Archive of SID

جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در سیستم بیانی *اشرشیاکلی*

زهرا شجاع[۱]، حمید رجبی معماری[۲*] و محمد رعایایی اردکانی[۳]

[۱] **جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

[۲] **اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات**

[۳] **اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی**

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۴

چکیده

فیکوسیانین رنگدانه آبی رنگی است که در دو گروه از جلبکها و سیانوباکترها ازجمله *Spirulina* وجود دارد. این رنگدانه دارای فعالیتهای متنوع زیستی است و کاربردهای گوناگونی در صنعت غذایی، آرایشی و دارویی دارد. پیشرفتهای زیادی جهت تولید فیکوسیانین در مقیاس بالا انجام شده است، اما اغلب روشها مشکل و با هزینه های بالایی قابل انجام هستند؛ درصورتی که همسانه سازی و بیان فیکوسیانین به صورت نوترکیب روشی ارزان است و خالص سازی آن آسان‌تر انجام می‌پذیرد. از این رو هدف از این تحقیق، جداسازی و همسانه‌سازی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل بیانی و تولید این پروتئین نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* بود تا زمینه تولید فیکوسیانین به صورت صنعتی فراهم گردد. در این پژوهش ژنوم سیانوباکتر *Spirulina platensis*استخراج شد و بعنوان الگو در PCR مورد استفاده قرارگرفت. ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین تکثیریافته با آغازگرهای طراحی شده، در ناقل بیانی pET-43.1a+ با استفاده از آنزیمهای برشی *NdeI* و *NotI* کلون گردید. همسانه‌سازی ژن زیرواحد آلفا در ناقل بیانی با استفاده از Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. بیان ژن با استفاده از آنالیز SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد تا ۸ ساعت پس از القاء با IPTG مورد بررسی قرارگرفت. در بررسی SDS-PAGE، بیان قوی ژن زیرواحدآلفا فیکوسیانین در سیستم بیانی *اشرشیاکلی* تأیید شد. بیان بالای ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین نشان داد که باکتری *اشرشیاکلی* می‌تواند بعنوان میزبان مناسب، جهت تولید فیکوسیانین نوترکیب مورد استفاده قرارگیرد. همچنین این تحقیق زمینه تولید فیکوسیانین نوترکیب در آینده را با صرف هزینه‌های پایین‌تر فراهم آورد.

واژه های کلیدی: همسانه‌سازی، بیان، ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین، *اسپیرولینا پلتنسیس*، pET-43.1a+

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۳۷۱۹۱۹۳، پست الکترونیکی: hamidmemary@gmail.com

مقدمه

اسپیرولینا، سیانوباکتر رشته‌ای است که علاوه بر درصد بالای پروتئین (۷۰-۵۰ درصد)، غنی از ویتامینها (مخصوصاً B12)، لیپیدها (گاما لینولنیک اسید) و رنگدانه‌ها (فیکوبیلی پروتئین و کاروتنوئید) است. از این‌رو امروزه در بسیاری از کشورها به صورت تجاری بعنوان مکمل غذای انسان و حیوانات مورد مصرف قرار می‌گیرد (۱۲).

صرف نظر از ارزش غذایی *اسپیرولینا*، مطالعات متنوعی جهت اثبات خواص دارویی و فواید مواد مغذی موجود در *اسپیرولینا* انجام شده است که تعدادی از آنها مربوط به فیکوسیانین موجود در این سیانوباکتر است (۴).

فیکوسیانین رنگدانه آبی رنگی است که می‌تواند بعنوان رنگ طبیعی، جایگزین رنگهای سنتزی سرطان‌زا در مواد غذایی، دارویی و آرایشی مورد استفاده قرارگیرد. امروزه علاوه بر استفاده از آن بعنوان رنگ غذا، بمیزان کمی در

www.SID.ir

Archive of SID

ایمونواسی وسیتومتری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). فیکوسیانین موجود در *اسپیرولینا* همچنین با داشتن بعضی از عملکردها مانند آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی (۱۷) و ضد-سرطانی (۱۳) برای سلامتی انسانها مفید است، به همین دلیل در سالهای اخیر مورد توجه بیشتری قرارگرفته است.

با توجه به اینکه فیکوسیانین ۲۰ درصد از کل پروتئین سلولی *اسپیرولینا پلتنسیس* را بخود اختصاص داده است (۱۱)، امروزه بعنوان مدل مناسبی جهت تولید فیکوسیانین به صورت تجاری در کشتهای فتوتروفی انتخاب شده است. تولید فیکوسیانین به صورت فتوتروفی همراه با مشکلاتی است. یک راهکار جهت کاهش مشکلات، تولید هتروتروفی آن است که تولید پروتئین نوترکیب، یکی از راههای تولید هتروتروفی است (۶).

فیکوسیانین دارای دو زیرواحد پروتئینی آلفا و بتا (α ، β) است که زیرواحد آلفا یک محل و زیرواحد بتا دو محل، جهت اتصال فیکوسیانوبیلین به آپوپروتئین مذکور دارد. سنتز کامل فیکوبیلی پروتئین وابسته به سنتز همزمان زنجیره آلفا و بتا و قرارگیری صحیح فیکوبیلین‌ها در این دو زنجیره است. از این‌رو تولید نوترکیب این فیکوبیلی پروتئین نسبت به پروتئینهای دیگر مشکل است (۶). تاکنون Tooley *et al*, (۲۰۰۱) هالوپروتئین زیرواحد آلفا فیکوسیانین مربوط به سیانوباکتر *Synechocystis* sp. PCC6803را در *اشرشیاکلی* بیان کردند. در این تحقیق ژنهای *cpcA* همراه با ژنهای فیکوسیانوبیلین لیاز (*cpc-E/c-F*) در یک ناقل و ژنهای هم اکسیژناز و Z-3 phycocyanobilin:ferredoxin reductase در ناقل دیگر کلون شدند و همزمان دو ناقل به باکتری معرفی شد (۲۱). در گزارشی Guan *et al*,(۲۰۰۷) با انتقال این ژنها به یک ناقل، هالوپروتئین زیرواحد آلفا فیکوسیانین را تولید کردند (۸). همچنین Guan *et al*, در سال ۲۰۰۹، با استفاده از ژن *cpcA*سپیرولینا، هالوپروتئین زیرواحد آلفا فیکوسیانین نوترکیب را تولید کردند. علاوه بر این بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که این پروتئین نوترکیب، پتانسیلی جهت استفاده در fluorescent tagging و عوامل دارویی دارد (۹).

در سالهای اخیر نیز، پژوهشهای گسترده‌ای برای تولید پروتئینهای نوترکیب از طریق میکروارگانیسم‌ها، حیوانات ترانسژنیک و گیاهان مورد توجه قرارگرفته است که در این میان، باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بعنوان کارخانه تولید پروتئینهای نوترکیب از جاذبه‌های خاصی برخوردار است (۱). مزیتهای بسیاری برای استفاده از سیستم بیان ژن *اشرشیاکلی* به اثبات رسیده که آن را یک میکروارگانیسم ارزشمند برای تولید پروتئینهای نوترکیب در سطوح بالا باقی گذارده است. ویژگیهای ژنتیکی و فیزیولوژیکی کاملاً شناخته شده آن، تکثیر درزمان کوتاه، آسان بودن دستورزی آن، دانش اثبات شده فرمانتاسیون و نهایتاً ظرفیت بالا برای تجمع پروتئینهای نوترکیب (بیش از ۲۰ درصد از محتوای پروتئین کل سلولی)، *اشرشیاکلی* را یکی از پرکاربردترین میزبانها در تولید پروتئین ساخته است (۷و۱۰).

بر این اساس در این تحقیق ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل بیانی مناسب کلون گردید و بیان آن در سیستم بیانی *اشرشیاکلی* بررسی شد تا در طرحهای بعدی، دیگر ژنهای مربوط به سنتز فیکوسیانین همسانه‌سازی شوند و در آینده بتوان به فیکوسیانین نوترکیب کامل دست یافت.

مواد و روشها

کشت *اسپیرولینا* و استخراج ژنوم: *اسپیرولینا پلتنسیس* از مرکز پرورش میگو استان بوشهر تهیه شد. کشت در محیط اختصاصی Zarrouk انجام شد (نمکهای مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت Zarrouk از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.) و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انکوبه شد (۱۵). پس از رسیدن *اسپیرولینا* به مرحله رشد لگاریتمی، استخراج ژنوم با استفاده از روش تغییر یافته جداسازی

www.SID.ir

Archive of SID

ژنوم از بافتهای گیاهی تازه، با استفاده از CTAB انجام گردید. بدین صورت که پس از جمع آوری توده سلولی، به میکروتیوب حاوی این توده ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج Tris-HCl (pH:8) ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۲۰ میلی‌مولار، NaCl ۱/۴ میلی‌مولار، CTAB ۲/۵ درصد وزنی/حجمی، مرکاپتواتانول۰/۲ درصد حجمی/حجمی) اضافه و بمدت ۱۵ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار داده شد. پس از آن توده سلولی با استفاده از روشهای فیزیکی در بافر استخراج کاملاً حل شد. سوسپانسیون به دست آمده بمدت۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت، نمونه کاملاً یکنواخت گردید. در این مرحله استخراج با کلروفرم با حجمی برابر با حجم نمونه انجام شد. استخراج با کلروفرم بیش از یکبار انجام شد. پس از افزودن کلروفرم، نمونه بآرامی مخلوط شده و ۶ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز آبی به میکروتیوب جدید منتقل شد و حجم برابر آن ایزوپروپانول به آن افزوده شد. توده DNA در این مرحله رسوب نمود. این توده با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ و بمدت ۵ دقیقه جمع آوری شد. مایع رویی دور ریخته شد و به توده ژنوم ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. سپس بترتیب بمیزان ۰/۱ حجم، استات سدیم ۳ مولار و ۲ برابر حجم، اتانل به نمونه افزوده گردید. رسوب DNA با سانتریفیوژ دور ۱۲۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه جمع آوری و سپس در زیر هود خشک شد. DNA استخراج شده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد (۳).

طراحی پرایمر و تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین: باتوجه به توالی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین *S. platensis* دربانک ژن (accession no. AY804216) و نقشه ناقل pET-43.1a+، آغازگرهای لازم جهت تکثیر طراحی و توسط شرکت تکاپو زیست سنتز گردید. توالی آغازگر پیشرو (Forward primer) شامل 5′GGGAATTCCATATGAAAA CCCCCCTAACCGAAGCAGTTTC3′ و آغازگر معکوس به صورت (Reverse primer) 5′ATAAGAA TGCGGCCGCGCTTAGGGCGTTG ATCGCGTAGTCG3′ بود. در آغازگر پیشرو جایگاه برشی برای آنزیم *NdeI* و در آغازگر معکوس جایگاه برشی برای آنزیم *NotI* تعبیه شد. جهت افزایش کارآیی برش آنزیمهای برشی، دو توالی اضافی بعنوان لنگرگاه آنزیم، به ابتدای آغازگرها افزوده گردید.

تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر(شرکت BioRad) و در حضور۱۰۰ نانوگرم DNAژنومی، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱/۵ واحد از آنزیم Tag DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (تهیه شده از شرکت سیناژن) انجام شد. برنامه دمایی و زمانی بهینه واکنش، با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه آغاز شد و با ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه بمدت۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه بمدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه بمدت ۳۵ ثانیه ادامه و در نهایت با ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. جهت تأیید تکثیر، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) بررسی شد (۱۸).

همسانه‌سازی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین: ناقل بیانی و محصول PCR با استفاده از آنزیمهای برشی *NdeI* و *NotI* (تهیه شده از شرکت TAKARA ژاپن) بطور جداگانه برش داده شدند و با استفاده از کیت تخلیص از ژل (شرکت Bioneer) خالص سازی شدند. در نهایت واکنش اتصال در دمای ۱۶ درجه بمدت ۱۴ ساعت توسط آنزیم T4 DNA Ligase (TAKARA ژاپن) انجام گردید. پس از عمل ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی(۱۸)، باکتری*E.coli* DH5α تراریخته برروی محیط گزینشگر حاوی ۱۰۰ µg/ml آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. جهت تأیید صحت همانندسازی، کلنیها با استفاده از روشهای Colony PCR و هضم آنزیمی ناقلهای حاصل از

www.SID.ir

Archive of SID

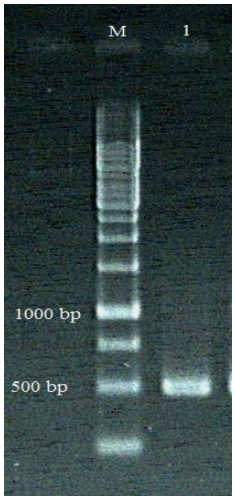
کلنیهای مثبت، مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت یکی از ناقلهای همسانه‌سازی شده جهت تأیید نهایی تعیین توالی شد.

بررسی بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین: جهت بررسی بیان، انتقال سازه به باکتری بیانی *اشرشیاکلی* BL21 انجام شد. بمنظور القای بیان، *اشرشیاکلی* BL21 حاوی ناقل pET43.1a+-*cpcA* به محیط کشت TB انتخابی حاوی ۱۰۰µg/ml آمپی‌سیلین تلقیح گردید و در ۳۷ درجه در دور ۲۵۰ rpm انکوبه گردید. پس از رسیدن OD_{600} به ۰/۴ و نمونه‌گیری بعنوان کنترل منفی، IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت باکتریایی افزوده شد (۲). پس از کاهش دما تا ۲۹ درجه، نمونه گیری در زمانهای۱،۲،۴و۸ ساعت بعد از القاء انجام شد. در نهایت پروتئین کل به روش رسوب‌گیری از باکتری استخراج گردید و آشکارسازی پروتئینها با استفاده از آنالیز SDS-PAGE ۱۲/۵٪ و رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلوR250 مورد بررسی قرارگرفت. تمامی محلولهای مورد استفاده در SDS-PAGE و رنگ آمیزی طبق دستورالعمل Roche Applied Science تهیه گردید (۱۶).

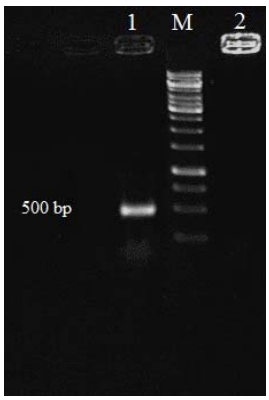
نتایج

تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین: ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و ژنوم استخراج شده *اسپیرولینا پلتنسیس* بعنوان الگو تکثیر گردید (شکل ۱).

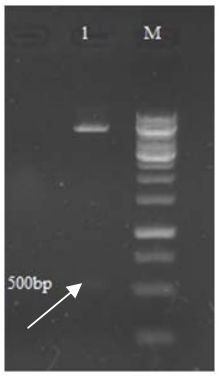
انجام عمل همانندسازی و بررسی صحت آن: پس از هضم آنزیمی ناقل بیانی و ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین، طی فرآیند اتصال و در کنار آنزیم T4 لیگاز، ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین وارد ناقل pET43.1a+ شد. در نهایت حضور ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل بیانی با استفاده از روشهای Colony PCR (شکل ۲)، هضم آنزیمی (شکل ۳) و تعیین توالی (شکل ۴)، تأیید شد.



شکل۱- محصول PCR ژن زیرواحد آلفا. چاهک۱: محصول حاصل ازتکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین، چاهک M: نشانگرمولکولی Kb ۱.



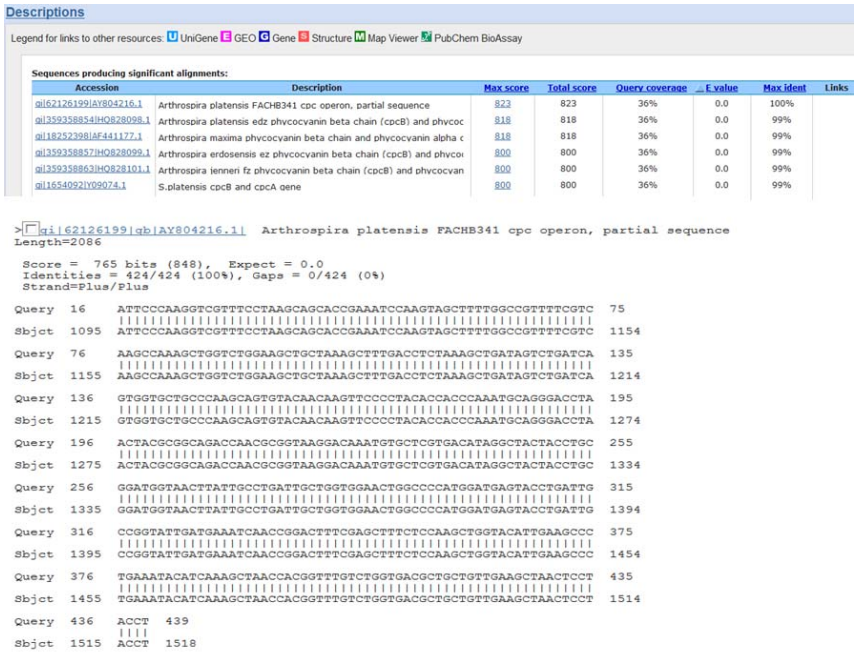
شکل۲- تأیید حضور ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل با استفاده از تکنیک Colony PCR. چاهک۱: کلنی حاوی ناقل دارای ژن، چاهک۲: کلنی حاوی ناقل بدون ژن(کنترل منفی)، چاهک M: نشانگر مولکولی ۱Kb.



شکل۳- تأیید حضور ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل با استفاده از هضم آنزیمی. چاهک۱: خروج ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین از ناقل پس از انجام هضم آنزیمی، چاهک M: نشانگر مولکولی ۱kb.

www.SID.ir

Archive of SID



Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

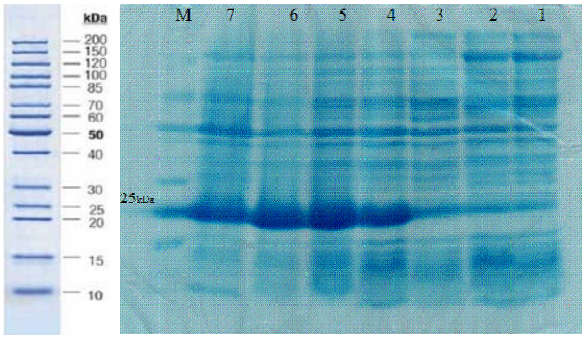
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
gi|62126199|AY804216.1	Arthrospira platensis FACHB341 cpc operon, partial sequence	823	823	36%	0.0	100%	
gi|359358854|HQ828098.1	Arthrospira platensis edz phycocvanin beta chain (cpcB) and phycoc	818	818	36%	0.0	99%	
gi|18252398|AF441177.1	Arthrospira maxima phycocvanin beta chain and phycocvanin alpha c	818	818	36%	0.0	99%	
gi|359358857|HQ828099.1	Arthrospira erdosensis ez phycocvanin beta chain (cpcB) and phycoc	800	800	36%	0.0	99%	
gi|359358863|HQ828101.1	Arthrospira jenneri fz phycocvanin beta chain (cpcB) and phycocvan	800	800	36%	0.0	99%	
gi|1654092|Y09074.1	S.platensis cpcB and cpcA gene	800	800	36%	0.0	99%	

>gi|62126199|gb|AY804216.1| Arthrospira platensis FACHB341 cpc operon, partial sequence
Length=2086

Score = 765 bits (848), Expect = 0.0
Identities = 424/424 (100%), Gaps = 0/424 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  16    ATTCCCAAGGTCGTTTCCTAAGCAGCACCGAAATCCAAGTAGCTTTTGGCCGTTTTCGTC  75
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1095  ATTCCCAAGGTCGTTTCCTAAGCAGCACCGAAATCCAAGTAGCTTTTGGCCGTTTTCGTC  1154

Query  76    AAGCCAAAGCTGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCA  135
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1155  AAGCCAAAGCTGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCA  1214

Query  136   GTGGTGCTGCCCAAGCAGTGTACAACAAGTTCCCCTACACCACCCAAATGCAGGGACCTA  195
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1215  GTGGTGCTGCCCAAGCAGTGTACAACAAGTTCCCCTACACCACCCAAATGCAGGGACCTA  1274

Query  196   ACTACGCGGCAGACCAACGCGGTAAGGACAAATGTGCTCGTGACATAGGCTACTACCTGC  255
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1275  ACTACGCGGCAGACCAACGCGGTAAGGACAAATGTGCTCGTGACATAGGCTACTACCTGC  1334

Query  256   GGATGGTAACTTATTGCCTGATTGCTGGTGGAACTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTG  315
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1335  GGATGGTAACTTATTGCCTGATTGCTGGTGGAACTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTG  1394

Query  316   CCGGTATTGATGAAATCAACCGGACTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCC  375
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1395  CCGGTATTGATGAAATCAACCGGACTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCC  1454

Query  376   TGAAATACATCAAAGCTAACCACGGTTTGTCTGGTGACGCTGCTGTTGAAGCTAACTCCT  435
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1455  TGAAATACATCAAAGCTAACCACGGTTTGTCTGGTGACGCTGCTGTTGAAGCTAACTCCT  1514

Query  436   ACCT  439
             ||||
Sbjct  1515  ACCT  1518
```

شکل۴- نتیجه Blast توالیهای به دست آمده از تعیین توالی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در بانک ژن



شکل۵- آنالیز SDS-PAGE زیرواحد آلفا فیکوسیانین قبل و بعد از القاء با IPTG. ستون۱: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+ قبل از القاء، ستون۲: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+ بعد از القاء، ستون۳: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+-*cpcA* قبل از القاء، ستونهای ۴ تا ۷: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+-*cpcA*، بترتیب ۱، ۲، ۴ و ۸ ساعت پس از القاء، ستون M: نشانگر ۱۰- ۲۰۰ کیلودالتون.

بررسی بیان با استفاده از آنالیزSDS- PAGE: سوسپانسیونهای باکتریایی در زمانهای قبل و ۱،۲،۴و ۸ ساعت پس از افزودن IPTG تهیه شد و پروتئین کل از باکتری استخراج گردید. در بررسی SDS- PAGE نمونه-های القایی، باند قوی پروتئینی در محدوده ۲۵-۲۰ کیلو دالتون نشانگر پروتئینی مشاهده شد، در حالی که در نمونه-های کنترل منفی و غیرالقایی هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل ۵). با توجه به وزن مولکولی زیرواحد آلفا فیکوسیانین همراه با Tag های تعبیه شده در انتهای پروتئین بیان شده (His tag, HSV tag) که حدود ۲۰/۹۲ کیلو دالتون محاسبه شد و همچنین عدم وجود باند پروتئینی مذکور در نمونه‌های قبل از القاء، بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در سیستم بیانی *اشرشیاکلی* تأیید شد. همچنین نمونه‌های۲ و۴ ساعت بعد از القاء، باند قویتری را نسبت به سایر زمانهای القاء نشان دادند.

بحث

فیکوسیانین رنگدانه جذب نوری است که بعنوان رنگ در مواد غذایی و آرایشی مورد استفاده قرارمی‌گیرد و همچنین پتانسیلی جهت درمان بیماریهای ایجاد شده توسط

www.SID.ir

Archive of SID

استرسهای اکسیداتیو محسوب می‌شود (۱۴). علاوه بر مشکلات تولید فتوتروفی فیکوسیانین، استخراج فیکوبیلی پروتئینها از سیانوباکترها مشکل است چرا که کوچک و دارای دیواره سلولی مقاومی هستند. روشهای بسیاری جهت استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین انجام شده است، اما هرکدام از این روشها صرف نظر از مزایا و معایب، هزینه بر هستند (۱۹ و ۲۲). با توجه به نقش مطلوب این پروتئین و مشکلات تولید آن از سایر منابع، سیستم ساده و ارزانی که تولید آن را در مقیاس انبوه و قیمت ارزان ممکن سازد، مورد توجه قرارگرفته است. تولید فیکوسیانین نوترکیب می‌تواند یکی از این سیستمها باشد.

امروزه تقاضای زیادی برای تولید پروتئینهای نوترکیب وجود دارد. بدین منظور سیستمهای بیان ژن باکتریایی، قارچی، حشره، پستانداران و گیاهان برای تولید این پروتئینها به کار می روند. در حال حاضر پروتئینهای با ارزش دارویی و اقتصادی ترجیحاً در سلولهای باکتریایی تولید می‌شوند (۲۰). انتخاب یک سیستم بیانی برای تولید پروتئینهای نوترکیب در سطح بالا به فاکتورهای زیادی وابسته است. این فاکتورها، شامل ویژگیهای رشد سلولی، سطوح بیان داخل و خارج سلولی، تغییرات پس از ترجمه-ای و فعالیت زیستی پروتئین مورد نظر است. از آنجایی که ژنهای فیکوسیانین از سیستم پروکاریوتی جدا می‌شوند و همچنین عدم نیاز آنها به فرآیندهای پس رونویسی و پس ترجمه‌ای، اشرشیاکلی می‌تواند میزبان مناسبی برای تولید آن باشد.

بنابراین هدف از این تحقیق جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در سیستم بیانی مناسب و شناخته شده در باکتری *اشرشیاکلی* بود. سیستم بیانی pET43.1a+ که در تحقیق حاضر استفاده شد، یکی از قوی‌ترین سیستمها برای همسانه‌سازی و بیان پروتئینهای نوترکیب در *اشرشیاکلی* است، زیرا این ناقل دارای پروموتر قوی T7 جهت افزایش نسخه برداری ژن هدف است. همچنین بمنظور پیش بینی فرآیند شناسایی و تخلیص پروتئین تولید شده در پژوهشهای آتی، آنزیمهای برشی بگونه‌ای انتخاب شد که توالی His tag و HSVtag در انتهای ژن زیرواحد آلفا افزوده گردد. انتهای پروتئین حاصل از بیان این ژن، دارای ۶ اسید آمینه هیستیدین بوده و توسط آنزیم Anti-His tag از سایر پروتئینهای باکتریایی قابل جداسازی می‌باشد. در این صورت پروتئین نوترکیب تولید شده به صورت متصل به His tag را می‌توان با گذراندن از ستونهای کروماتوگرافی ویژه، خالص سازی کرد. HSV tag شامل ۱۱ اسیدآمینه QPELAPEDPED مشتق شده از گلیکوپروتئین D ویروس هرپس است که همچنین می‌تواند در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب کمک کند. این توالیها بدلیل کوچک بودن، تغییری در ساختار بیوشیمیایی پروتئین نوترکیب ایجاد نمی‌کنند.

باند قوی پروتئینی مشاهده شده در آنالیز SDS-PAGE حاکی از بیان بالای پروتئین نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* است که دلایل متعددی در این فرآیند تأثیرگذار بوده است. باکتری *اشرشیاکلی* و جلبکهای سبزآبی هر دو جزء باکتریهای حقیقی‌اند. شباهت بالای codon usage *اسپیرولینا* و *اشرشیاکلی*، می‌تواند دلیلی بر بیان بالا باشد. همچنین این شباهت، نیاز به بهینه کردن کدونی (codon optimization) را از بین می‌برد. ناقلهای بیانی نوترکیب جهت بیان بالای ژن به پروموتر و ترمیناتور قوی نیاز دارند. سیستم بیانی pET مورد استفاده در این پژوهش با داشتن پروموتر وترمیناتور قوی نیز سبب بیان بالای ژن می‌شود. این سیستم دارای پروموتر T7 است که تنها توسط RNA پلیمراز باکتروفاژT7 قادر به شناسایی است این RNA پلیمراز با سرعتی ۵ برابر RNA پلیمراز باکتریایی عمل می کند، بدین معنی که تحت این پروموتر بیان ژن در سطح بالا انجام پذیراست (۲۰). سیستم بیانیBL یکی از قوی‌ترین سیستمها برای بیان پروتئینهای نوترکیب در *اشرشیاکلی* است. ژنوم این باکتری دارای یک نسخه

www.SID.ir

Archive of SID

کروموزومی از ژن RNA پلیمراز باکتریوفاژT7 است که تحت کنترل پروموتر Lac است و بیان آن باIPTG تنظیم می‌شود. اگر IPTG با غلظت مناسب و در زمانی که باکتری به OD بهینه رسیده باشد، به محیط کشت افزوده گردد، همانطور که در این پژوهش مشاهده شد، به تولید بالای پروتئین نوترکیب کمک می‌کند. بعبارت دیگر بیان قابل القاء که توسط پروفاژ DE3 باکتری *اشرشیاکلی* سویه BL امکان پذیر می‌شود این فرصت را برای باکتری فراهم می‌کند تا تولید پروتئین نوترکیب زمانی آغاز شود که باکتری به OD بهینه رسیده باشد.

با توجه به اهمیت دارویی، غذایی و آرایشی فیکوسیانین و اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر تولید فیکوسیانین و یا کشت *اسپیرولینا پلتنسیس* به صورت صنعتی جهت استخراج فیکوسیانین در ایران عنوان نشده است. انجام موفق این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز تولید صنعتی و خالص فیکوسیانین باشد.

منابع

۱- کیانی ج.، شمس آرا م.، ۱۳۸۴، اصول بیان پروتئینهای نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی*. انتشارات اندیشه ظهور، تهران.

2- Abdolrasouli N., Memari H.R., Ardakani M.R., Ebrahimi M.A., Ebrahimi N., 2013, Production of Human Alpha 2b Interferon in *E. coli* Expression System. Jundishapur Sci. Med. J., 12: 325-334.

3- Berrendero E., Perona E., Mateo P., 2008, Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. Int. J. Syst. Evol. Micr., 58: 447-460.

4- Cevallos G.C., Barrón B.L., Sánchez J.V., 2008, Toxicologic Studies and Antitoxic Properties of *Spirulina*. In: Gershwin M.E., Belay A., (eds) Boca Raton: CRC Press, 28-44.

5- Cohen Z., 1997, The Chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak A (Ed.) *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis, London, 175-204.

6- Eriksen N.T., 2008, Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine: Min-Rev. Appl. Microbiol. Biotechnol., 80: 1-14.

7- Georgiou G., 1996, Expression of proteins in bacteria, in Protein Engineering: Principles and Practice. Wiley Liss, New York, USA.

8- Guan X., Qin S., Su Z., Shao F., Ge B., Li F., Tang X., 2007, Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo-a phycocyanin in *Escherichia coli* by using one expression vector. Appl. Biochem. Biotechnol., 142: 52-59.

9- Guan X., Zhang W., Zhang X., Li Y., Wang J., Lin H., Tang X., Qin S., 2009, A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant α-phycocyanin of *Spirulina*. J. Appl. Microbiol., 106: 1093-1100.

10- Hodgson J., 1993, Expression systems: A user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. Bio/Technology, 11: 887-893.

11- Jeamton W., Dulsawat S., Laoteng K., Tanticharoen M., Cheevadhanark S., 2011, Phycocyanin promoter of *Spirulina platensis* controlling heterologous expression in cyanobacteria. J. Appl. Phyco., 23: 83-88.

12- Kawata Y., Yano S., Kojima H., Toyomizu M., 2004, Transformation of *Spirulina platensis* Strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 Transposase-Transposon DNA-Cation Liposome Complex. Mar. Biotechnol., 6: 355-363.

13- Liu Y., Xu L., Cheng N., Lin L., Zhang C., 2000, Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth ofhuman leukemia K562 cells. J. Appl. Phyco., 12: 125-130.

14- Minkova K.M., Tchernov A.A., Tchorbadjieva M.I., Fournadjieva S.T., Antova R.E., Busheva M.Ch., 2003, Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) fusiformis. J. Biotechnol., 102: 55-59.

15- Raoof B., Kaushik B.D., Prasanna R., 2006, Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. Biomass Bioenergy, 30: 537-542.

www.SID.ir

Archive of SID

16- Roche molecular biochemicals, 2011, Lab FAQS - find a quick solution. 4th Edition, Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 192.

17- Romay C., Armesto J., Remirez D., Gonzalez R., Ledon N., Garcia I., 1998, Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. Inflamm. Res., 47: 36-41.

18- Sambrook J., Russel D.W., 2001, Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

19- Soni B., Trivedi U., Madamwar D., 2008, A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. Biore. Technol., 99: 188-194.

20- Sørensen H.P., Mortensen K.K., 2005, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J. Biotechnol., 115: 113-128.

21- Tooley A.J., Cai Y.A., Glazer A.N., 2001, Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo-a subunit in a heterologous host. Proc. Natl. Acad. Sci., 98: 10560-10565.

22- Zhu Y., Chen X.B., Wang K.B., Li Y.X., Bai K.Z., Kuang T.Y., Ji H.B., 2007, A simple method for extracting C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumonia*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 74: 244-248.

Isolation and Cloning of Phycocyanin Alpha Subunit Gene and its Production in *E.coli* Expression System

Shoja Z.[1], Rajabi-Memari H.[2] and Roayaei Ardakani M.[3]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Islamic Azad University, Jahrom, I.R. of Iran

[2] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of Iran

[3] Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of Iran

Abstract

Phycocyanin is a blue pigment in two eukaryote algal genera and in cyanobacteria as *Spirulina*. This pigment has various biology activities and are utilised in a number of applications in foods, cosmetics and pharmaceuticals. A lot advantage of phycocyanin studied by many researchers but the scale-up of these methods is difficult and expensive while production of recombinant phycocyanin is more convenience and inexpensive to scale up protein desire. The purpose of this study was to isolation and cloning of phycocyanin alpha subunit gene in expression vector and production of recombinant protein in *E.coli* to provide industrial production of phycocyanin. The genomic DNA of *Spirulina platensis* was prepared and used for PCR as template. phycocyanin alpha subunit gene amplified by designed specialize primers was cloned in a pET43.1a+ expression vector, under the control of T7 promoter using *NdeI* and *NotI* restriction enzymes. The cloning of phycocyanin alpha subunit gene is confirmed by colony PCR, digestion and DNA sequencing. The constructs were transformed into *E.coli* strain BL21 (DE3). Expression of phycocyanin alpha subunit gene was examined by 12.5 % SDS-PAGE analysis at 8 hrs after induction by IPTG. The SDS-PAGE analysis showed that alpha subunit phycocyanin was produced in *E.coli* expression system. Our study provided the production of recombinant phycocyanin. Also overexpression of the synthetic alpha subunit phycocyanin in a bacterial system (*E.coli* BL-21) showed that *E.coli* can be used to produce this desire protein in large quantity.

Key words: cloning, expression, phycocyanin alpha subunit gene, *Spirulina platensis*, pET-43.1a+

www.SID.ir