مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هفتم، شماره بیست و هفتم - تابستان ۱۳۹۶

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر القاءکنندگی لاکتوز و IPTG بر بیان ژن اینتر فرون بتا ۱ بی در باکتری *Escherichia coli* BL21 (DE3)

کبری مرادیان[1*]، محمد رضا فاضلی [2]، داریوش عابدی [3]

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پروموتر *lac*[1] یک ژن تنظیم کننده پروکاریوتی بیان پروتئین نوترکیب در *Escherichia coli* می باشد. این پروموتر توسط لاکتوز و یا آنالوگ شیمیایی آن IPTG[2] القا می‌شود. در این تحقیق تأثیر لاکتوز و IPTG بر میزان بیان ژن اینترفرون بتا ، مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها: باکتری *Escherichia coli* BL21 (DE3) کلون شده با ژن اینترفرون بتا کشت داده شد و با اضافه کردن غلظت مشخصIPTG و لاکتوز به طور جداگانه و یا با یکدیگر، بیان پروتئین القا گردید. میزان پروتئین اینترفرون تولید شده اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میزان بیان پروتئین اینتر فرون بتا ۱ بی با استفاده از ۰/۲ ٪ لاکتوز وIPTG ۰/۵ میلی‌مولار به‌طور هم‌زمان نسبت به هر کدام از القاءکننده‌ها به تنهایی افزایش داشت و برابر با ۳۴٪ کل پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری اشریشیاکلی نوترکیب بود.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق، با استفاده هم‌زمان لاکتوز وIPTG ، در مقایسه با هر کدام از این القاء کننده‌ها به تنهایی، میزان بیش‌تر پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با هزینه کم‌تر تولید شد.

واژه‌های کلیدی: باکتری *Escherichia coli* ، اینترفرون، پروموتر *lac*، لاکتوز(lactose) ، IPTG

مقدمه :

اینترفرون‌ها سایتوکاین‌های ضد ویروسی می‌باشند که توسط سلول‌های مهره داران ساخته و ترشح می‌شوند. اینترفرون بتا علاوه بر خواص ضد ویروسی و ضد تکثیری که در سایر اینترفرون‌ها مشاهده می‌شود قادر است پاسخ‌های سیستم ایمنی را تنظیم نماید. خصوصیت‌های ذکر شده فوق سبب شده است که علاوه بر کاربرد آن در درمان بیماری‌های ویروسی (انواع هپاتیت) و سرطان، دردرمان بیماری‌هایی با علل ایمونولوژیک مانند MS[1] نیز استفاده گردد (۱).

ژن اینترفرون بتا در بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ انسان قرار گرفته است . درحال حاضر ترکیب فوق به روش مهندسی ژنتیک در *Escherichia coli* تولید شده و به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). اینترفرون بتای نوترکیب که توسط *Escherichia coli* تولید می‌شود Interferon β-1b نام داشته (۴) و به عنوان دارو در پیش‌گیری و کنترل عودهای مجدد بیماری مالتیپل اسکلروزیس(MS)) (۵،۷)، درمان بیماری‌های خودایمنی (۱۳)، مهار تکثیر سلولی و مهار رگ‌زایی

نویسنده مسئول
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی
تهران، ایران
پست الکترونیکی: s.moradian7@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۴/۲/۱۳۹۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۳

[1] Lactose
[2] Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

Archive of SID
www.SID.ir

در انواع سرطان (۱،۱۹)و درمان عفونت‌های ویروسی استفاده می‌شود (۲،۸) . جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیاکلی ، پلاسمید *pET* نوترکیب که دارای پروموتور *lac* می‌باشد به سویه‌هایی از *Escherichia coli* حاوی یک کپی کروموزومی از ژن RNA پلی‌مراز T_7 منتقل می‌شود، این آنزیم بسیار فعال بوده و RNA را هشت بار سریع‌تر از RNA پلی-مراز *Escherichia coli* طویل می‌سازد (۲۰). پروموتر *lac* یک ژن تنظیم کننده پروکاریوتی بیان پروتئین نوترکیب در *Escherichia coli* می‌باشد. رونویسی از پروموتر *lac* توسط یک پروتئین مهار کننده یعنی I *lac* (که محصول ژنI *lac* می‌باشد) تنظیم می‌شود و در حضور ترکیب‌های القاکننده (لاکتوز و یا آنالوگ شیمیایی آن IPTG) اثر مهاری I *lac* بر فرایند رونویسی از بین می‌رود و در عدم حضور ماده القاکننده ، مهار کننده *lac* I با اتصال به ناحیه اوپراتور از اتصال آنزیم RNA پلی-مراز به ناحیه پروموتر ممانعت کرده و شروع رونویسی را مهار می‌کند (۱۸).

به‌طورکلی ، حضور القاء کننده در محیط و غلظت آن تأثیر غیر قابل انکاری بر میزان تولید پروتئین دارد. IPTG القاءکننده‌ای است که به طور معمول برای بیان ژن‌های نوترکیب استفاده می‌گردد، به هر حال، مشکل اصلی این ترکیب گران بودن و سمیت آن برای انسان است. هم-چنین به دلیل این که IPTG برای باکتری میزبان سمی است، غلظت بالای آن به طور معمول منجر به افزایش بیان ژن و کاهش میزان سلول‌های باکتری می‌شود (۳،۲۴) و کاهش میزان سلول‌های باکتری نیز به نوبه خود سبب کاهش بیان ژن خواهد شد. به منظور ایجاد تعادل بین این دو تأثیر متضاد، میزان بهینه غلظت IPTG برای هر پروتئین باید به طور اختصاصی تعیین گردد. مطالعه‌های گذشته نشان می‌دهند که میزان غلظت IPTG مورد استفاده برای القا بیان ژن از ۰/۰۰۵ تا ۵ میلی مولار می‌باشد (۲۳) .

لاکتوز، القاء کننده طبیعی اوپران *lac* ، را می‌توان به جای IPTG استفاده نمود. مشخص گردیده است که لاکتوز به اندازه IPTG برای القاء بیان ژن نوترکیب در *Escherichia coli* مؤثر می‌باشد(۶). لازم به ذکر است که چون باکتری *Escherichia coli* لاکتوز را به عنوان منبع کربن استفاده می‌نماید، با گذشت زمان مقدار لاکتوز در سلول کاهش می‌یابد، بنابراین لازم است که پس از افزودن لاکتوز در زمان شروع القاء، به طور مداوم، در فواصل زمانی مناسب لاکتوز به محیط کشت اضافه گردد.

در تحقیق حاضر، تأثیر لاکتوز و IPTG به تنهایی و به طور هم‌زمان، بر میزان بیان ژن اینترفرون بتا ۱ بی ، بررسی گردید. بیش‌ترین میزان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در شرایطی حاصل شد که بخشی ازIPTG با لاکتوز ۰/۲ ٪ جایگزین گردید. جایگزینی بخشی ازIPTG با لاکتوز سبب کاهش چشم‌گیر هزینه تولید این داروی نوترکیب می‌گردد.

مواد و روش‌ها:

میکروارگانیسم :

باکتری نوترکیب سوش *Escherichia coli* BL21 (DE3) کلون شده با ژن اینترفرون بتا از شرکت زیست دارو دانش تهیه شد.

بررسی کینتیک رشد باکتری اشریشیاکلی در محیط کشت غنی LB مایع :

۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت LB[1] به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر کانامایسین ۱۰ mg/ml، با ۱ میلی‌لیتر از بانک سلولی باکتری اشریشیاکلی نوترکیب تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰rpm[2] به مدت ۸ ساعت قرار داده شد. در فواصل زمانی ۱ ساعته هر بار ۱ میلی‌لیتر از کشت برداشته و جذب نوری آن در OD600nm خوانده شد.

تهیه مایع تلقیح (کشت شبانه):

۱۰۰میلی لیترمحیط کشت LB به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر کانامایسین ۱۰ mg/ml، با ۱ میلی لیتر از بانک سلولی باکتری اشریشیاکلی نوترکیب تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰rpm به مدت ۸ ساعت قرار داده شد تا به جذب نوری حدود ۳ (OD600~3) برسد.

کشت باکتری و بیان شدن پروتئین اینترفرون بتا۱ بی :

[1] Luria-Bertani medium
[2] Revolutions per minute

Archive of SID
www.SID.ir

۱۰۰میلی‌لیتر محیط کشت LB به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر کانامایسین ۱۰mg/ml، با ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و دور ۲۵۰rpm قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان حدود ۳ ساعت و رسیدن به OD600nm برابر ۰/۶ با اضافه کردن القاءکننده (IPTG و لاکتوز ۰/۲ ٪ به تنهایی یا با یکدیگر) به محیط کشت، باکتری وارد فاز بیان پروتئین شد. پس از ۶ ساعت انکوباسیون در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰rpm، جمع آوری سلول‌های باکتری از محیط کشت با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و توده سلولی با بافر PBS[1] شستشو داده شد، پس از سانتریفیوژ و دور ریختن مایع رویی توده سلولی به دست آمد. توده سلولی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری می باشد تا بعد برای استخراج پروتئین مورد نظر استفاده شود.

تخریب دیواره سلولی باکتری :

با افزودن بافرPBS به توده سلولی، سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. فالکون حاوی سوسپانسیون سلولی در ظرف یخ قرار داده شد و با کمک دستگاه سونیکیتور به مدت ۲۰ دقیقه (۳۰ ثانیه روشن و ۳۰ ثانیه خاموش) دیواره سلولی باکتری تخریب گردید. قرار دادن روی یخ به منظور جلوگیری از بالا رفتن دما و ممانعت از دناتوره شدن پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی صورت می‌گیرد.

شست و شوی اجسام سلولی و دستیابی به انکلوژن بادی(پروتئین نوترکیب اینترفرون بتا):

سوسپانسیون حاوی سلول‌های باکتری که دیواره آن‌ها توسط دستگاه سونیکاتور شکسته شده بود با دورrpm ۱۰۳۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب (انکلوژن بادی) که همان پروتئین نوترکیب اینترفرون بتا می‌باشد در۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است تا بعد برای بررسی و تعیین وزن مولکولی پروتئین نوترکیب اینترفرون بتا با استفاده ازالکتروفورز ژل پلی آکریل آمید استفاده شود.

تفکیک و تعیین وزن مولکولی پروتئین نوترکیب اینترفرون بتا با استفاده از *SDS-PAGE*[2]:

تانک الکتروفورز عمودی ساخت شرکت با یورد(Bio-Rad) برای شناسایی پروتئین اینترفرون بتا استفاده شد. ژل الکتروفورز به صورت دو قسمتی، در بالا ژل متراکم کننده ۴٪ و در پایین ژل جداکننده ۱۴٪درصد تهیه شد.۰/۲ گرم از انکلوژن بادی وزن شد و۵۰۰ میکرولیتر آب ۲ بار تقطیر به آن افزوده گردید. ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون با ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه حاوی ۵٪ بتامرکاپتواتانول، مخلوط شد و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و ۱۰ میکرولیتر از آن توسط سرنگ همیلتون درون چاهک ژل آکریل آمید تزریق گردید.

بررسی مقدار بیان پروتئین نوترکیب اینترفرون بتا :

با استفاده از دستگاه دانسیومتر نوری (Bio-Rad) و نرم افزارQuantity One و بر اساس شدت باند ایجاد شده روی ژل در بخش ۱۸/۴ کیلودالتون انجام گرفت.

وسترن بلاتینگ پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی

پروتئین‌های الکتروفورز شده با روش semi-dry و با استفاده از کیت western detection (Invitrogen, CA, USA) به غشاء نیتروسلولز منتقل گردید. غشاء به مدت یک ساعت با آلبومین سرم گاوی ۲% در فسفات بافر سالین/Tween 20 (PBST)/انکوبه شد. سپس یک ساعت با آنتی بادی اولیه (Anti-β-IFN Mouse mAb, Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) در 1 % BSA/PBST و سپس به مدت یک ساعت با آنتی بادی ثانویه (Goat Anti-Mouse Total Ig Peroxidase conjugate, Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) در 1 % BSA/PBST انکوبه شد. پس از هر بار انکوباسیون غشاء سه بار با PBST شسته شد. سپس بلات با استفاده

[1] Phosphate-buffered saline

[2] Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Archive of SID

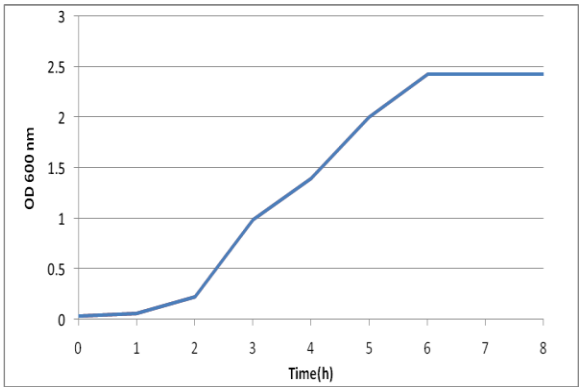
www.SID.ir

diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochlorideو پروکسید هیدروژن تهیه شد.

یافته ها:

بررسی کینتیک رشد باکتری اشریشیاکلی در محیط کشت غنی LB مایع

بررسی کینتیک رشد باکتری اشریشیاکلی در محیط کشت غنی LB مایع به منظور تعیین زمان القاء(OD600nm) در زمان القاء) و طول مدت زمان انکوباسیون انجام شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که حدود ۱ ساعت طول می‌کشد تا باکتری اشریشیاکلی با محیط کشت LB مایع آداپته شود(Lag phase). پس از گذشت حدود ۲ ساعت به OD600nm برابر با ۰/۳ می‌رسد و وارد فاز رشد لوگاریتمی(Log phase) می‌شود. و پس از گذشت ۶ ساعت و رسیدن به OD600nm برابر با ۲/۴ وارد فاز سکون (Stationary phase) می شود (نمودار ۱). بنابراین القاء بیان ژن در OD600nm برابر ۰/۶ (اوایل فاز رشد لوگاریتمی) انجام شد و طول مدت انکوباسیون ۶ ساعت در نظر گرفته شد (نمودار ۱).



نمودار ۱ : منحنی رشد باکتری نوترکیب سویه *Escherichia coli* BL21 (DE3) در محیط کشت LB

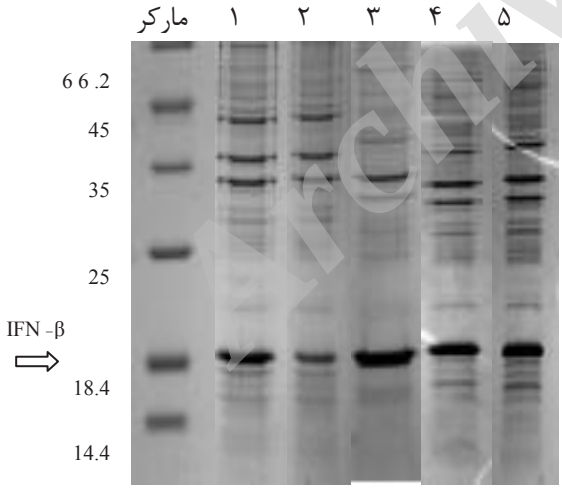
افزایش میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از لاکتوز وIPTG به طور همزمان به عنوان القاءکننده

دراین مطالعه به منظور افزایش میزان بیان پروتئین و کاهش هزینهٔ IPTG، از لاکتوز۲ /۰ ٪ به عنوان القاءکننده به همراه مقادیر مختلف IPTG استفاده گردید. و بیش‌ترین میزان اینترفرون بتا در سلول‌های باکتری اشریشیاکلی زمانی مشاهده شد که ژن اینترفرون بتا با ۰/۵ میلی مولارIPTG و ۲ /۰ ٪ لاکتوز به طور همزمان القاءگردید و پس از آنالیز با SDS-PAGE (شکل۱) میزان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با دستگاه دانسیومتر تعیین شد(جدول۱).

جدول۱– مقایسه میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از لاکتوز و IPTG به عنوان القاءکننده

القاء کننده	میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی (٪)
۱) IPTG ۰/۵ میلی مولار	۱۹
۲) لاکتوز۲ /۰ ٪	۱۴
۳) IPTG ۰/۵ میلی مولار و لاکتوز ۲ /۰ ٪	۳۴
۴) IPTG ۱ میلی مولار	۳۰
۵) IPTG ۱ میلی مولار و لاکتوز۲ /۰ ٪	۳۲

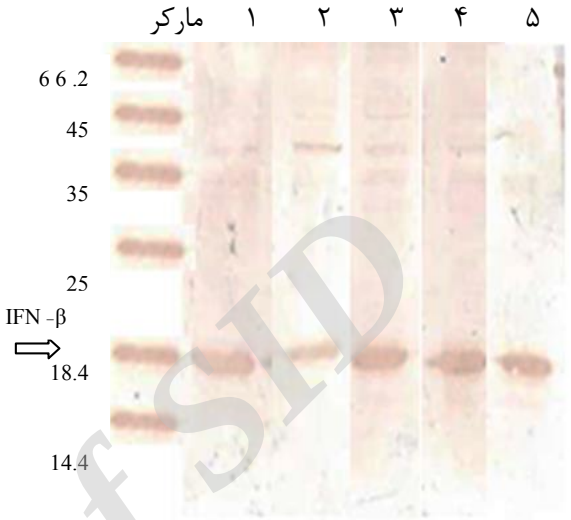
پس از افزودن۲ /۰ ٪ لاکتوزدر ابتدا، هریک ساعت یک بارنیز ۲ /۰ ٪ لاکتوز به کشت افزوده گردید.



شکل۱- :آنالیز سلول شکسته شده اشریشیاکلی با روش ژل پلی آکریل آمید: ستون اول : مارکر بر اساس وزن مولکولی پروتئین (۶۶,۲ , ۴۵ , ۳۵ , ۲۵ , ۱۸,۴ , ۱۴,۴ کیلو دالتون)، شماره بالای ستون‌ها نشانه شماره آزمایش است. ۱) IPTG ۰/۵ میلی‌مولار۲) لاکتوز۲ /۰ ٪ ۳) IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و لاکتوز ۲ /۰ ٪ ۴) IPTG ۱ میلی‌مولار۵) IPTG ۱ میلی-مولار و لاکتوز ۲ /۰ ٪ .

Archive of SID
www.SID.ir

چنان که در نتایج وسترن بلاتینگ مشاهده می‌شود، پروتئین تولید شده با آنتی بادی rabbit-anti-hINF-β واکنش داد. وزن مولکولی اینترفرون بتا ۱ بی ۱۸,۴ kDa می‌باشد (شکل۲).



شکل۲- : وسترن بلاتینگ پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی : ستون اول : مارکر بر اساس وزن مولکولی پروتئین (۶۶,۲ , ۴۵ , ۳۵ , ۲۵ , ۱۸,۴, ۱۴,۴ کیلو دالتون)، شماره بالای ستون ها نشانه شماره آزمایش است. ۱) IPTG ۰/۵ میلی‌مولار۲) لاکتوز۲ ۰/ ٪ ۳) IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و لاکتوز ۲ ۰/ ٪ ۴) IPTG ۱ میلی‌مولار۵) IPTG ۱ میلی‌مولار و لاکتوز ۲ ۰/ ٪ .

بحث:

نظر به اهمیت اینترفرون بتا در درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری MS تولید بهینه پروتئین فوق ضروری به نظر می‌رسد. در ابتدا اینترفرون بتا از خون اسب گرفته می‌شد. اما میزان اینترفرون بتای به دست آمده بسیار ناچیز بود به طوری که ۹۰/۰۰۰ واحد خون برای به دست آوردن ۱ گرم اینترفرون مورد نیاز بود، هم‌چنین به دلیل مشکل بودن روش‌های خالص سازی و آلودگی‌های بالقوه خطرناک که اغلب به طور کامل حذف نمی‌شوند و از طرفی آلرژن بودن پروتئین‌های حیوانی برای انسان و امکان بروز اثرهای جانبی، موارد استفاده از این پروتئین دارویی بسیار محدود بود. با گسترش فن‌آوری DNA نوترکیب، ژن اینترفرون بتا در میزبان‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی کلون شد. پروتئین‌های نوترکیب درمقایسه با پروتئین‌هایی که از منابع طبیعی تهیه می‌شوند، ارزان‌تر و سالم‌تر هستند، در مقیاس بیش‌تر تولید می‌شوند و اثرهای جانبی کم‌تری دارند (۱۴).

باکتری اشریشیاکلی به دلیل تکثیر سریع و نیازهای تغذیه‌ای ساده و ارزان به‌طور گسترده به عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱) اما چون قادر نیست تغییرهای پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون را انجام دهد استفاده از آن برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی دارای محدودیت می‌باشد . اینترفرون بتا که توسط *Escherichia coli* تولید شده Interferon β-1b نام داشته و در حال حاضر کاربرد درمانی دارد (۳) .Interferon β-1b یک متیونین کم‌تر از فرم طبیعی آن داشته و سیستئین شماره ۱۷ آن با سرین جایگزین شده است و پایداری بیش‌تری دارد. از آنجا که *Escherichia coli* فاقد آنزیم‌های لازم برای گلیکوزیلاسیون می‌باشد پروتئین فوق فاقد زنجیره کربوهیدرات موجود در پروتئین طبیعی می‌باشد(۱۵). مطالعه‌ها نشان داده که زنجیره قندی اینترفرون بتای گلیکوزیله برای تاخوردگی صحیح و یا خواص بیولوژیکی آن ضروری نمی‌باشد(۲۲) .این ویژگی سبب می‌شود که بتوان از باکتری اشریشیاکلی به عنوان میزبان ترجیحی جهت تولید اینترفرون بتا استفاده نمود . لازم به ذکر است که تولیدInterferon-β دراین میزبان به صورت انکلوژن بادی می‌باشد (۲۵) و این موضوع سبب می‌شود که مراحل استخراج و خالص سازی این پروتئین تسهیل گردد. طبق گزارش‌های حاصل از مطالعه‌های گذشته ، سیستم‌های بیانی مختلفی برای بیان اینترفرون بتای نوترکیب در *Escherichia coli* استفاده شده و میزان تولید اینترفرون بتای نوترکیب همواره کم بوده است (۱۶،۱۲،۱۰).

تاکنون تلاش های زیادی برای بهینه سازی و افزایش مقیاس تولید پروتئین‌های نوترکیب صورت گرفته است(۱۴). بهینه سازی مراحل مختلف فرایند تولید داروهای پروتئینی نوترکیب سبب می‌شود که این داروها

Archive of SID
www.SID.ir

با قیمت ارزان‌تر در اختیار بیماران قرار گیرد. به این منظور کارهای زیادی مانند بهینه سازی وکتور بیانی، بهینه سازی شرایط تولید، افزایش قدرت تولیدکنندگی سلول و بهینه سازی محیط کشت برای بهبود بیان پروتئین IFN-β صورت گرفته است (۹).

در این تحقیق، از باکتری *Escherichia coli* حاوی پلاسمید *pET* نوترکیب، که دارای پروموتور *lac* می‌باشد، برای تولید پروتئین اینترفرون بتا استفاده شد و تأثیر لاکتوز و IPTG بر میزان بیان ژن اینترفرون بتا ، بررسی گردید.

هم لاکتوز و هم IPTG می‌توانند بیان پروتئین‌های نوترکیب را، توسط پروموتر *lac* در باکتری اشریشیاکلی القاء کنند. با این وجود، راه‌های ورود آن‌ها به درون سلول و روش تأثیرشان متفاوت است. اول این که، لاکتوز با کمک *lac* permease وارد سلول می‌شود، در صورتی که IPTG به روش انتشار وارد سلول می‌شود. دوم این که، لاکتوز قبل از اتصال به پروتئین مهار کننده *lac* باید توسط بتاگالاکتوزیداز، به الولاکتوز تبدیل شود. در حالی کهIPTG بدون هیچ تغییری، به طور مستقیم به پروتئین مهار کننده *lac* متصل می‌شود (۵).

در این مطالعه، با هدف افزایش دادن میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا و کاهش هزینه IPTG، بخشی ازIPTG با لاکتوز جایگزین گردید. همان‌طورکه در شکل۱ نشان داده شده است، میزان بیان پروتئین اینتر فرون بتا ۱ بی با استفاده از ۰/۲ ٪ لاکتوز وIPTG ۰/۵ میلی‌مولار به‌طور هم‌زمان، نسبت به هر کدام از القاءکننده‌ها به تنهایی، افزایش داشت و برابر با ۳۴٪ کل پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری اشریشیاکلی نوترکیب بود (جدول ۱).

نتیجه‌گیری:

در این مطالعه بیش‌ترین میزان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در شرایطی حاصل گردید که بخشی ازIPTG با لاکتوز جایگزین گردید. به نظر می‌رسد که حضور هم‌زمان هر دو القاءکننده، که با روش‌های متفاوتی وارد سلول می‌شوند سبب می‌شود که غلظت درون سلولی آن‌ها افزایش یابد و در نتیجه بیان ژن مورد نظر نیز افزایش یابد. به طور خلاصه با استفاده ازاین روش میزان بیش‌تر پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با هزینه کم‌تر تولید شد. این روش می‌تواند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب دیگر نیز مورد بررسی و استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری:

بدین‌وسیله از تمامی همکاران محترم مرکز رشد دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت فراهم نمودن امکانات و تجهیزات لازم برای این پژوهش کمال تشکر را داریم.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Antonetli FA, Comparision of biological activity of two recombinant IFN beta preparations used in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis.J Interferon cytokine,2002;22(12):1181-4.
2. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, et al. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 2 and high virus load. Intern Med, 2010; 49(11): 965-70.
3. Bentley WE, Davis RH, Kompala DS, Dynamics of CAT expression in *E. coli*. Biotechnol Bioeng, 1991;38:749–60.
4. Brickel maier M. Elisa methods for the analysis of antibody responses induced in multiple Sclerosis patient treated with recombinant Interferon-β. J Immunol methods, 1999; (1-2):121-35.
5. Donovan RS, Robinson CW, Glick BR, Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. J Ind Microbiol 1996;16:145–54.
6. Foor F, Morin N, Bostian KA. Production of Ldihydroxy phenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*. Appl Environ Microbiol 1993;59:3070–5.
7. Goldberg LD, Edwards NC, Fincher C, Doan QV, Al-Sabbagh A, Meletiche DM. Comparing the cost-effectiveness of disease-modifying drugs for the first-line treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. J Manag Care Pharm, 2009;15(7): 543-55.
8. Haasbach E, Droebner K, Vogel AB, Planz O. Low-dose interferon Type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses in vitro and in vivo. J Interferon Cytokine Res, 2011; 31(6): 515-25.
9. Han YK, Koo TY, Lee GM. Enhanced interferonbeta production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. Biotechnol Prog, 2009; 25(5): 1440-7.
10. Itoh S, Mizukimi T, Matsumoto T, Tatsunari N, Satto A, Efficient expression in *Escherichia coli* of a mature and modified human Interferon-β. DNA, 1984; 3(2):157-165.
11. Lin W,High level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *E.coli*.J Chem Biotechnol,2001;76:1030-1037.
12. Mashko S V, Veikjo V P, Lapidus A L , Lebedeva MI,TGATG vector: A new expression system for cloned foreign genes in *E. coli* cells. Gene, 1990; 88:121-126.
13. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. Joint Bone Spine, 2009; 76(5): 464-73.
14. Muller N, Derouazi M, Van TF, Wulhfard S, Hacker DL, Jordan M, et al. Scalable transient gene expression in Chinese hamster ovary cells in instrumented and non-instrumented cultivation systems. Biotechnol Lett, 2007; 29(5): 703-11.
15. Pallarol J,Two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis of proteins.Method in molecular Biology,1984;1:88-88.
16. Porter A G, Bell L D, Adair J, Novel modified β- Interferons: gene cloning, expression, and biological activity in bacterial extracts. DNA,1986; 5(2)137-148.
17. Runkel L, Meier W, Pepinsky R, Karpusas M.Structural and functional difference between Glycosylated and nonglycosylated form of human interferon beta.Pharmaceutical Research,1998;15(4).
18. Sambrook J, Fritsch EJ, Molecular cloning a laboratory manual, 2002.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Sims TL, McGee M, Williams RF, Myers AL,Tracey L, Hamner JB, et al. IFN-beta restricts tumor growth and sensitizes alveolar rhabdomyosarcoma to ionizing radiation. Mol Cancer Ther, 2010; 9(3): 761-71.
20. Tabor S. A bacteriophage T7 RNA Polymerase promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. J PNAS USA,1985; 82:1074-1078.
21. Taylor KL, Leaman DW, Grane R, Mechti N,Borden EC, Lindner DJ. Identification of interferon-beta-stimulated genes that inhibit angiogenesis in vitro. J Interferon Cytokine Res, 2008; 28(12): 733-40.
22. Utsumi j,Ogama EM,Nagahata T,Kasamak.Carbohydrate dependent biological activities of glycosylated human Interferon β on human Hepatoblastoma cell invitro. Microbial Immunol,1995;39(1):81-86.
23. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M,Zivadinov R. Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis. Expert Opin Biol Ther, 2008; 8(9): 1435-47.
24. Wood TK, Peretti SW, Effect of chemically induced, cloned gene expression on protein synthesis in *E. coli*. Biotechnol Bioeng, 1991;38:397–412.
25. Zean R, Knauf M, Croze E. The use of zwttergent 3-14 in the purification of recombinant human IFN β -.J of Interferon and cytokine,1995;15:31-37.

Archive of SID

www.SID.ir