

Research Paper

Optimization of PET Expression Vector for Fusion of Recombinant Protein and Elastin-Like Polypeptide Biopolymer



Mohammad Reza Soleyman¹, Mostafa Khalili^{2,3}, Ali Reza Soleiman Meiguni⁴, *Maryam Baazm^{5,6}

1. Department of Biotechnology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.
3. Blood Transfusion Center, Arak, Iran.
4. Department of Management, Yadegar Emam Khomeini Branch, Islamic Azad University, Shahre Rey, Iran.
5. Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
6. Cellular and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.



Citation: Soleyman M, Khalili M, Soleiman Meiguni A, Baazm M. [Optimization of PET Expression Vector for Fusion of Recombinant Protein and Elastin-Like Polypeptide Biopolymer (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2019; 22(5):44-55. <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.44>

<https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.44>



Article Info:

Received: 18 May 2019

Accepted: 27 Aug 2019

Available Online: 01 Dec 2019

Key words:

Elastin-Like
Polypeptide,
Recombinant protein,
Protein fusion

ABSTRACT

Background and Aim recombinant DNA technique is a powerful and appropriate method for the production of protein biopolymers with specificity in amino acid sequence and spatial chemistry. Elastin-Like Polypeptide (ELP) is a biocompatible, biodegradable and non-immunological biopolymer used in various biotechnology studies. The ELP tag is a cheap, fast and non-chromatographic technique for purifying target proteins. In this study, pET expression vector was designed for the combination of ELP gene sequences and target recombinant protein in order to produce recombinant fusion protein with the ELP tag.

Methods & Materials MOD gene was transformed to E. coli-BL21 (DE3) cells after designing and synthesis among the XbaI and XhoI restriction sites in the pET-32a (+) vector of the clone. Then, colonies were isolated based on plasmid size and examined by cutting using restriction enzymes. The final recombinant colonies was verified using polymerase chain reaction method and DNA sequencing.

Ethical Considerations The Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences approved all ethical considerations of working on laboratory animals (Code: 92-146-11).

Results Replacing the MOD sequence in the pET-32a vector (+) eliminated the components expressing the fusion tags (Thioredoxin, Histidine, and S-tag), the identification site of protease enzyme (tobacco etch virus), and multiple cloning site. In addition, it added specific restriction enzyme identification sequences of ELP gene and target gene. As a result, in the optimized pET-MODvector, 466 nucleotides reduced in size and the secondary structure was improved.

Conclusion Considering the improvement of spatial structure and reduction of pET-MOD vector size, as well as the possibility of the fusion of recombinant protein with the ELP tag, it is possible to use this vector for ELPylation of the target protein.

Extended Abstract

Introduction

E

lastin-Like Polypeptides (ELPs) are a group of temperature-sensitive biopoly-

mers with various biotechnological and biomedical applications [6]. ELP is a component of temperature-sensitive synthetic biopolymers, with its solubility dependent on temperature change; under the Transition temperature (T_t), ELP is soluble in aqueous medium and accumulates in the form of self-assembly with increased solution temperature.

* Corresponding Author:

Maryam Baazm, PhD.

Address: Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Tel: +98 (916) 6621131

E-mail: dr.baazm@arakmu.ac.ir

By binding the protein at the gene level to the ELP, the resulting aggregated proteins will have the same properties [7]. Due to the thermal sensitivity of the ELP molecule, purification by chromatography is not required for protein purification [5]. Studies to produce the fusion of recombinant protein bound to the ELP tag, as well as the oligomerization of ELP, require several cloning steps in the nonspecific vector and re-subcloning [13, 15]. Therefore, in this study, we optimized the pET expression vector, the pET-MOD specific vector, to oligomerize ELP, as well as to produce recombinant ELP tag fusion protein for biotechnological and pharmaceutical applications. Accordingly, the inexpensive purification of the recombinant protein by the Inverse Transition Cycling (ITC) technique and the targeted drug conjugate delivery, etc. will be generated.

Materials and Methods

The MOD gene was designed with the structure required for the cloning, expression, and purification of the recombinant protein. Then, the XbaI and XhoI restriction enzyme cleavage sites were added at the 5' and 3' ends, respectively. The prediction of secondary structures and stability of mRNA expressed in pET-32a(+) and pET-MOD were evaluated by the centerfold server. Additionally, the G+C content of these two fragments was evaluated by Rare Codon Analysis Tools. The designed gene was synthesized by the Biomatic Spa company. The designed pUC-57 gene carrier was cleaved by XbaI and XhoI enzymes to release the synthetic MOD fragment.

The pET-32a(+) vector was also cleaved by XbaI and XhoI enzymes and dephosphorylated by alkaline phosphatase to linearize the plasmid. The purification of linearized plasmid and MOD cut DNA was performed by agarose gel purification kit. The pET vector and the MOD extension fragment were joined by T4 DNA ligase to form the pET-MOD vector. The obtained vectors were heat-transfected to 100 μ L of E.coli-BL21 (DE3) cells transfected using CaCl₂; then, the bacteria were spread on a cell culture plate containing Luria-Bertani medium and 100 μ g/mL ampicillin. They were incubated overnight at 37°C. After transformation, recombinant colonies were separated based on plasmid size. Furthermore, the positive colonies were examined for the presence of insert fragment using restriction enzyme cleavage analysis. The PCR colonization technique conducted the final confirmation of recombinant colonies, and the PCR product was confirmed by 1% agarose gel and DNA sequencing.

Results

Predicting mRNA secondary structure suggested that the optimization of the pET expression vector could prevent the formation of a stable secondary structure. The free energy of the second mRNA structure also changed from -122.8 to -20. Besides, the percentage of the G+C content of these two genes was similar and in the ideal range (50%-51%). After the enzymatic digestion of pUC-57, the 111bp fragment was released from the MOD synthesized gene; then, it was ligated into the XbaI and XhoI sequences and replaced with the 577bp sequence from the pET-32a(+) sequence.

In this optimized nucleotide sequence, genes expressing amino acid sequences, including Trx-Tag with His-Tag (thrombin protease enzyme digestion site), S-tag (TEV protease enzyme digestion site), and multiple cloning site (multiple cloning site) followed, were deleted. The pET-32a(+) vector length decreased from 5900 bp to 5434bp (466bp decrease). Furthermore, the identification site of the restriction enzymes Sfi-I, BamH-I, and EcoR-I were replaced with the pET-MOD sequence. By the cleavage of the BamH-I and EcoR-I sequences, adherent sequences were created to bind the target protein gene with a similar tail. After the cleavage of the pET-MOD vector with Sfi-I, a linear plasmid with adherent ends consistent with the adherent end of the ELP gene cut by Bgl-I and pflM-I was generated. The nucleotide sequence encoding GGSGGSG (glycine + cysteine) was added to the MOD sequence, as a flexible linker region between the target protein sequence and the ELP tag.

Moreover, the WYWYW (tryptophan + tyrosine) coding nucleotide sequence was added to the MOD sequence to estimate recombinant protein concentration. The recombinant plasmid was purified from the transformed cell and identified based on plasmid size. Eventually, colony-PCR was performed to confirm the recombinant pET-MOD plasmid. Besides, the presence of 160bp band on 1% agarose gel and the sequencing of the resulting gene revealed the accuracy of cloning. The resulting pET-MOD plasmid sequence is available (Code: KP834588.1).

Discussion

The production of large amounts of the bioactive fusion protein is a critical issue in biotechnology, and ELP fusion is an appropriate choice for this purpose [21]. The ELP tag, like many other tags, might reduce the bioactivity of the fusion protein based on the size and orientation of it [23]. Studies on the production of recombinant protein fusion and the ELP tag, have used the full-length synthesis of the target gene to put these

genes together. As a result, that method will be costly, and the sequence development will be complex and time-consuming (due to its timely nature) [24].

Alternatively, primary cloning in the non-expression vector, followed by sub-cloning, was applied. This method is also time-consuming, and because of the non-specificity of vectors, oligomerization will be complicated [25, 26]. The present study, for the first time, used the pET vectors and the MOD synthetic gene, to design and generate the pET-MOD specific vector in high volumes of the bioactive fusion protein with the oligomerization ability of the ELP tag. The synthetic MOD gene was designed based on the following requirements: 1. Reduce the sequence length of the pET-MOD vector by omitting the unnecessary sequence in the pET-32a(+) base vector; 2. Add Sfi-I locus sequence sequences that complement the inserted gene resulting from the oligomerization of the ELP gene generated by the RDL technique. Furthermore, it will reduce the complexity of the oligomerization of the ELP gene in non-specific vectors; 3. Incorporate the sequence identification of BamHI and EcoRI to the sequence integration and construction of fusion protein with ELP; 4. Incorporate a nucleotide sequence box encoding a flexible linker between the ELP tag and the target protein. This process helps to reduce the spatial interference on recombinant protein activity, particularly concerning its effect on the function of ELP5 tag fusion growth factors. The incorporation of the nucleotide sequence box encoding aromatic side-chain amino acids to absorb the UV light of the recombinant protein (to calculate protein concentration), particularly for proteins lacking aromatic amino acids [29].

Conclusion

The pET-MOD properties highlight the appropriate application of this vector for purifying recombinant protein and generating fusion protein with ELP tag (for use as a scaffold containing elastin as part of extracellular matrix). Furthermore, considering the presence of growth factors based on the study purpose, it is recommended for various studies, including wound healing research.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (code: 92-146-11).

Funding

This study received financial support from the Deputy for Research and Technology of this university.

Authors' contributions

Investigation and initial draft preparation: Mohammad Reza Soleyman and Mostafa Khalili; Initial draft preparation and data analysis: Ali Reza Soleiman Meiguni; Review & editing, supervision, project administration: Maryam Baazm.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy for Research and Technology of Arak University of Medical Sciences for their support.

بهینه‌سازی وکتور بیانی pET جهت فیوژن کردن پروتئین نوترکیب و بیوپلیمر پلی پپتید شبه‌الاستین

محمد رضا سلیمان^۱، مصطفی خلیلی^{۲*}، علیرضا سلیمان میگونی^۳، مریم باعزم^۴

۱. گروه بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۲. مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و پایگاه منطقه‌ای انتقال خون مرکزی، اراک، ایران.

۳. مرکز انتقال خون، اراک، ایران.

۴. گروه مدیریت، واحد یادگار امام، دانشگاه آزاد اسلامی، شهر ری، ایران.

۵. گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۶. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۸ اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۱۶ شهریور ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۳۹۸

زمینه و هدف: تکنیک DNA نوترکیب، یک روش قدرتمند و مناسب برای تولید بیوپلیمرهای پروتئینی با اختصاصیت در توالی آمینواسید و شیمی فضایی است. پلی پپتید شبه‌الاستین بیوپلیمری زیست‌سازگار، زیست‌تخریب‌پذیر و غیرایمونولوژیک است که در مطالعات گوناگون بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تک ELP یک تکنیک ارزان، سریع و غیر کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین‌های هدف است. در این مطالعه وکتور بیانی pET-MOD جهت کنار هم قرارگیری توالی ژن‌های ELP و پروتئین نوترکیب هدف، به منظور تولید پروتئین فیوژن نوترکیب به همراه تک ELP طراحی و ساخته شدند.

مواد و روش‌ها: ژن MOD پس از طراحی و سنتز در بین سایت برش XbaI و XhoI موجود در وکتور (+) pET-32a کلون، و به سلول‌های *E. coli*-BL21(DE3) ترانسفرم شد. سپس، کلنی‌ها بر اساس اندازه پلاسمید جداسازی و به وسیله برش توسط آنزیم‌های با اثر محدود، بررسی شد. تأیید نهایی کلنی‌های نوترکیب با استفاده از PCR و توالی‌یابی (DNA sequencing) انجام گرفت.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد ۱۱-۱۴۶-۹۲ تصویب شد.

یافته‌ها: جایگزینی توالی MOD در وکتور (+) pET-32a باعث حذف قطعات بیان‌کننده تگ‌های فیوژن Thioredoxin:TRX، His-tag، Histidine:His، سایت شناسایی هضم آنزیمی پروتئاز (TEV) و جایگاه کلونینگ چندگانه و اضافه کردن توالی‌های شناسایی آنزیم با اثر محدود اختصاصی ژن ELP و ژن هدف شد. در نتیجه در وکتور بهینه‌شده pET-MOD کاهش ۴۶۶ نوکلئوتید در سایز و بهبود ساختار ثانویه حاصل شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به بهبود ساختار فضایی و کاهش اندازه وکتور pET-MOD، و نیز امکان فیوژن کردن پروتئین نوترکیب با تک ELP،

کلیدواژه‌ها:

پلی پپتید شبه‌الاستین، پروتئین نوترکیب،

مقدمه

دارد: سنتز شیمیایی و تولید نوترکیب پروتئین. در سنتز شیمیایی پروتئین‌ها، افزایش میزان تولید و افزایش طول توالی آمینواسیدها به راحتی امکان‌پذیر نیست؛ اما تکنیک DNA نوترکیب دقت بالقوه‌ای برای تولید پلی پپتیدهای جدید با ویژگی مورد نظر و اختصاصیت بالا و مرتبط با توالی آمینواسیدی و شیمی فضایی دارد. سیستم نوترکیب بهترین رویکرد برای کاهش هزینه تولید پپتیدهای بلند و پروتئین است [۴، ۲].

توالی‌های کوتاه از نوکلئوتیدها (تا طول ۱۰۰ نوکلئوتید) می‌توانند توسط سنتز شیمیایی تولید و سپس برای کد کردن

بیوپلیمرهای طبیعی و مصنوعی دسته‌ای از مواد هستند که به عنوان داربست مهندسی بافت، ماتریکس انتقال دارو و سنسور انتقال‌دهنده در بیوسنسورها استفاده می‌شوند. پپتیدها جزء دسته جدیدی از بیوپلیمرها هستند، که ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع آن مورد توجه است. از این رو، پلیمرهای برگرفته از پروتئین به عنوان گروه جدیدی از مواد با پتانسیل بالا برای ساخت مواد زیست‌فعال در نظر گرفته می‌شوند [۲، ۱]. برای ساخت پروتئین دو استراتژی کلی وجود

* نویسنده مسئول:

دکتر مریم باعزم

نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح.

تلفن: ۶۶۲۱۱۳۱ (۹۱۶) ۰۹۸+

پست الکترونیکی: dr.baazm@arakmu.ac.ir

ITC^۴ و انتقال هدفمند، داروی کونژوگه و غیره تولید خواهد شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی کاربردی، میزبان *E. coli* سویه DH5a (Novagen, USA) pET- 32a (+) و پلاسمید (Invitrogen) برای انجام کلونینگ استفاده شد. همچنین از آنزیم‌های محدودالتر XhoI و SfiI، XbaI، آنزیم آلکان فسفاتاز ساخت شرکت DNA polymerase pfu و Fermentas، DNA T4 Ligase ساخت شرکت Vivantis در این تحقیق استفاده شد.

طراحی و ارزیابی بیوانفورماتیک ژن MOD

ژن MOD شامل توالی‌های نوکلئوتیدی شاین دلگرنو^۵ به عنوان کدون شروع ابتدایی، نواحی شناسایی آنزیم‌های محدودالتر، بعضی تگ‌ها و نواحی ارتباطی^۶ مورد نیاز برای کلونینگ، بیان و خالص‌سازی پروتئین نو ترکیب طراحی شد. سپس، سایت‌های برش آنزیم‌های محدودالتر XhoI و XbaI به ترتیب در انتهای ۵' و ۳' اضافه شدند. پیش‌بینی ساختارهای دوم و پایداری mRNA بیان‌شونده در pET-32a (+) و pET-MOD توسط سرور center fold^۷ ارزیابی شد. علاوه بر این، محتوای G+C این دو قطعه توسط Rare Codon Analysis Tools^۸ ارزیابی شد. ژن طراحی‌شده توسط شرکت بیوماتیک (Biomatik, Canada) سنتز شد.

ساب کلونینگ ژن MOD در وکتور بیانی (+) pET-32a

اصول مهندسی ژنتیک بر اساس اصول سمبروک و همکاران^۹ به کار گرفته شده است [۱۶]. pUC-57 حمل‌کننده ژن طراحی‌شده سنتزی MOD توسط شرکت بیوماتیک (Biomatik, Canada)، توسط آنزیم‌های XhoI و XbaI (Fermentas-Lithuania) برش خورده تا قطعه MOD سنتزی آزاد شود. وکتور pET-32a (+) نیز توسط آنزیم‌های XhoI و XbaI برش خورده و توسط آلکان فسفاتاز^۱ دفسفریله شد تا پلاسمید خطی شود. خالص‌سازی پلاسمید خطی‌شده و DNA برش‌خورده MOD توسط کیت تخلیص از ژل آگارز (Roche-Germany) انجام گرفت. وکتور pET و قطعه الحاقی MOD برش‌خورده (با نسبت ۱ به ۳ قطعه به وکتور) توسط T4 DNA ligase (Fermentas-Lithuania) به هم ملحق شدند تا وکتور pET-MOD حاصل شود.

وکتورهای حاصل از طریق روش شوک حرارتی (۳۹ درجه به مدت یک دقیقه) به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های (*E. coli*-

پلی‌پپتیدهای تکراری با وزن مولکولی موردنظر به صورت قطعه‌های بزرگ‌تر به یکدیگر ملحق شوند [۳]. در میان متدهای فراوان که به صورت متداول برای کنار هم قراردادن توالی‌های کوچک DNA با جهت‌گیری صحیح به کار می‌رود، اتصال مستقیم بازگشتی^۱ به عنوان یک روش سریع و مفید جهت تولید بیوپلیمرهای الیگومریک با وزن مولکولی موردنظر مفید است [۵]. اخیراً، پلیمرهای فراوانی جهت مصارف مهندسی بافت با استفاده از توالی‌های الاستین انسانی به عنوان زیرواحدهای ساختاری این بیوپلیمرها به کار گرفته شده‌اند که کنترل ویژگی‌های پلی‌پپتیدی آن در سطح سنتز شیمیایی و ژنتیکی امکان‌پذیر است [۶].

پلی‌پپتید شبه‌الاستین^۲ جزء بیوپلیمرهای مصنوعی حساس به دماست که از پنتاپپتیدهای تکراری (VPGXG)_n تشکیل شده‌اند. در این توالی X می‌تواند هر اسید آمینه‌ای به غیر از پرولین بوده و n عدد این تکرارهاست. حلالیت پلی‌پپتید شبه‌الاستین به تغییر دما وابسته است؛ به طوری که در زیر دمای تغییر^۳، ELP در محیط آبی محلول بوده و با افزایش دمای محلول به صورت خودآرایی تجمع می‌یابد [۷]. هنگامی که در سطح ژن ELP به پروتئین هدف ملحق می‌گردد، مجموع پروتئینی حاصل نیز دارای همان تغییر فاز برگشت‌پذیر خواهد شد. اکنون، به فرایند عامل‌دار کردن پروتئین‌های هدف با ملحق کردن ELP به -N ترمینال یا -C ترمینال پروتئین‌های هدف در سطح ژن، ELPylation گفته می‌شود [۹، ۸]. این تکنیک روشی غیرکروماتوگرافیکی و ارزان‌قیمت با صرفه‌جویی در زمان برای تخلیص پروتئین هدف است. در روش RDL، ژن‌های مونومری سنتز شده ELP به صورت معمول در وکتور کلونینگ همانند سیستم وکتور pUC الیگومریزه می‌شوند که این سیستم وکتور جهت بیان مناسب نیست. بنابراین، محصول ژنی الیگومریزه‌شده نهایی باید در وکتور بیانی کلون شود [۱۰، ۵].

در مطالعات مختلفی به منظور تخلیص غیرگروماتوگرافی و یا انتقال هدفمند، از پروتئین نو ترکیب فیوزن‌شده به تگ ELP استفاده شده است. از جمله این موارد می‌توان به تخلیص فاکتورهای رشد [۱۲، ۱۱]، آنزیم‌ها [۱۴، ۱۳]، و انتقال هدفمند داروها [۱۵]، اشاره کرد. با این حال، در این مطالعات به منظور تولید فیوزن پروتئین نو ترکیب متصل به تگ ELP و نیز الیگومریزه کردن ELP احتیاج به چندین مرحله کلونینگ در وکتور غیراختصاصی و ساب کلونینگ مجدد است. بنابراین در این مطالعه، با بهینه‌سازی وکتور بیانی pET و وکتور اختصاصی pET-MOD، جهت الیگومریزه کردن ELP و نیز تولید فیوزن پروتئین نو ترکیب متصل به تگ ELP، برای مصارف بیوتکنولوژی و دارویی مانند تخلیص ارزان‌قیمت پروتئین نو ترکیب با تکنیک

4. Inverse Transition Cycling (ICT)

5. Shine-Dalgarno

6. Linker

7. [Http://www.ncrna.org/centroidfold](http://www.ncrna.org/centroidfold)

8. [Http://www.genscript.com](http://www.genscript.com)

9. Fermentas-Lithuania

1. Recursive Directional Ligation (RDL)

2. Elastin Like Polypeptide (ELP)

3. Transition Temperature (TT)

MOD رها شده و با اتصال در محل توالی‌های XbaI و XhoI، جایگزین توالی ۵۷۷ bp از توالی (+) pET-32a شد. در این توالی نوکلئوتیدی بهینه‌شده، ژن‌های بیان‌کننده توالی‌های آمینواسیدی شامل Trx-Tag که با His-Tag (سایت شناسایی هضم آنزیمی پروتئاز ترومبین)، S-Tag (سایت شناسایی هضم آنزیمی پروتئاز TEV) و جایگاه کلونینگ چندگانه^{۱۰} دنبال شده است، حذف شد. طول وکتور (+) pET-32a از طول ۵۹۰۰ bp به ۵۴۳۴ bp کاهش یافت (۴۶۶ bp کاهش طول). همچنین سایت شناسایی آنزیم‌های محدودالایر BamH-I، Sfi-I و EcoR-I در توالی pET-MOD جایگزین شدند (تصویر شماره ۳).

با برش توالی‌های شناسایی BamH-I و EcoR-I، توالی‌های چسبنده برای اتصال ژن پروتئین هدف با دم چسبنده مشابه ایجاد شد. پس از برش وکتور pET-MOD با Sfi-I، پلاسمید خطی با انتهای چسبنده سازگار با انتهای چسبنده ژن ELP (حاصل از الیگومریزه‌شدن با روش RDL) که توسط Bgl-I و pflM-I برش خورده بود، تولید شد. توالی نوکلئوتیدی کدکننده GGSGGG (گلیسین + سیستئین) به عنوان ناحیه لینکر منعطف بین توالی پروتئین هدف و تگ ELP و توالی نوکلئوتیدی کدکننده WYWWYW (تریپتوفان + تیروزین) در جهت برآورد غلظت پروتئین نوترکیب، به توالی MOD اضافه شد (تصویر شماره ۴).

پلاسمید نوترکیب‌شده از سلول ترانسفرم‌شده تخلیص شد و تشکیل آن بر اساس اندازه پلاسمید مشخص شد (تصویر شماره ۵). نهایتاً برای تأیید پلاسمید نوترکیب Colony-PCR، pET-MOD انجام گرفت و حضور باند ۱۶۰ bp روی ژل آگارز یک درصد و توالی‌یابی ژن حاصل، صحت کلونینگ را نشان داد (تصویر شماره

DE3) BL21 مستعد شده با استفاده از CaCl₂ ترانسفرم شدند و سپس باکتری‌ها در پلیت کشت سلولی حاوی محیط کشت Luria-Bertani و ۱۰۰ میکروگرم / میلی‌لیتر آمپی‌سیلین گسترده شده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه انکوبه شدند. پس از ترانسفرماسیون، کلنی‌های نوترکیب بر اساس اندازه پلاسمید جداسازی شده [۱۷] و کلنی‌های مثبت به منظور بررسی حضور قطعه insert با استفاده از آنالیز برش با آنزیم‌های محدودالایر بررسی شدند. تأیید نهایی کلنی‌های نوترکیب از طریق تکنیک کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای 5'-GGGAATTGT- و 5'TCAGTGGTGGTGGTGGTG-3' GAGCGGATAAC-3' که برای این مطالعه طراحی شده بود انجام شد و محصول PCR با ژل آگارز یک درصد و توالی‌یابی DNA (DNA sequencing) تأیید شد.

یافته‌ها

طراحی و ارزیابی بیوانفورماتیک وکتور pET-MOD

پیش‌بینی ساختار دوم mRNA نشان داد بهینه‌سازی وکتور بیانی pET می‌تواند از تشکیل ساختار دوم پایدار جلوگیری کند (تصویر شماره ۱)، به صورتی که ساختار ساده و سست mRNA برای ترجمه مناسب باشد [۱۸]. انرژی آزاد ساختار دوم mRNA نیز از ۱۲۲/۸- به ۲۰- تغییر پیدا کرد. درصد محتوای G+C این دو ژن نیز مشابه و در محدوده ایده‌آل (۵۰-۵۱ درصد) قرار داشت (تصویر شماره ۲).

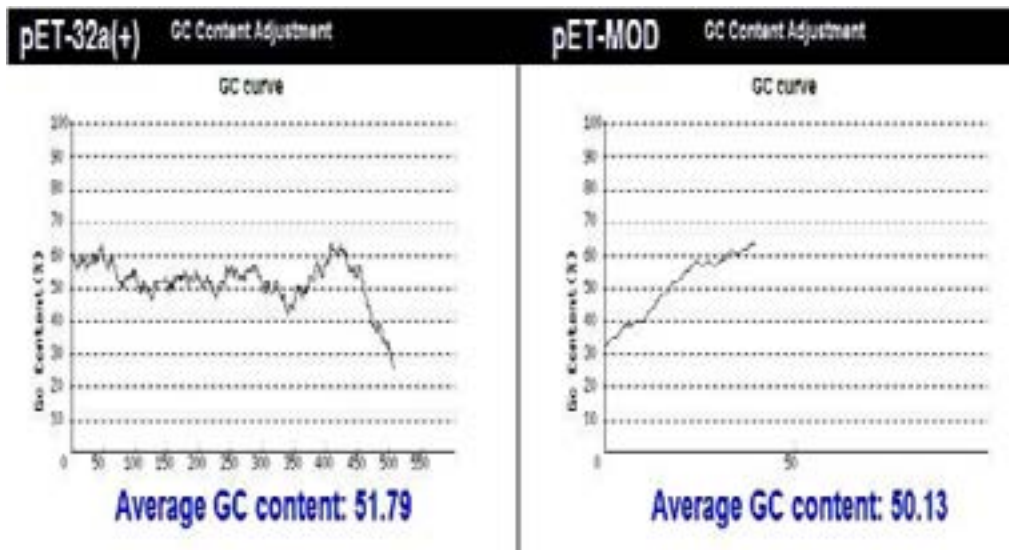
ساب کلونینگ ژن MOD و ساخت وکتور pET-MOD

پس از هضم آنزیمی pUC-57 که حاوی قطعه ژن MOD است، با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر، قطعه ۱۱۱ bp از ژن سنتزی

10. Multiple cloning site



تصویر ۱. ساختار دوم mRNA دو قطعه مابین نواحی شناسایی آنزیم‌های XhoI و XbaI: A. pET-32a(+). B. pET-MOD.



با کاهش طول ۴۶۶ bp و دارا بودن توالی‌های لازم برای تولید فیوژن پروتئین نوترکیب دارای دنباله تخلیصی ELP و توالی لازم برای الیگومریزه کردن ELP ساخته شد.

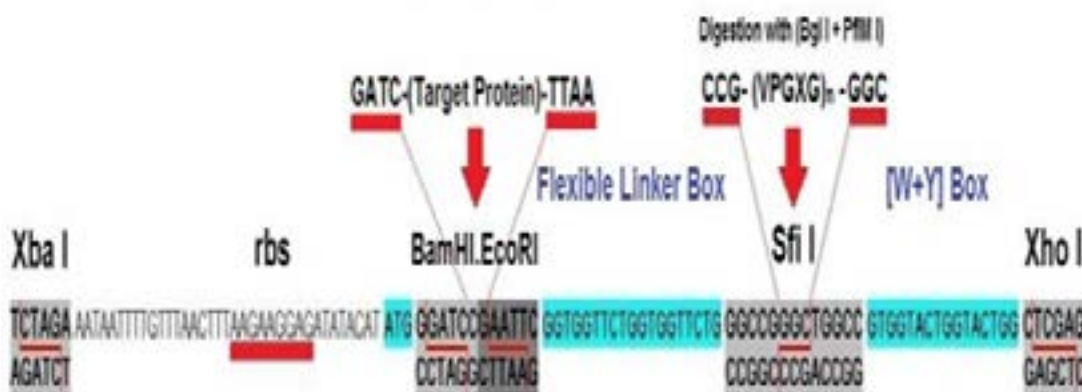
پلی‌پپتیدهای شبه‌الاستین دسته‌ای از بیوپلیمرهای حساس به دما با کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست‌پزشکی گوناگون هستند. ELP ویژگی‌های منحصربه‌فردی دارد از جمله اینکه می‌تواند به صورت ژنتیکی کد شود و از این طریق فرصت کنترل بر توالی آمینواسید و وزن مولکولی را فراهم می‌کند. دمای تغییر (Tt) مولکول ELP تحت کنترل فاکتورهای خارجی و داخلی همانند طول مولکول ELP قرار دارد. بنابراین طراحی ELP‌ها برای استفاده‌های ویژه امکان‌پذیر است. به علت تأثیرپذیری حرارتی مولکول ELP، خالص‌سازی به واسطه کروماتوگرافی برای تخلیص پروتئین نیاز نیست. از این گذشته، ELP زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌سازگار و غیرایمونولوژیک و غیرسمی است و می‌تواند به میزان زیادی بیان شود [۲۰، ۱۹]. تولید مقدار فراوان پروتئین

تصویر ۲. آنالیز محتوای G+C دو قطعه مابین دو سایت شناسایی XbaI و XhoI.

۶. توالی پلاسمید pET-MOD حاصل با کد KP834588/1 در دسترس است.

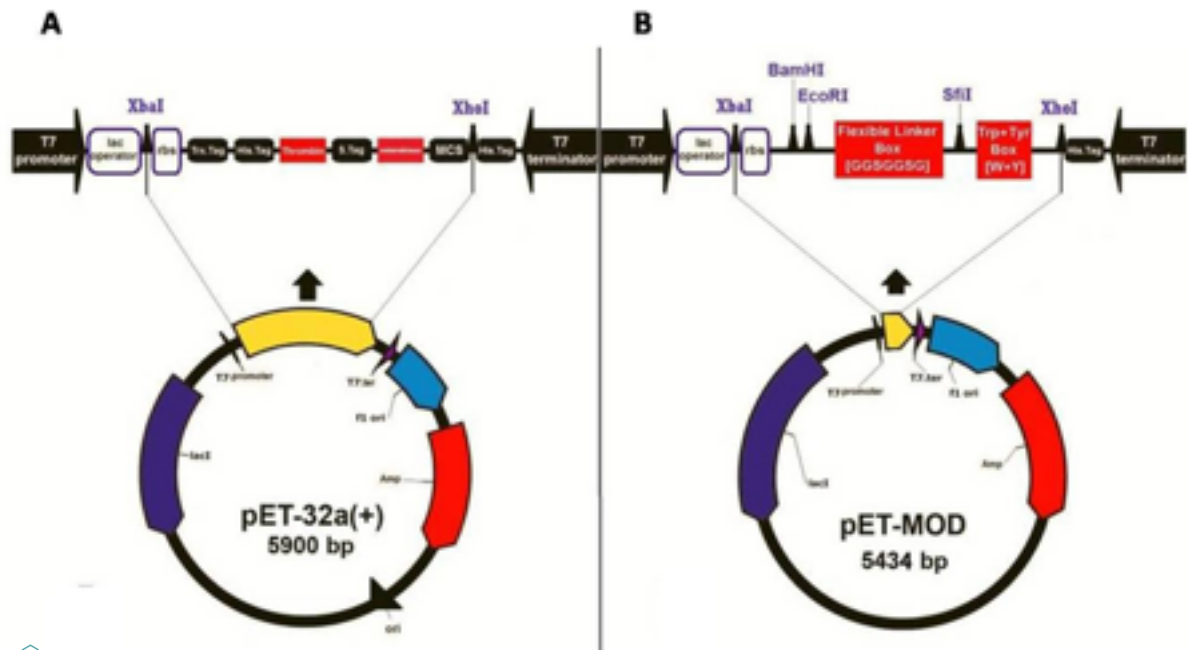
بحث

در این مطالعه، توالی ۱۱۱ bp طراحی شد که حاوی جایگاه برش برای تولید فیوژن پروتئین نوترکیب در کنار تگ ELP بود و نیز شامل جایگاه برش مورد نیاز برای الیگومریزه کردن ELP، توالی نوکلئوتیدی کدکننده GGSGGG (گلیسین + سیستمین) به عنوان ناحیه لینکر منعطف بین توالی پروتئین هدف و تگ ELP، توالی نوکلئوتیدی کدکننده WYWYW (تریپتوفان + تیروزین) در جهت برآورد غلظت پروتئین نوترکیب و سایر توالی‌های لازم برای بیان و خالص‌سازی پروتئین بود. این توالی پس سنتز مابین جایگاه برش XbaI و XhoI در وکتور بیانی pET-32a(+) کلون شد. در نتیجه وکتور pET-MOD،



تصویر ۳. شکل شماتیک از ژن سنتزی طراحی شده MOD. (rbs: ribosome binding site).





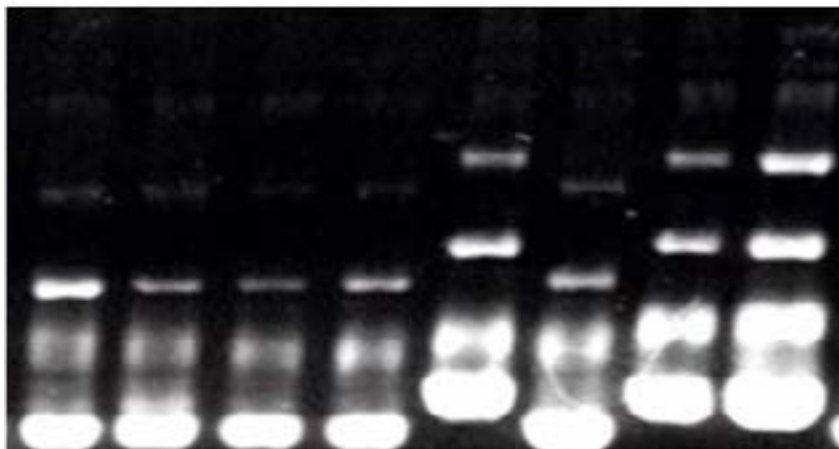
تصویر ۴. طرح شماتیک از تغییرات انجام گرفته در ساختار وکتور. A: pET-32a(+), B: pET-MOD

است بر اساس اندازه و جهت قرارگیری، همانند بسیاری از تگ‌ها، زیست‌فعالی پروتئین فیوژن شده را کاهش دهد [۲۳].

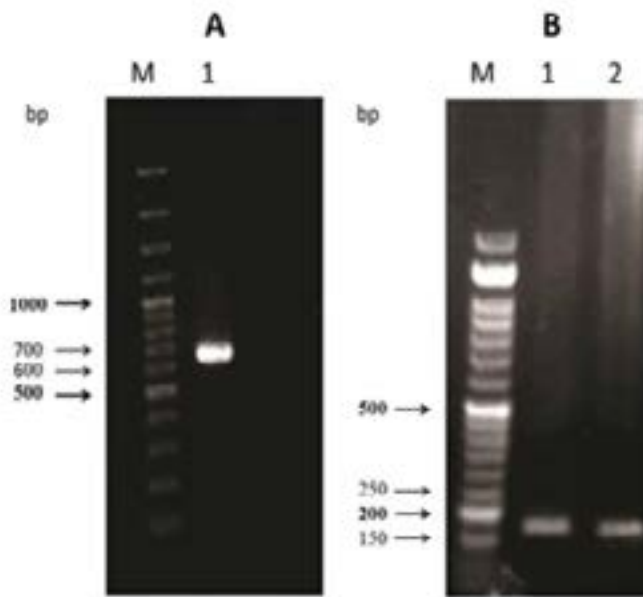
در مطالعات مختلفی که در زمینه تولید فیوژن پروتئین نوترکیب و تگ ELP، صورت گرفته است، به منظور کنار هم قراردادن این ژن‌ها در کنار هم محققان از روش‌های مختلفی از جمله سنتز طول کامل ژن موردنظر استفاده کردند، که این امر علاوه هزینه‌بر بودن، به خاطر طولانی بودن توالی زمان‌بر و دارایی پیچیدگی سنتز خواهد بود [۲۴]. در روش دیگر از کلون‌سازی

فیوژن زیست‌فعال، موضوع حیاتی در بیوتکنولوژی است و ELP فیوژن، انتخاب مناسبی برای این موضوع است. محل قرارگیری و جهت‌گیری ELP نسبت به پروتئین هدف، اثر مهمی بر فعالیت اختصاصی و میزان بیان پروتئین هدف دارد. هنگامی که ELP در C-ترمینال پروتئین هدف قرار گرفته باشد (Pro-ELP)، پروتئین هدف بیشتری در مقایسه با هنگامی که ELP در N-ترمینال پروتئین هدف قرار دارد (ELP-Pro) به دست می‌آید [۲۱]. همچنین میزان تولید پروتئین ELP‌های بلند کمتر از میزان انواع کوتاه آن است [۲۲]. مشخص شده است که تگ ELP ممکن

1 2 3 4 5 6 7 8



تصویر ۵. الکتروفورزیس بر روی ژل آگارز ۰/۶ درصد برای جست‌وجوی پلاسمید نوترکیب بر اساس اندازه. پلاسمید pET-32a(+) با وزن (۵/۹ kbp) را می‌توان در لاین‌های ۵، ۷ و ۸ دید و سایر لاین‌ها حاوی پلاسمید نوترکیب pET-MOD با وزن (۵/۴ kbp) هستند.



تصویر ۶. الکتروفورز بر ژل آگارز یک درصد، حاصل از کلنی PCR وکتور بیانی pET. A: M: 100 bp DNA ladder، لاین ۱، 626bp محصول PCR وکتور (+) pET-32a. B: M: 50 bp DNA ladder، لاین ۱ و ۲، ۱۶۰ bp محصول PCR وکتور pET-MOD.

استفاده در تولید مقادیر بالای پروتئین فیوژن زیست فعال با قابلیت الیگومریزه کردن تگ ELP، طراحی و ساخته شد. طراحی ژن سنتتیک MOD بر اساس نیازهای زیر انجام گرفته است: ۱. کاهش طول توالی وکتور pET-MOD از طریق حذف توالی غیر ضرور موجود در وکتور پایه (+) pET-32a، به منظور کاهش بار اضافی بر سلول میزبان وکتور و در نتیجه افزایش تولید پروتئین فیوژن مورد نظر در میزبان سلولی؛ ۲. اضافه کردن توالی محل شناسایی Sfi-I که مکمل ژن insert حاصل از الیگومریزه شدن ژن ELP تولید شده با تکنیک RDL است و پیچیدگی ناشی از الیگومریزه کردن ژن ELP را در وکتورهای غیر اختصاصی کاهش خواهد داد؛ ۳. الحاق توالی شناسایی BamHI و EcoRI به منظور الحاق توالی و ساخت پروتئین فیوژن با ELP؛ ۴. الحاق جعبه توالی نوکلئوتیدی کدکننده لینکر انعطاف پذیر بین تگ ELP و پروتئین هدف، به منظور کاهش تداخل فضایی بر فعالیت پروتئین نو ترکیب، به ویژه در مورد تأثیر بر عملکرد فاکتورهای رشد فیوژن شده با تگ ELP؛ ۵. الحاق جعبه توالی نوکلئوتیدی کدکننده آمینواسیدها با زنجیره جانبی آروماتیک برای جذب نور UV پروتئین نو ترکیب (به منظور محاسبه غلظت پروتئین)، به ویژه در مورد پروتئین های فاقد اسید آمینه های آروماتیک [۲۹].

علاوه بر این، pET-MOD دارای توالی 6XHis-Tag در انتهای تگ C ELP در ساختار بیانی منطبق با کدون پروتئین فیوژن است. این ساختار از شش آمینواسید هستیدین متوالی تشکیل شده است که امکان تخلیص پروتئین نو ترکیب فیوژن با استفاده از رزین ها را فراهم می کند. به علاوه، حضور تگ هیستیدینی امکان استفاده از آن را به عنوان اپی توپ جهت تشخیص پروتئین

ابتدایی در وکتور غیر بیانی و سپس ساب کلونینگ استفاده شده است که این روش نیز زمان بر و نیز به علت غیر اختصاصی بودن وکتورها، در الیگومریزه کردن پیچیدگی دارد [۲۶، ۲۵].

در مطالعه انجام شده توسط عمومی و همکاران، برای ساخت کاست 8xELP-Intein-hEGF به صورت چند مرحله ای سه توالی مورد نظر در pUC57 کلون شد و پس از تکمیل شدن سازه در وکتور بیانی pET15b بیان شد [۲۷] که با توجه به چند مرحله ای بودن بر پیچیدگی کار می افزاید، علاوه بر این توالی 8xELP در خارج از وکتور طراحی و سپس کلون شد. در حالی که در وکتور pET-MOD امکان الیگومریزه کردن و تنظیم طول مورد نظر بر اساس نیاز ممکن است. همچنین با توجه سایت برش و توالی های در نظر گرفته شده در وکتور طراحی شده، امکان استفاده از این وکتور همانند وکتور تجاری جهت کلون کردن انواع پروتئین های نو ترکیب در کنار تگ ELP، ممکن است.

گروه تحقیقاتی ما، در مطالعات قبلی از وکتور دستکاری شده به منظور الیگومریزه کردن ELP استفاده کردند [۲۸]. ولی با توجه برخی از معایب، از جمله احتیاج به وجود اسید آمینه های دارای زنجیره جانبی آروماتیک در ساختار پروتئین نو ترکیب، به منظور محاسبه غلظت پروتئین به وسیله جذب نور UV و نیز نبود طراحی لینکر منعطف بین پروتئین نو ترکیب و تگ ELP، احتمال اختلال در عملکرد پروتئین نو ترکیب، به ویژه در صورتی که این پروتئین فاکتور رشد باشد، وجود داشت.

در این مطالعه برای اولین بار، با استفاده از وکتورهای pET و ژن سنتزی MOD، وکتور اختصاصی pET-MOD به منظور

نویسندگان کمال قدردانی و امتنان را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک دارند.

با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال یا کونژوگه با آنزیم nitrilotri-acetic acid-nickel فراهم می‌کند. 6XHis-Tag به صورت نرمال بر ساختار و فعالیت پروتئین نوترکیب تأثیرگذار نیست [۳۰].

با توجه به امکان pET-MOD در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از روش ترکیبی تگ ELP و تگ‌های هیستیدین و در نتیجه خالص‌سازی پشت سرهم و کامل‌کننده همدیگر، امکان حضور آلودگی در محلول نهایی به صورت محسوسی کاهش خواهد یافت.

با توجه به ویژگی‌های pET-MOD، استفاده از این وکتور جهت خالص‌سازی پروتئین نوترکیب و نیز تولید فیوژن پروتئین با تگ ELP، به منظور استفاده به عنوان داربست حاوی الاستین به عنوان بخشی از ماتریکس خارج سلولی از یک طرف و از طرف دیگر وجود فاکتورهای رشد بر اساس مطالعه موردنظر، جهت مطالعات مختلف از جمله ترمیم زخم پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، طراحی و ساخت پلاسمید pET-MOD (۵/۴ Kbp) با جایگزینی بخشی از توالی‌های (+) pET-32a به منظور تولید وکتور مناسب، در جهت ملحق کردن ژن ELP و پروتئین هدف و تولید بیومتریال فعال در مطالعات آتی انجام گرفت.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد ۹۲-۱۴۶-۱۱ تصویب شد.

حامی مالی

این مقاله با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

محمد رضا سلیمان و مصطفی خلیلی: تحقیق و بررسی، نگارش پیش‌نویس؛ علیرضا سلیمان میگونی: نگارش پیش‌نویس، تحلیل؛ مریم باعزم: نظارت، مدیریت پروژه، ویراستاری و نهایی‌سازی نوشت.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر نداشتند.

تشکر و قدردانی

References

- [1] Le DH, Sugawara-Narutaki A. Elastin-like polypeptides as building motifs toward designing functional nanobiomaterials. *Mol Syst Des Eng*. 2019; 4(3):545-65. [DOI:10.1039/C9ME00002J]
- [2] Kouhi A, Yao Z, Zheng L, Li Z, Hu P, Epstein AL, et al. Generation of a monoclonal antibody to detect Elastin-Like Polypeptides. *Biomacromolecules*. 2019; 20(8):2942-52 [DOI:10.1021/acs.biomac.9b00503] [PMID]
- [3] Duro-Castano A, Conejos-Sánchez L, Vicent MJ. Peptide-based polymer therapeutics. *Polymers*. 2014; 6(2):515-51. [DOI:10.3390/polym6020515]
- [4] Coenen AMJ, Bernaerts KV, Harings JAW, Jockenhoevel S, Ghazanfari S. Elastic materials for tissue engineering applications: Natural, synthetic, and hybrid polymers. *Acta Biomaterialia*. 2018; 79:60-82. [DOI:10.1016/j.actbio.2018.08.027] [PMID]
- [5] Meyer DE, Chilkoti A. Genetically encoded synthesis of protein-based polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: Examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules*, 2002; 3(2):357-67. [DOI:10.1021/bm015630n] [PMID]
- [6] Fletcher EE, Yan D, Kosiba AA, Zhou Y, Shi H. Biotechnological applications of elastin-like polypeptides and the inverse transition cycle in the pharmaceutical industry. *Protein Expr Purif*. 2018; 153:114-20. [DOI:10.1016/j.pep.2018.09.006] [PMID]
- [7] Kuna M, Mahdi F, Chade AR, Bidwell GL. Molecular size modulates pharmacokinetics, biodistribution, and renal deposition of the drug delivery biopolymer elastin-like polypeptide. *Sci Report*. 2018; 8(1):1-12. [DOI:10.1038/s41598-018-24897-9] [PMID] [PMCID]
- [8] Floss DM, Schallau K, Rose-John S, Conrad U, Scheller J. Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application. *Trends Biotechnol*. 2010; 28(1):37-45. [DOI:10.1016/j.tibtech.2009.10.004] [PMID]
- [9] Floss MD, Conrad U, Rose-John S, Scheller J. ELP-Fusion technology for biopharmaceuticals. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals. In: Stefan R. Schmidt. Applications and Challenges. New Jersey: John Wiley & Sons; 2013. [DOI:10.1002/9781118354599.ch14]
- [10] McDaniel JR, Mackay JA, Quiroz FG, Chilkoti A. Recursive directional ligation by plasmid reconstruction allows rapid and seamless cloning of oligomeric genes. *Biomacromolecules*. 2010; 11(4):944-52. [DOI:10.1021/bm901387t] [PMID] [PMCID]
- [11] Zhu Y, Hoshi R, Chen S, Yi J, Duan C, Galiano RD, et al. Sustained release of stromal cell derived factor-1 from an antioxidant thermoresponsive hydrogel enhances dermal wound healing in diabetes. *J Control Release*. 2016; 238:114-22. [DOI:10.1016/j.jconrel.2016.07.043] [PMID]
- [12] Koria P, Yagi H, Kitagawa Y, Megeed Z, Nahmias Y, Robert Sheridan R, et al. Self-assembling elastin-like peptides growth factor chimeric nanoparticles for the treatment of chronic wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(3):1034-9. [DOI:10.1073/pnas.1009881108] [PMID] [PMCID]
- [13] Ke C, Xiong H, Zhao C, Zhang Z, Zhao X, Rensing C, et al. Expression and purification of an ArsM-elastin-like polypeptide fusion and its enzymatic properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019; 103(6):2809-20. [DOI:10.1007/s00253-019-09638-w] [PMID]
- [14] Akhiani RC, Patel A, Patel MJ, Dedania S, Patel JS, Darshan H, et al. Column chromatography free purification of recombinant α -amylase from bacillus licheniformis by tagging with hydrophobic elastin like polypeptide. *Biol Sci*. 2018; 88(3): 1249-55. [DOI:10.1007/s40011-017-0862-z]
- [15] Sarangthem V, Cho EA, Yi A, Kim SK, Lee BH, Park RW. Application of bld-1-embedded elastin-like polypeptides in tumor targeting. *Sci Reports*. 2018; 8(1):1-6. [DOI:10.1038/s41598-018-21910-z] [PMID] [PMCID]
- [16] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual+ cold Spring Harbor*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [17] Khalili M, Soleyman MR, Baazm M, Beyer C. High-level expression and purification of soluble bioactive recombinant human heparin-binding epidermal growth factor in Escherichia coli. *Cell Biol Int*. 2015; 39(7):858-64. [DOI:10.1002/cbin.10454] [PMID]
- [18] Li W, Ng I, Fang B, Yu J, Zhang G. Codon optimization of 1, 3-propanediol oxidoreductase expression in Escherichia coli and enzymatic properties. *Electron J Biotechnol*. 2011; 14(4):7-17. [DOI:10.2225/vol14-issue4-fulltext-9]
- [19] Hassouneh W, MacEwan SR, Chilkoti A. Fusions of elastin-like polypeptides to pharmaceutical proteins, in *Methods in enzymology*. *Methods Enzymol*. 2012; 502:215-37. [DOI:10.1016/B978-0-12-416039-2.00024-0] [PMID] [PMCID]
- [20] Chilkoti A, Christensen T, MacKay JA. Stimulus responsive elastin biopolymers: Applications in medicine and biotechnology. *Cur Opin chem biol*. 2006; 10(6):652-57. [DOI:10.1016/j.cbpa.2006.10.010] [PMID] [PMCID]
- [21] Conley AJ, Joensuu JJ, Jevnikar AM, Menassa R, Brandle JE. Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnol Bioengineer*. 2009; 103(3):562-73. [DOI:10.1002/bit.22278] [PMID]
- [22] Chu HS, Lee HK, Park JE, Kim DM, kim BG, Won JI. Expression analysis of an Elastin-Like polypeptide (ELP) in a cell-free protein synthesis system. *Enzyme Microb Technol*. 2010; 46(2):87-91. [DOI:10.1016/j.enzmictec.2009.10.003]
- [23] Shamji MF, Betre H, Kraus VB, Chen J, Chilkoti A, Pichika R, et al. Development and characterization of a fusion protein between thermally responsive elastin-like polypeptide and interleukin-1 receptor antagonist: Sustained release of a local antiinflammatory therapeutic. *Arthritis Rheumat*. 2007; 56(11): 3650-61. [DOI:10.1002/art.22952] [PMID]
- [24] McPherson DT, Xu J, Urry DW. Product purification by reversible phase transition following escherichia coli expression of genes encoding up to 251 repeats of the elastomeric pentapeptide GVGVP. *Protein Expr Purif*. 1996; 7(1):51-7. [DOI:10.1006/prep.1996.0008] [PMID]
- [25] Chen THH, Bae Y, Furgeson DY. Intelligent biosynthetic nanobiomaterials (IBNs) for hyperthermic gene delivery. *Pharm Res*. 2008; 25(3):683-91. [DOI:10.1007/s11095-007-9382-5] [PMID]
- [26] Fujita Y, Funabashi H, Mie M, Kobatake E. Design of a thermocontrollable protein complex. *Bioconjugate Chem*. 2007; 18(5):1619-24. [DOI:10.1021/bc070120x] [PMID]
- [27] Omoumi N, Shokrgozar MA, Noormohammadi Z. Design and construction of recombinant ELP-Intein cassette for use in simple and new purification methods of recombinant proteins. *Modern Med Lab J*. 2017; 1(2):84-90. [DOI:10.30699/mmlj17.1.2.84]

- [28] Soleyman MR, Khalili M, Soleyman Meigoni A, Mohammadzadeh Ghasghaii H, Zendedel A, Baazm M. Gene cassette design, cloning and expression of recombinant elastin like polypeptide to produce a functional biomaterial in tissue engineering. *Koomesh*. 2016; 17(4):1006-16.
- [29] Noble JE, Bailey MJ. Quantitation of protein, In: Noble JE, Bailey MJ. *Methods in Enzymology*. Amsterdam: Elsevier; 2009. [DOI:10.1016/S0076-6879(09)63008-1]
- [30] Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(8):1103-9. [DOI:10.1590/S0100-879X2004000800001] [PMID]