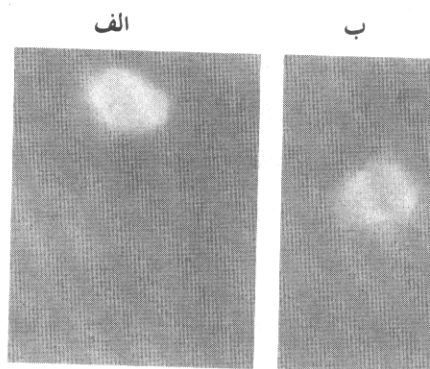
پس از القاء مجدد نمونه های فوق و تهیه رسوب سلولی آنها و تثبیت آن با گلو تار آلدهید و تتر ااکسید اسمیم، برش های تهیه شده از آنها بر روی پولک (گرید) قرار گرفته و با استفاده از همان آنتی بادی اختصاصی

پروتئینی مورد نظر که سنگین تر (شکل ۱۱، ردیف ۳) از rgp63 تخلیص شده از E.coli (شکل ۱۱، ردیف ۱) بودند، پس از مجاورت با آندوگلیکوزیداز F، کاهش یافت (شکل ۱۱، ردیف ۲).



شکل ۱۱. کاهش وزن موهکولی تعدادی از باندهای پروتئینی موجود در مایع رویی حاصل از شکسته شدن سلول‌های مخمر حاوی ژن القاء شده، پس از مجاورت آن با آندوگلیکوزیداز F. 3=26/AI2, 2=26/AI+PNGF, 1=rgp63

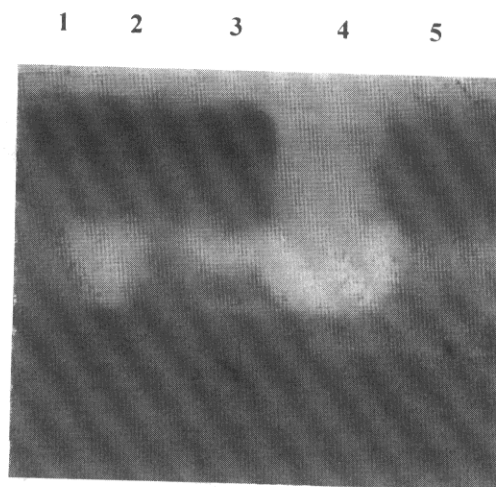
EDTA دال بر حساس بودن rgp63 بیان شده در مخمر نو ترکیب در مقابل مواد ذکر شده با غلظت‌های فوق می‌باشد.



شکل ۹. تأیید بیان ژن gp63 توسط مخمر ترانسفورمنت شماره ۲۶ با روش ایمونوفلورسانس. مخمر واجد ژن gp63 (الف) و مخمر فاقد ژن gp63 (ب).

## بحث

همان‌گونه که در ژل 12% SDS-PAGE مشاهده گردید (شکل ۸-الف) و در وسترن، IEM و IFA هم تأیید شد (شکل ۸-ب و ۹) وجود دو باند پروتئینی هم‌اندازه و بزرگتر از مولکول rgp63 بیان شده در E.coli، مبین انجام گلیکوزیلاسیون بر روی بیان پروتئین فوق در میزبان اوکاریوتی P.pastoris می‌باشد. با توجه به مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و همچنین اندازه‌گیری‌ها با دانسیتومتر، تولید پروتئین فوق زیاد (Overexpression) می‌باشد. از این رو، به طور طبیعی انتظار داریم که بخشی از آن گلیکوزیله نشده باشد. بنابراین هم‌اندازه با پروتئین بیان شده در E.coli باشد. با توجه به وزن مولکولی gp63 طبیعی که در حدود ۶۳ کیلودالتون می‌باشد و همچنین وجود سه محل N-گلیکوزیلیشن در ژن فوق، اگر علاوه بر دو باند فوق دو باند دیگر هم، با اندازه تقریبی حد فاصل ۵۲ تا ۶۳ کیلودالتون دیده شود براساس تعداد محل‌های گلیکوزیله



شکل ۱۰. ارزیابی فعالیت rgp63 بیان شده توسط مخمر نو ترکیب در P.pastoris SDS-PAGE Gelatin Gel. 1=28/AI, CTRL(-), 2 & 3=60 & 10 uL of 26/AI 4=&5= 60 & 10 uL of Crud lysate of L.major

نتایج آزمون دگلیکوزیلاسیون PNGase-F نیز نشان داد که گلیکوزیلاسیون باعث افزایش وزن مولکولی باندهای بیش از ۵۳ کیلودالتون متالوپروتئیناز نو ترکیب می‌باشد. زیرا وزن مولکولی (MV) تعدادی از باندهای پروتئینی موجود در مایع رویی حاصل از شکست مخمرهای حاوی ژن پس از القاء، از جمله باندهای

فرم دگلیکوزیله hIL-17 می باشد. سکانس ۱۰ اسید آمینه اول هر دو باند پروتئینی فوق (از N ترمینال آنها) نشان داد که این اسیدهای آمینه در هر دو باند فوق یک سان می باشند. هضم hIL-17 با PNGase F منجر به حذف باند ۲۰KDa و افزایش غلظت باند ۱۶KDa گردید. بنابراین، افزایش وزن مولکولی آن نتیجه N-گلیکوزیلاسیون پروتئین فوق می باشد [۱۴].

- گاهی پردازش ناکامل سیگنال پپتید نیز می تواند منجر به تولید باندهای پروتئینی سنگین تر از همتهای طبیعی آنان گردد.

تولید دو باند (Wheat lipid transfer protein) WLTP در اندازه های ۱۴KDa و ۱۰KDa، باند ۱۴KDa (۱۳۶۸۰Da) مربوط به پروتئین پردازش نشده است که بخش هایی از سکانس سیگنالی اسید فسفاتاز و همچنین سکانس سنتتیک رهبر (Leader) که در داخل Construct جاسازی شده، بریده نشده و بنابراین کد شده بود [۷].

P. pastoris- ترانسفورم شده با pHIL-D2prepro alfa-S (حاوی cDNA سم سلولی آلفا- سارسین با سکانس Leader peptide خود ژن) و همچنین ترانسفورم شده با pHIL-S1prepro alfa-S (حاوی cDNA سم سلولی آلفا- سارسین ممزوج شده با سکانس سیگنال ترشعی اسید فسفاتاز PHO1 مخمر)، هر دو فرم کامل Mature و Pro-alfa-sarcin را ترشح نمودند. وجود Pro-alfa-sarcin در محیط خارج سلولی مخمر ناشی از تشخیص ناکارآمد توسط یک آندوپیتیداز مشابه پروتئین Kex2 مشهور، بوده است [۱۵].

تجزیه زیستی پروتئین فوق تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله پروتئازها که مشکل لاینحلی را در کار با مخمر می نمایند ممکن است منجر به رؤیت باندهای کوچکتر از ۵۲ کیلودالتونی نیز منتهی شود.

بنابراین، تولید پروتئین هترولوگ با اندازه کوچکتر از فرم دگلیکوزیله نیز همانند آنچه که در واکنش با آنتی بادی شماره ۲۳۵ دیده شد نیز مقدور می باشد. به ذکر موردی در این خصوص بسنده می گردد، با استفاده از سویه معیوب از نظر تولید کربوکسی پپتیداز y (ژن pep4)

شده و حجم گلیکوزیلاسیون دور از انتظار نخواهد بود. بدیهی است که اگر هیپرگلیکوزیلیشن هم اتفاق افتد باندهای پروتئینی بزرگتر از ۶۳ کیلودالتونی هم با توجه به حجم گلیکوزیلیشن دیده خواهد شد. بنابراین، بیان ژن gp63 در مخمر P. pastoris به صورت بیش از یک باند پروتئینی در اندازه های ۵۳ kDa (معادل فرم غیرگلیکوزیله rgp63) و سنگین تر دور از انتظار نبوده است. نتایج این پژوهش با بیان گلیکوپروتئین های ذیل در P. pastoris قابل مقایسه می باشد:

- تولید پروتئین دومن خارج سلولی TGF-Beta soluble RII (یک ممانعت کننده TGF-Beta و دارای سه محل N-گلیکوزیلاسیون) به صورت یک باند ۲۵ همراه با یک اسمیر ۶۰ KDa. باندهای پروتئینی فوق پس از مجاورت با آندوگلیکوزیداز F، به یک تک باند ۲۲KDa تبدیل شدند [۱۲].

- بیان شدن ژن مربوط به دومن خارج سلولی HTF (Human tissue factor) در سویه SMD1168 مخمر P. pastoris (معیوب از نظر تولید پروتئاز B) منجر به تولید سه باند پروتئینی متمایز با اندازه های ۳۷-۵۴ KDa در SDS-PAGE گردید. دومن خارج سلولی hTF دارای ۲۱۹ اسید آمینه، دو باند دی سولفیدی و سه محل برای N-گلیکوزیلاسیون می باشد. هر سه باند فوق توسط یک آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی تشخیص داده شدند. قرارگیری باندهای فوق در معرض Endoglycosidase H نشان داد که سه باند فوق نتیجه ای از گلیکوزیلاسیون افتراقی این مولکول هستند، زیرا مجاور کردن سه باند فوق با Endo H منجر به تولید یک باند با MW=۳۳KDa گردید [۱].

- پروتئین E در ویروس Dengue تیپ ۱ (DEN-1)، الگوی مخلوطی از گلیکوزیلاسیون دو باند آنتی ژنیک 65 KDa (مولکول کامل پروتئین E ویروس dengue تیپ ۱، DEN-1) و 50 kda را به نمایش گذارد [۱۰].

- مخمر نو ترکیب (واجد ژن hIL-17) دو باند پروتئینی با اوزان ۲۰KDa فرم گلیکوزیله و باند ۱۶KDa

پروتئین‌های هترولوگ بیان شده توسط مخمر، استفاده از روش IEM (Immune-electron microscopy) نیز برای تأیید بیان و یا عدم بیان ژن خارجی کلون شده در مخمر نو ترکیب و همچنین تعیین جایگاه سلولی تجمع پروتئین فوق یک روش پذیرفته شده است. برای مثال، پس از القاء با متانول، ایمونوبلات وجود یک باند آنتی ژنتیک اختصاصی ۶۵KDa را در محیط کشت GS115/CprME به اثبات رساند. این وزن مولکولی برای پروتئین E گلیکوزیله و پردازش شده بطور صحیح مطابقت دارد. برعکس، هیچ پروتئین E نو ترکیب، DEN-1، در محیط کشت علی‌رغم تکرار غربال‌گری مشاهده نگردید. هضم پروتئولیتیکی وسیع پروتئین E ویروس DEN-1 بیان شده و همچنین پروتئین E ویروس JEV (ویروس آنسفالیت ژاپنی) در مخمر توسط فعالیت یک پروتئاز ناشناخته مخمری مشاهده شد [۲۲]. با توجه به رؤیت دو باند کاملاً مجزا در وسترن با آنتی بادی اختصاصی، هم اندازه با پروتئین بیان شده در E.coli و بزرگ‌تر از آن (شکل ۹) دال بر تولید پروتئین فوق به دو فرم گلیکوزیله کامل و غیرگلیکوزیله می‌باشد. نتایج آزمون دگلیکوزیلاسیون نیز مبین این اتفاق می‌باشد (شکل ۱۱).

### تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق، توسط سازمان‌های TDR، بانک جهانی، UNDP و گرانته شماره TDR ID#961011 و نیز نهاد ریاست جمهوری اسلامی ایران تأمین است. از تمام همکاران و پرسنل بخش بیوتکنولوژی، به ویژه آقای دکتر حبیبی، آقای دکتر معین، آقای دکتر عزیزی، آقای عادل، از همکاران بخش ایمنولوژی آقای دکتر خبیری، آقای دکتر میرجلیلی، خانم دکتر ملک‌زاده، همکاران بخش میکروسکوپ الکترونی به ویژه آقای سیدی پور و سرکار خانم طائب با حمایت‌های عملی خود امکان انجام این تحقیق را فراهم نموده‌اند، تقدیر و تشکر می‌شود.

سویه SMD1168 [۱۸] و همچنین استفاده از وکتور ترشحی با سیگنال پپتید آلفا- فاکتور (پلاسمید دو میزبان pIC9) برای تولید آندوستاتین (انسانی و موشی) علاوه بر تولید ملکول کامل، ملکول‌های پروتئینی کوتاه شده (دو باند) بویژه از ناحیه کربوکسیل پروتئین نیز تولید شد [۴]. بنابراین، ناپایداری gp63 تولید شده توسط مخمر *P. pastoris* و همچنین مشاهده باند پروتئین کوتاه شده آن در وسترن بلا تینگ با منوکلونال آنتی بادی اختصاصی ۲۳۵ با توجه به تجربیات اندیشمندی چون Boehme و همکارانش نیز کاملاً طبیعی و در حد انتظار می‌باشد، بویژه آن که در این پروژه هم کارایی سیگنال پپتید مخمری استفاده شده در وکتور دو میزبان PHIL-S1 (اسید فسفاتاز PHO1)، کمتر از کارایی سیگنال پپتید مخمری آلفا- فاکتور می‌باشد، به گونه‌ای که سیگنال پپتید PHO1 برای اهداف مکان یابی پروتئین‌های نو ترکیب نیز کاربرد دارد [۱۸] و هم میزبان مورد استفاده توسط آنها از تولید کربوکسی پپتیداز y (ژن pep4) معیوب بود. در این مطالعه از سویه‌های KM71 و GS115 مخمر *P. pastoris* به عنوان میزبان برای بیان ژن gp63 استفاده شد.

در تجربه دیگری با وجود استفاده از سویه معیوب از نظر تولید کربوکسی پپتیداز y (ژن pep4) سویه [SMD1168] [۱۹] و همچنین استفاده از وکتور ترشحی با سیگنال پپتید آلفا- فاکتور، پلاسمید دو میزبان pIC9، باز در تولید ملکول کامل آندوستاتین (انسانی و موشی) مشکل داشتند به گونه‌ای که علاوه بر تولید ملکول کامل این پروتئین، ملکول‌های پروتئینی کوتاه شده (دو باند) بویژه از ناحیه کربوکسیل پروتئین نیز تولید می‌شد. تلاش آنها برای حذف باندهای پروتئینی کوتاه شده (و یا به عبارت دیگر فقط برای تولید پروتئین کامل) حتی با تخریب ژن KEX1 در مخمر *P. pastoris* و بهینه سازی شرایط بیان ژن آندوستاتین با موفقیت کامل همراه نبود، بلکه حداکثر توانستند نسبت این دو باند کوتاه شده را نسبت به باند اصلی تقلیل دهند [۴].

با توجه به نقش پروتئازهای مخمری در تخریب

## منابع

- High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene, *Biotechnology*, 9 (1991a) 455-459.
- [9] Connell, N.D., Medina-Acesta, E., McMaster, R. and Bloom, B.R., Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille calmette-Gurein expressing the leishmania surface proteinase gp63, *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*., 90 (1993) 11473-11477.
- [10] Fonsacs, B.A.L., Pincus, S., Shope, R. E., Paoletti, E. and Mason, P. W., Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralising antibodies in mice, *Vaccine*, 12 (1994) 279-285.
- [11] Giecheru, M.M. and Olobo, J.O., Evaluation of recombinat Gp63, The major Leishmania surface glycoprotein, as a diagnostic molecule for Leishmaniasis in vervet monkeys, *Acta Trop.*, 58 (1994) 45-348.
- [12] Harrie, L.G., Glansbeek, H. M., Van B., Elly, L. Vitters, P. M. Vander, K. and Wim, B., E xpression of recombinant human soluble type II transforming growth factor- $\beta$  receptor in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*: two powerful systems to express a protent inhibitor of transforming growth factor- $\beta$ , *Protein Express, Purif.*, 12(1998) 201-207.
- [13] Hyun, A.H., Kang, Jung-Hoon Sohn; Eui-Sungchoi; Bong Hyun Chung; Meyongng-Hee, yu ANA Sang-ki Rhee;
- [1] Abdulaev, N.G., Popp, M.P., Smith, W. C. and Ridge, K. D., Functional expression of bovin opsin in the methylotrophic yeas; *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif.*, 10 (1997) 61-69.
- [2] Angela, J., Austin, C. E. J. and Ginovan H. Production of human tissue factor using the *Pichia pastoris* expression system, *Protein Express. Purif.*, 13 (1998) 136-142.
- [3] Ashford, R.W., Desjeuc, P. and Deradt, P., Estimation of population at risk infection with Leishmaniasis, *Parasitol. Today*, 8(1992) 104-105.
- [4] Boehm, T., Pirie-Shepherd, S., Trinh, L. B., Shiloach, J. and Folkman, J., Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin, *Yeast* 15 (1999) 563-572.
- [5] Bordier, C. The promastigote surface of *Leishmania*, *Parasitol. Today*, 2(1987) 473-479.
- [6] Botton, L.L., Reiner, N.E. and McMaster, W.R., Modification Gp63 genes from divers species of *Leishmania* for expression of recombinant protein at high levels in *E.coli*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 44 (1991) 213-224.
- [7] Cecile, K., Fereferic de Lamotte, G., Francois, G., Guy Moulin, H. B., Philippe, J. and Marie-Francoise, G., High-level secretion of a wheat lipidTransfer protein in *Pichia pastoris*, *Protein Express. Purif.*, 13 (1998) 73-82.
- [8] Clare J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A.,

- [20] Russell, D. G. and Alexander, J., Effective immunization against cutaneous Leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes, *J. Immunol.*, 140 (1988) 1274-1279.
- [21] Russell, D.G. and Wilhelm, H., The involvement of glycoprotein (gp63) of *Leishmania promastigotes* in attachment to macrophages, *J. Immunol.*, 136(1986) 2613-2620.
- [22] Sugrue, R. J., Fu, J., Howe, J., and Chan, Y. C., Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles, 78 (1997) 1861-1866.
- [23] Xu, D., Ssorley, M., Chatfield, S.J., Dougani, S.N. and Liew, F.Y., Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/ C mice by Gp63 delivered orally in attenuated *salmonella typhimurium* (ArOA-, ArOD-), *Immunology*, 85 (1995) 1-7.
- [24] Yang, D.M., Fairweather, N., Botton L.L., McMaster, W.R., Kahi, L.P., Liew, F.Y., *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing major *Leishmania* surface protein (gp63) preferentially induces T-helper 1 cells and protective immunity against Leishmaniasis, *J. Immunol.*, 145 (1990) 2281-2285.
- glycosylation of human  $\alpha 1$ -antitrypsin in *saccharomyces cervisiae* and methylotrophic yeasts, *Yeast*, 14 (1998) 371-381.
- [14] Kevin, M., Murphy, J.R., Gagne, P., Pazmany, C. and Moody, M. D., Expression of human interleukin-17 in *Pichia pastoris*: purification and characterization, *Protein Express. Purif.*, 12 (1998)208-214.
- [15] Martinez-Ruiz, A., Martinez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheno, T. M., Onaderra, M., Lopez-Otin, N., and Gavilanes, J. G., Secretion of recombinant pro and mature alpha-sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for mutation, *Protein Express. Purif.*, 12 (1998) 315-322.
- [16] Mcs and sorley S.J., XU, D., Liew, F. Y., Vaccine efficacy of salmonella strains expressing glycoprotein 63 with different promoters, *Infec. Immunity*, 65 (1997) 171-178.
- [17] Michael, R., Christopher, E. and Bussineau, B., Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7 (1996) 525-530.
- [18] Najmoutin, G., Abdulaev, N. G. and Kevin, D. R., Heterologous expression of bovin opsin in *Pichia pastoris*, *Methods Enzymol.*, 315 (2000)3-11.
- [19] Ohi, H., Cregg, J. M., Verdick, T.S. and Raschke, W. C., Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*, *Biotechnology*, 11 (1996) 905-910.