Archive of SID

Pharmaceutical Sciences, 2010, Vol.15, No4, Page 353- 359

علوم داروئی، ۱۳۸۸ دوره ۱۵، شماره ۴، ۳۵۹-۳۵۳

کلونینگ و بیان ژن IL-11 انسانی در اشریشیا کولی

صفر فرج نیا [۱،۲*]، رعنا حسن پور [۲]، فرزانه لطفی پور [۳]

[۱] مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. [۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز ، تبریز، ایران. [۳] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۳ ، تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۲۰

Cloning and Expression of human IL-11 in E. coli

Farajnia S. [1, 2 *], Hassanpour R.[2], Lotfipour F.[3]

[1]Drug applied Research Center Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

[2] Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, [3]Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 3 Mar. 2009, Accepted: 11 Nov. 2009

Objectives: Interleukin-11 (IL-11) is a thrombopoietic growth factor that stimulates the proliferation of hematopoietic stem cells and megakaryocytes and induces megakaryocyte maturation resulting in increased platelet production. IL-11 has recently been approved for treatment of chemotherapy induced thrombocytopenia in cancer patients. This cytokine is the first growth factor that gained FDA approval for this application. The aim of this study was cloning and recombinant expression of human IL-11 in E. coli. **Methods:** RNA was extracted from a human bone marrow sample and used for cDNA synthesis. cDNA was applied for amplification of IL-11 gene by PCR. The PCR product was cloned, sequenced and expressed in E. coli using pET28a expression vector. **Results:** Amplification of human IL-11 gene using primers designed on mature full length coding region of IL-11 resulted in a 531 bp fragment as visualized by agarose gel electrophoresis. Sequencing of the cloned fragment confirmed the identity of sequence of cloned gene. Expression by pET28a vector resulted in a high level production of recombinant IL-11 which appeared as a 24 kDa protein in the SDS-PAGE analysis of induced culture. **Conclusion:** The result of the present study indicated that the E .coli expression system is a suitable expression system for recombinant expression of human IL-11 and could be used for mass production of this cytokine due to high-density cell growth and fast product formation.

Keyword: Human IL-11, E. coli, Recombinant Expression.

زمینه و هدف: IL-11 یک فاکتور رشد هماتوپویتیک است که سبب تحریک تکثیر سلول های بنیادی هماتویتیک و مگاکاریوسیت ها گردیده بلوغ و تمایز مگاکاریوسیت ها و تولید پلاکت ها را افزایش می دهد. اخیرا از Interleukin-11 (IL-11) جهت درمان ترومبوسیتوپنی ناشی از شیمی درمانی در بیماران مبتلا به سرطان استفاده می شود و این سایتوکاین اولین فاکتور رشدی است که بدین منظور توسط FDA تأیید شده است. هدف از این مطالعه کلونینگ و بیان نوترکیب اینترلوکین یازده انسانی در اشرشیا کولی به منظور تولید آزمایشگاهی این سایتوکاین بوده است. **روش ها:** RNA توتال از نمونه مغزاستخوان انسانی استخراج گردید و پس از تبدیل به cDNA برای تکثیر ژن IL-11 با PCR مورد استفاده قرار گرفت. ژن تکثیر شده کلون و تعیین توالی گردیده و بیان آن در E. coli از طریق وکتور بیانی pET28a مورد بررسی قرار گرفت. **یافته ها:** تکثیر ناحیه کد کننده ژن IL-11 انسانی با PCR منجر به تکثیر قطعه ای اختصاصی گردید که به صورت باندی با اندازه تقریبی ۵۳۱ bp در ژل آگارز ظاهر گردید. کلونینگ و تعیین توالی محصول PCR صحت توالی ژن کلون شده را تائید نمود. بیان ژن IL-11 در E. coli با استفاده از وکتور pET28a منجر به تولید پروتئین نوترکیب در غلظت بالا گردید که در آنالیز SDS-PAGE بصورت باند واضحی در محدوده ۲۴ KDa مشخص گردید. **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که سیستم بیانی E. coli سیستم مناسبی برای بیان نوترکیب IL-11 انسانی بوده و با توجه به سرعت زیاد تشکیل محصول و دانسیته بالای رشد سلولی می تواند برای تولید این سایتوکاین در حجم بالا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: *اینترلوکین یازده انسانی، اشرشیاکولی، بیان نوترکیب.*

*Corresponding Author: Safar Farajnia, Assistant professor, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel: +98-411-3363234; Fax: +98-411-3363231 E-mail: farajnias@tbzmed.ac.ir

*نویسنده مسئول: صفر فرج نیا ، استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران . تلفن: ۳۳۶۳۲۳۱-۰۴۱۱ ، نمابر: ۳۳۶۳۲۳۱-۰۴۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

سرطانها دومین عامل بزرگ مرگ ومیر در دنیا بوده و در حال حاضر شیمی درمانی روش عمده درمانی برای این بیماران می باشد (۱). یکی از مهم ترین عوارض شیمی درمانی بروز ترمبوسیتوپنی است که خود را بصورت خونریزی یا افزایش استعداد به خونریزی نشان می دهد. انتقال پلاکت یا خون کامل به بیماران راه مقابله با این عارضه مهم می باشد اما کمبود دسترسی به پلاکت به علت نیمه عمر پایین آنها و عوارض ناشی از انتقال خون کامل مشکل مهمی در درمان عارضه فوق محسوب گردیده (۲) و مطالعات وسیعی برای یافتن درمان جایگزینی برای رفع ترومبوسیتوپنی در بیماران فوق انجام گرفته است. شناسایی اثرات اینترلوکین یازده در تحریک ترومبوپویزیس پیشرفت مهمی در این زمینه بوده و پس از مطالعات فراوان، سرانجام در سال ۲۰۰۶، این سایتوکاین برای درمان ترومبوسیتوپنی توسط FDA آمریکا تائید گردید (۳).

IL-11 یک سایتوکاین متعددالاثر است که نخستین بار در سال ۱۹۹۰ توسط PAUL وهمکارانشان شناسایی گردید (۴). این سایتوکاین در حالت طبیعی توسط سلول های استرومایی مغز استخوان تولید شده و اثرات مهمی بر بافت های مختلف اعمال می کند. مهم ترین اثر این سایتوکاین بر بافت مغز استخوان بوده و با تحریک تکثیر و تولید سلول های مغز استخوان و تمایز و بلوغ مگاکاریوسیت ها تولید پلاکت ها را بصورت بارزی افزایش می دهد.

این سایتوکاین متعلق به سایتوکاین های خانواده IL-6 است که خانواده ای بزرگ از سایتو کاین های مرتبط با هم شامل فاکتور ممانعت لوسمی (LIF)، وانکواستاتین M (OSM)، فاکتور نوروتروفیک مژگانی (CNTF) و کاردیوتروفین-۱ (CT-1) می باشد. اعضای این خانواده از خواص بیولوژیکی مشترکی نظیر تحریک رونویسی در هپاتوسیت ها، تحریک تکثیر و تمایز سلول های عصبی و تنظیم هماتوپوزیس (۵) برخوردار هستند.

ژن IL-11 شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون بوده و در جایگاه 19q13.3.q13.4 کروموزوم ۱۹ واقع است (۴ و ۶). این سایتوکاین از ۵۹۷ نوکلئوتید تشکیل شده است که پلی پپتید ۱۹۹ آمینو اسیدی را کد می کند. شکل ترشحی این اینترلوکین؛ ۲۱ آمینو اسید هیدروفوب خود را از دست داده و حاوی ۱۷۸ آمینواسید می باشد.

این سایتوکاین یک پلی پپتید ۲۴ KDa است که دارای نقطه ی ایزوالکتریک بالا و فاقد سیستئین و نواحی قابل گلیکوزیله شدن می باشد. IL-11 با اتصال به رسپتور اختصاصی سطح سلول فعالیت های بیولوژیک خود را اعمال می کند (۷) که برخی از مهم ترین اثرات بیولوژیک آن بشرح زیر می باشد:

- تحریک تکثیر stem cell های اولیه در بافتهای مختلف از جمله مغز استخوان و خون محیطی (۸ و ۹).
- تحریک مراحل مختلف مگاکاریوسیتوپویزیس و ترومبوسیتوپویزیس در مغز استخوان (۱۰).
- تحریک مراحل مختلف اریتروپویزیس (۱۱)، میلوپویزیس(۱۸) و لمفوپویزیس (۱۳) و تمایز و بلوغ سلول های اجدادی میلوئیدی.

این سایتوکاین همچنین دارای اثرات غیرهماتوپویتیک متعددی است نظیر : تحریک واکنش های فاز حاد التهاب بصورت in vivo و in vitro ، مهارچربی زایی ، تولید پاسخ های تب دار، اثرات محافظتی بر بافت همبند دخیل در ایجاد بیماری های فیبروز کبدی و سیروز، کاهش بیان سایتوکاین های پیش التهابی، بویژه مهار آزاد سازی TNFα توسط مونوسیت /ماکروفاژها(۶ و ۱۴). اینترلوکین ۱۱ همچنین بعنوان فاکتوری ضروری طی مراحل decidualization ولانه گزینی جنین در طی آبستنی می باشد (۱۵ و ۱۶) . نقش و اثرات متعدد این سایتوکاین باعث گردیده که امروزه این سایتوکاین در طیف وسیعی از بیماری ها نظیرسیروز، بیماری کرون، نقص مغز استخوان (۱۷)، پسوریازیس (۱۸) و آرتریت روماتوئید (۱۹) مورد مطالعه باشد.

با توجه به اهمیت کاربردی IL-11 نوترکیب، هدف مطالعه حاضر کلونینگ و بیان ژن اینترلوکین انسانی برای تولید آزمایشگاهی این سایتوکاین می باشد . نظر به قیمت بالای اینترلوکین یازده نوترکیب خارجی (با نام تجاری Neumega) ، تولید آزمایشگاهی IL-۱۱ نوترکیب می تواند قدم مفیدی در تولید این داروی ارزشمند باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱:استخراج RNA از سلول های مغز استخوان

www.SID.ir

Archive of SID

در این پژوهش، از نمونه مغز استخوان جهت استخراج RNA استفاده شد. برای این منظور، مخلوط بافت مغز استخوان و RNX (1 ml/100 mg) هموژنیزه گردیده و بعد از افزودن کلرفرم در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز روئی به لوله جدید منتقل شده و روی آن یک حجم ایزوپروپانول اضافه گردید. مخلوط ۱۵ دقیقه برروی یخ قرار گرفته و سپس در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۵ دقیقه ، سانتریفیوژ و رسوب پس از شستشو با اتانول ۷۵٪، خشک ودر آب مقطر DEPC treated حل گردید.

۲- ۲: تهیه cDNA از RNA

مقدار ۶ µl، RNA با ۱ µl پرایمر Oligo-dt و ۵ µl آب مقطر مخلوط گردیده و جهت شکستن پیوندهای داخلی زنجیره RNA ، مدت ۵ دقیقه در ۷۰ ^{o}C قرار گرفت. سپس بر روی آن ۴ µl بافر ۵X، ۱ µl Riboblock و ۲ µl dNTPmix افزوده شد. مخلوط ۵ دقیقه در ۳۷ ^{o}C قرار گرفته و پس از افزودن آنزیم Reverse Transcriptase (RT) مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ ^{o}C وسپس ۱۰ دقیقه دردمای ۷۰^{o}C قرار گرفت.

۲-۳: تکثیر ژن IL-11 انسانی با روش PCR

cDNA تهیه شده به همراه پرایمر رفت با توالی 5'-CTCATATGGTGCCTCCACCTGG-3' و پرایمر برگشت با توالی 5'-TAAAGCTTTCACAGCCGAGTCTTCAGCAG-3' که بر اساس توالی کامل ژن IL-11 انسانی طراحی شده بود در واکنش PCR وارد گردید. جهت طراحی پرایمر از نرم افزارGeneruner استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR شامل ۱ µl از پرایمرهای رفت و برگشت، ۲۲µl pfu Mix ، ۱ µl آنزیم pfu DNA polymerase و ۱ µl cDNA بود. شرایط PCR شامل واسرشت اولیه در ۹۴ ^{o} C برای ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل واسرشت در ۹۴ ^{o}C برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۸^{o}C برای ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲^{o} C برای ۳۵ ثانیه بود و نهایتا واکنش برای ۵ دقیقه در ۷۲ ^{o}C ادامه یافت. تکثیر محصول مورد نظر از طریق الکتروفورز در ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی گردید.

۲-۴: کلون و تعیین توالی ژنی IL-11

محصول PCR به کمک کیت تخلیص محصول PCR خالص سازی شده و به همراه حامل pGEM و آنزیم لیگاز در واکنش اتصال وارد گردید و برای تعیین توالی فرستاده شد. محصول واکنش به E. coli سویه DH5α (Promega) ترانسفورم شده و پس از کشت بر روی محیط حاوی IPTG، Xgal و آمپی سیلین، کلونی های سفید رنگ انتخاب و از آنها استخراج پلاسمید به عمل آمد. پلاسمیدهای جدا شده برای دارا بودن اینسرت مورد نظر با روش PCR و همچنین هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

۲-۵: بیان نوترکیب ژن IL-11

برای بیان ژن IL-11 انسانی در E. coli از حامل بیانی pET28a استفاده گردید. ابتدا ژن IL-11 با آنزیم های محدودگر Nde و Hind از حامل pGEM جدا شده، سپس به حامل pET28a برش داده با آنزیم های فوق الذکر متصل گردید. این سازه ژنی به E. coli سویه Bl21 ترانسفورم شده و در محیط کشت LB Broth تا رسیدن به OD=0.5 رشد داده شد. سپس با افزودن IPTG با غلظت ۱ میلی مولار برای ۳ ساعت القا گردیده و بیان از طریق SDS-PAGE آنالیز گردید.

۲-۶: بهینه سازی بیان

۲-۶-۱: بررسی اثر غلظت های مختلف IPTG بر میزان بیان:

برای این منظور از غلظت های مختلف IPTG استفاده شد. به این ترتیب که عمل القا با افزودن غلظت های ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ و ۰/۰۶۲۵ میلی مولار انجام گرفت. نمونه برداری قبل از القا و ۴ ساعت بعد از القا انجام شد و با استفاده از SDS-PAGE میزان بیان بررسی گردید.

۲-۶-۲: بررسی میزان بیان پروتئین در زمان های مختلف بعد از القا:

برای این منظور کلون حاوی سازه ژنی بیانی در محیط مایع کانامایسین دار (۱۵ µg/ml) کشت داده شد. نمونه برداری قبل از القا در OD=۰/۵ و پس از القا در زمانهای ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶، ۷/۵ و ۹ ساعت بعد از افزودن IPTG (با غلطت نهائی ۱ میلی مولار) انجام گرفت.

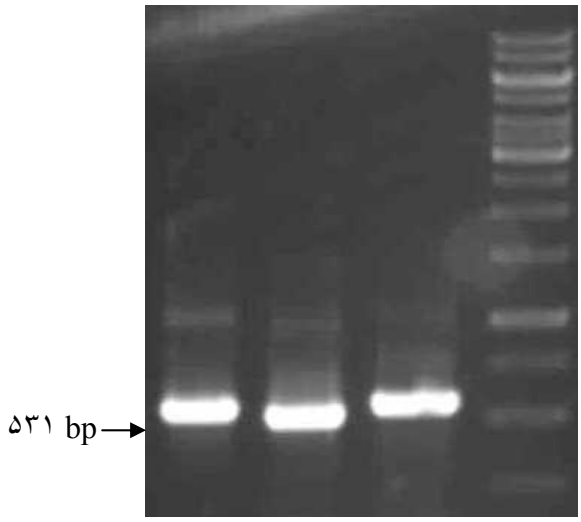
۳- نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

۱-۳: تکثیر، کلونینگ و تعیین توالی ژن IL-11 انسانی

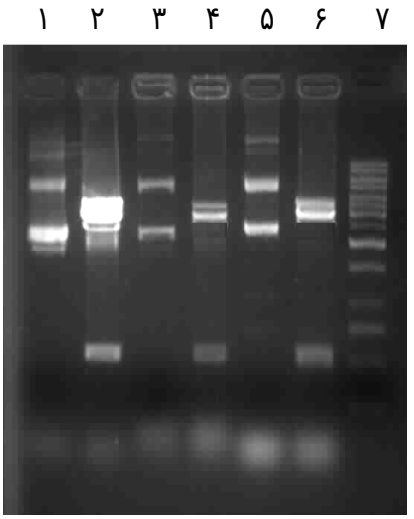
تکثیر ناحیه کد کننده ژن IL-11 انسانی با PCR منجر به تکثیر قطعه ای اختصاصی گردید که به صورت باندی با اندازه تقریبی ۵۳۱ bp در ژل آگارز ظاهر گردید (شکل ۱). محصول PCR با روش T-A کلونینگ در وکتور pGEM-T easy کلون گردیده و با استفاده از روش هضم آنزیمی تایید گردید (شکل ۲).



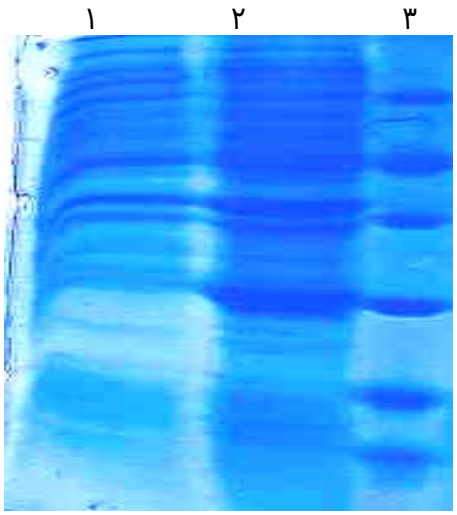
شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR مربوط به تکثیر ژن IL-11 انسانی با روش RT-PCR. همانطور که در **تصویر دیده می شود تکثیر ژن IL-11 انسانی با روش RT-PCR در هر سه بار تکرار** منجر به تولید قطعه ای در اندازه مورد انتظار گردیده است.

۲-۳: بیان ژن IL-11 انسانی در E. coli

برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب، ساژه ژنی به سویه Bl21 که دارای ژن کد کننده T7 RNA polymerase تحت کنترل LacI است، ترانزیش گردید. سپس سلول ها در محیط کشت کانامایسین دار کشت داده شده و نمونه برداری قبل و بعد از القا (با IPTG) انجام شد. نمونه قبل از القا ۳ ساعت بعد از کشت و نمونه بعد از القا ۳ ساعت بعد از افزودن IPTG (با غلظت نهایی ۱ میلی مولار) برداشته شدند. نتایج SDS-PAGE نشان داد که بعد از افزودن IPTG، پروتئین نوترکیب IL-11 با اندازه تقریبی ۲۴ KDa بیان شده است (شکل ۳).



شکل ۲. تأیید کلونینگ با روش هضم آنزیمی: ستونهای ۱، ۳ و ۵ عبارتند از pGEM-T easy-IL-11 هضم نشده؛ ستونهای ۲، ۴ و ۶ عبارتند از pGEM-T easy-IL-11 هضم شده با آنزیمهای محدود گر Nde و Hind و ستون ۷، نشانگر وزن مولکولی 1Kb.



شکل ۳. **بیان ژن IL-11 انسانی در** E. coli، ستون ۱، lysate باکتری E. coli Bl21 حاوی سازه بیانی pET 22b-IL11 نمونه قبل از القا، ستون ۲ lysate باکتری E. coli Bl21 حاوی سازه بیانی pET 22b-IL11 نمونه بعد از القا، ستون ۳، نشانگر وزن مولکولی.

۳-۳: بهینه سازی بیان پروتئین

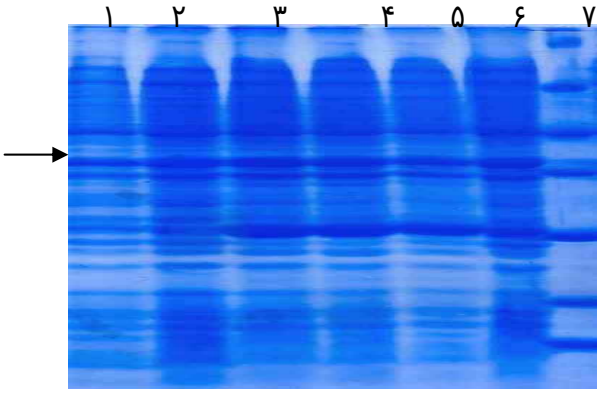
۱-۳-۳: مقایسه اثر غلظت های مختلف IPTG در میزان بیان پروتئین

برای این منظور کلون نوترکیب اینسرت دار در محیط کانامایسین دار (۱۵ µg/ ml) کشت و سپس با غلظت نهائی ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵/۰،۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی مولار از IPTG القا شدند. نمونه برداری قبل از افزودن IPTG

www.SID.ir

Archive of SID

(۳ ساعت بعد از از کشت) و ۴ ساعت بعد از افزودن IPTG صورت گرفت. تفاوتی بین غلظت های ۰/۰،۰/۲۵/۱۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی مولار دیده نشد. ولی در گذر از غلظت ۰/۱۲۵ به ۰/۰۶۲۵ میلی مولار تفاوت فاحشی مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۴. **مقایسه اثرغلظت های مختلف IPTG بر روی میزان بیان IL-11 نوترکیب در E. coli** : ستون ۱، مربوط به نمونه قبل از القا و ستونهای ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ مربوط به نمونه پس از القا بترتیب

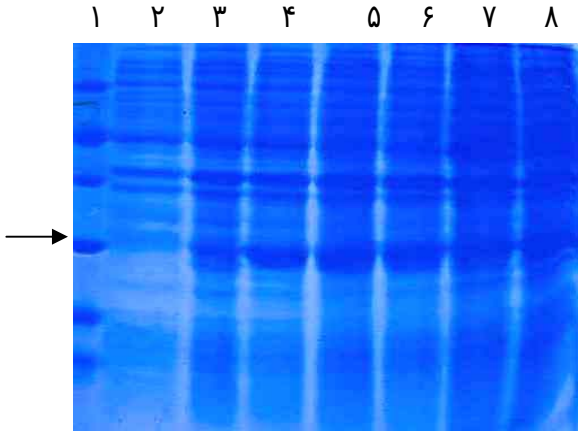
۴- بحث

سرطان یکی از عمده ترین علل مرگ و میر در جهان بوده و علیرغم تحقیقات فراوان برای یافتن داروهای سالم هنوز شیمی درمانی اصلی ترین روش معالجه سرطان محسوب می گردد. شیمی درمانی دارای عوارض اجتناب ناپذیری است که از شایع ترین و مهم ترین این عوارض، کاهش شمار سلول های خونی از جمله پلاکت ها می باشد. این عارضه اغلب خود را بصورت خونریزی های مکرر و کنترل نشده نشان می دهد. روش معمول درمان این عارضه، انتقال پلاکت به بیماران است که براحتی در دسترس نبوده و خود دارای مشکلات و عوارض متعددی می باشد. از این رو شناسایی روش درمانی جایگزین از اولویت های تحقیقات پزشکی بوده است. در این راستا اثرات فاکتورهای رشد متعددی بر بهبود تولید پلاکت ها مورد بررسی قرار گرفته و شناسایی اثرات درمانی سودمند IL-11 نقطه عطفی در مطالعات فوق محسوب می گردد (۲).

هدف مطالعه حاضر کلون و بیان ژن اینترلوکین یازده به منظور تولید آزمایشگاهی این سایتوکاپین ارزشمند بوده

۲-۳-۳: بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب در زمان های مختلف بعد از القا

برای این منظور، نمونه های قبل از القا و همچنین بعد از القا در زمانهای ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶، ۷/۵ و ۹ ساعت بعد از افزودن IPTG (با غلظت نهائی ۱ میلی مولار) جمع آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. همان طور که در شکل (۵) مشاهده می شود با گذشت زمان میزان بیان افزایش می یابد. ولی از ساعت ششم به بعد بیان تقریبا ثابت می ماند



شکل۵. **بررسی میزان بیان IL-11 نوترکیب در زمان های مختلف بعد از القا:** ستون ۱، شامل نشانگر وزن مولکولی؛ ستون ۲ مربوط به نمونه قبل از القا و ستونهای ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ نمونه های بعد از القا در زمانهای بترتیب ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۶، ۷/۵ و ۹ ساعت پس از افزودن IPTG می باشند..

طالعات
تلفی از
: (۲۰).

در این مطالعه از نمونه مغز استخوانی که از طریق پونکسیون تهیه شده بود برای جداسازی ژن IL-11 با روش RT-PCR استفاده گردید.

برای تکثیر ژن IL-11 ابتدا RNA توتال از مغز استخوان انسان جداسازی گردیده و پس از تبدیل به cDNA، برای تکثیر ژن IL-11 با PCR استفاده گردید. نتایج نشان داد که این روش یک شیوه مناسب برای جداسازی ژن فوق بوده و ژن تکثیر یافته بصورت یک باند قوی در الکتروفورز محصول PCR قابل مشاهده است.

در مرحله کلونینگ از روش T-A کلونینگ در وکتور pGEM-T Easy (Promega) استفاده گردید. این روش کلونینگ یک روش رایج برای کلونینگ بوده و در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

بمنظور بیان ژن IL-11 در سیستم بیانی *E. coli* ، حامل بیانی pET28a مورد استفاده قرار گرفت. غربال به *E. coli* Bl21 تراریخته با حامل نوترکیب pET28a ، توسط ژن مقاوم به کانامایسین که بر روی حامل قرار دارد انجام گرفت و تنها کلونیهای حاوی حامل نوترکیب در محیط LB کانامایسین دارقادر به رشد بودند. حاملهای پلاسمیدی مختلفی برای بیان ژن در E. coli نوسعه داده شده است که از جمله آنها می توان از سیستمهای بیانی pQE, pGEX و pET نام برد. در سیستم pET از پروموتور فاژ T7 استفاده می شود پروموتور فوق یک پروموتور بسیار قوی بسیار اختصاصی بوده و توسط RNA پلیمراز E. coli شناسایی نمیشود در حالیکه پروموتور موجود در وکتورهایpQE و pGEX توسط RNA پلیمراز E. coli رونویسی می شوند.

نتیجه بیان ژن IL-11 با واسطه حامل pET 28a تولید پروتئین IL-11 بود که خود را بصورت باندی در SDS-PAGE باکتری های القا شده نشان داد. این یافته ها با نتایج مطالعات قبلی (۱۷ و ۲۱) سازگاری دارد و نشان می دهد که این سیستم، میزبان مناسبی برای تولید IL-11 نوترکیب می باشد.

سیستم های مختلفی برای تولید پروتئین های نوترکیب توسعه پیدا کرده است. بیان در هر میزبانی دارای مزایا و معایبی است و بسته به نوع پروتئین هدف بایستی سیستم مناسب انتخاب گردد. میزان بالای پروتئین تولیدی و ارزان بودن تولید با سیستم بیان *E. coli* از مزایای این سیستم تولید پروتئین نوترکیب می باشد. اما عیب عمده این سیستم فقدان مکانیسم های ضروری برای اصلاحات بعد از ترجمه نظیر استیلاسیون، آسیلاسیون، کربوکسیلاسیون و گلیکولیزاسیون است. لذا سیستم فوق نمی تواند در تولید پروتئین هایی که فعالیت یا ساختار صحیح آنها نیاز به این تغییرات پس از ترجمه دارد بکار رود. با توجه به اینکه IL-11 پروتئینی غیر گلیکوزیله و فاقد باندهای دی سولفیدی است و نیازی به اصلاحات بعد از ترجمه نظیر استیلاسیون ندارد و با توجه به مزیت های فراوان سیستم بیانی *E. coli* ، این سیستم می تواند میزبان مناسبی برای بیان IL-11 نوترکیب انسان باشد (۱۷). مطالعه حاضر نخستین گزارش از کلون و بیان ژن IL-11 انسان در ایران می باشد. نتایج توالی یابی حامل نوترکیب pGEM-IL-11 با استفاده از آغازگرهای T7promoter و T7terminator هویت ژن کلون شده را تأیید کرده و گویای شباهت ۱۰۰٪ توالی مذکور با توالی IL-11 گزارش شده از انسان بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که القا کلون نوترکیب pET28a-IL-11 تراریزش شده در *E. coli* Bl21 توسط IPTG میتواند باعث تولید پروتئین نوترکیب در این سلول گردد. این نتایج با یافته های مطالعات دیگر (۱۷ و ۲۱) سازگاری داشته و نشانگر اینست که این سیستم می تواند برای تولید IL-11 نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز به انجام رسیده است که بدین وسیله از مرکز فوق قدردانی می گردد.

References

1. Sun XF, Guan ZZ, Huang H, Zhou QH, Yi C, Zhang LJ. Clinical Study of rhIL-11 for Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Thrombocytopenia. Ai Zheng., 2002, (21): 892-895.
2. Tepler I, Elias L, 2nd Smith JW, Hussein M, Rosen G, Chang AY, et al. A randomized placebo-controlled trial of recombinant human interleukin- 11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy. Blood., 1996, (87): 3607-3614.
3. Gordon MS, McCaskill-Stevens WJ, Battiato LA, Loewy J., Loesch D., Breeden E, et al. A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy. Blood, 1996, (87): 3615-3624.
4. Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, Kelleher K, Wood CR, O´Hara RM ,et al. Molecular Cloning of a cDNA Encoding Interleukin 11, A Stromal Cell-Derived Lymphopoietic and Hematopoietic Cytokine. Genetics., 1990, (87): 7512-7516.
5. Chevalier S., Fourcin M., Robledo O., Wijdenes J., Pouplard-Barthelaix A., Gascan H. Interleukin-6 Family of Cytokines Induced Activation of Different Function Sites Expressed by gp130 Transducing Protein. The Journal of Biological Chemistry, 1996, (271): 14764-14772.
6. Du X, Williams DA., Interleukin-11: Review of Molecular, Cell Biology and Clinical Use. Blood., 1997, (89): 3897-3908.
7. Du XX, Williams DA., Interleukin-11: A multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenviroment. Blood., 1994, (83): 2023-2030.
8. Tsuji K., D., Lyman S., Sudo T., C., Clark S., Ogawa M., Enhancement of Murine Hematopoiesis by Synergistic Interactions Between Steel Factor (ligand for c-kit), Interleukin-11, and Other Early Acting

www.SID.ir

Archive of SID

Factors in Culture. Blood., 1992, (79): 2855-2860.
9. Musashi M., Clark SC., Sudo T., Urdal DL., Ogawa M. Synergistic interactions between interleukin-11 and interleukin-4 in support of proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. Blood., 1991, (78): 1448-1451.
10. Neben TY, Loebelenz J., Hayes L., McCarthy K., Stoudemire J., Schaub R., et al. Recombinant human interleukin-11 stimulates megakaryocytopoiesis and increases peripheral platelets in normal and splenectomized mice. Blood., 1993, (81): 901-908.
11. Quesniaux VF., Clark SC., Turner K., Fagg B. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. Blood., 1992, (80): 1218-1223.
12. Jacobsen SE., Okkenhaug C., Veiby OP., Caput D., Ferrara P., Minty A., Interleukin 13: novel role in direct regulation of proliferation and differentiation of primitive hematopoietic progenitor cells. Journal of Experimental Medicine., 1994, (180):75-82.
13. Hirayama F., C., Clark S., Ogawa M., Negative regulation of early B lymphopoiesis by interleukin 3 and interleukin lα. Proceeding of the National Academy of Sciences of America., 1994, (91): 469-473.
14. Fukuda Y., Sassa S., Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG2 hepatoma cells. Biochemical and biophysical research communications., 1993, (193): 297-302.
15. Dimitriadis E, Robb L, Liu YX, Enders AC, Martin H, et al. IL-11 and IL-11Rα Immunolocalisation at Primate Implantation Sites Supports A Role for IL-11 in Placentation and Fetal Development. Reproductive Biology and Endocrinology., 2003, (1): 34.
16. Bao L, Devi S, Bowen-Shouver J, Ferguson-Gottschall S, Robb L, Gibori G. The Role of Interleukin-11 in Pregnancy Involves Up-Regulation of α_2-Macroglobulin Gene Through Jak2-Stat3 Pathway in The Decidua. Molecular Endocrinology., 2006, (20): 3240-3250.
17. Tan H., Dan G., Gong H., Cao L. Purification and characterization of recombinant truncated human interleukin-11 expressed as fusion protein in Escherichia coli. Biotechnology Letters., 2005, (27): 905-910.
18. Trepicchio WL, Ozawa M, B. Walters I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, L. Bliss J, et al. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesion. The Journal of Clinical Investigation., 1999, (104): 1527-1537.
19. Moreland L, Gugliotti R., King K., Chase W., Weisman M., Greco T., et al. Results of A Phase-I/II Randomized, Masked, Placebo-Controlled Trial of Recombinant Human Interleukin-11 (rhIL-11) in the Subjects with Active Rheumatoid Arthritis. Arthritis research., 2001, (3): 247-252.
20. Du XX, Neben T., Goldman S., Williams DA., Effects of recombinant human interleukin-11 onhematopoietic reconstitution in transplant mice: acceleration of recovery of peripheral blood neutrophils and platelets. Blood., 1993, (81): 27-34.
21. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Appl Microbiol Biotechnol., 2004, (65): 363-372.

www.SID.ir