

کلونینگ و بیان آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱ نوترکیب انسانی در سیستم های بیانی Escherichia coli شامل Rosetta (DE3) و Origami (DE3)، B121 (DE3)

هانیه فردگلی^۱، سید نظام الدین حسینی^۲، ستاره حقیقت^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱ (IL-1RA)، پروتئینی ۱۵۳ آمینواسیدی (با وزن مولکولی ۱۶/۸۳ کیلودالتون) است. این پروتئین دارویی، با نام تجاری آناکینرا شناخته شده است و کاربرد مؤثری در درمان آرتریت روماتوئید دارد. این مطالعه، به منظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱ در سویه های باکتری Escherichia coli (E. coli) انجام شد.

روش ها: بهینه سازی ژن IL-1 RA با استفاده از GenScript انجام شد و در پلاسمید pUC18 به عنوان وکتور کلونینگ، قرار گرفت. سپس، این پلاسمید با دو آنزیم محدود کننده ی NdeI و BamHI برش خورد. ژن IL-1RA از روی ژل تخلیص شد. ژن IL-1RA به داخل وکتور بیانی وارد شد. سازه ی کاست بیانی به داخل باکتری های E. coli Rosetta و E. coli BL21، E. coli Origami با روش کلرید کلسیم (CaCl₂) و شوک حرارتی منتقل شد.

یافته ها: تشخیص و تأیید کلنی های منتقل شده با Colony polymerase chain reaction (Colony PCR) انجام شد. القای این ژن با به کار گیری Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) انجام گرفت. بیان پروتئین با استفاده از روش های Western blotting و Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) تأیید شد و به وسیله ی رزین نیکل تخلیص گردید. آنالیز بیانی سوش های E. coli ترانسفورم شده تأیید کرد که ورود سازه به داخل وکتور بیانی انجام شده است. وزن مولکولی پروتئین بیان شده، ۱۶/۸۳ کیلو دالتون برآورد شد.

نتیجه گیری: در این مطالعه، آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱ انسانی در باکتری E. coli Origami با مقادیر بالا نسبت به سویه های دیگر E. coli، به طور موفقیت آمیزی تولید شد. باکتری E. coli Origami می تواند به عنوان میزبان مناسب در تولید IL-1RA نوترکیب انسانی مورد استفاده قرار گیرد و این فن آوری قابلیت بومی سازی دارد.

واژگان کلیدی: آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱، نوترکیبی، Escherichia coli

ارجاع: فردگلی هانیه، حسینی سید نظام الدین، حقیقت ستاره. کلونینگ و بیان آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱ نوترکیب انسانی در سیستم های بیانی Escherichia coli شامل Rosetta (DE3) و Origami (DE3)، B121 (DE3). مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۳۹): ۹۶۵-۹۷۲

محصولات درمانی است (۲). از دیگر مزایای تولید محصولات نوترکیب، ایمن بودن این روش تولید نسبت به استخراج پروتئین از طریق نمونه گیری از مایعات افراد می باشد. شواهد قانع کننده ای وجود دارد که IL-1RA در بهبود علائم و نشانه های آرتریت روماتوئید و آسیب مفصلی نقش حیاتی دارد (۳). IL-1RA، توسط انواع مختلف سلول ها از جمله سلول های ایمنی، سلول های اپی تلیال و آدیپوسیت ها ترشح می شود (۴). فرم نوترکیب آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱

مقدمه

آنتاگونیست گیرنده ایترلوکین ۱ (IL-1RA)، یک پلی پپتید ۱۵۳ آمینواسیدی با وزن مولکولی ۱۶/۸۳ کیلودالتون می باشد. باز گرداندن تعادل بین IL-1RA و IL-1 با تجویز IL-1RA نوترکیب خارجی (آنکینرا) یک رویکرد درمانی است که در سال های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است (۱). تولید محصولات نوترکیب، روش مناسبی برای تأمین مقدار پروتئین مورد نیاز برای فروش تجاری

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه واکنش هایاتیت ب نوترکیب، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری نوین، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: setareh_haghighat@yahoo.com

نویسنده ی مسؤو: ستاره حقیقت

با استفاده از غربالگری کلونی‌های سفید-آبی، باکتری‌های منتقل شده که تک کلنی سفید رنگ تشکیل داده بودند، با لوپ برداشته و در ۱۰۰ سی‌سی محیط LB agar کشت داده و به مدت ۱۲ ساعت در Shaker انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شدند.

با استفاده از سانتی‌فیوژ، رسوب باکتری تهیه گردید و با کیت استخراج پلاسمید شرکت کیاژن، پلاسمید تکثیر شده، استخراج شد. برای تأیید پلاسمید مورد نظر، بر روی ژل ۱ درصد آگارز برده و الکتروفورز انجام شد. با اندازه‌گیری Optical density (OD)، غلظت پلاسمید استخراجی به دست آمده، ۳۵ نانوگرم/میکرولیتر بود.

مضم آنزیمی وکتور کلونینگ pUC18 و وکتور بیان: به منظور جداسازی ژن موتانت آنتاگونیست گیرنده‌ی اینترلوکین ۱ نوترکیب انسانی از وکتور کلونینگ pUC18، از دو آنزیم محدود کننده‌ی BamHI-HF و NdeI استفاده شد. سپس، برای استخراج ژن برش خورده، بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز انجام شد و با استفاده از کیت استخراج ژل شرکت کیاژن، ژن مورد نظر خالص‌سازی گردید. غلظت ژن به دست آمده، ۱۴ نانوگرم/میکرولیتر بود. وکتور بیانی pET28a نیز با این دو آنزیم برش خورد تا برای لیگاسیون ژن، آماده باشد. با نسبت مولار ۳:۱، مقدار ۳۰ میکروگرم وکتور بیانی با میزان ۱/۲۷ میکروگرم ژن و ۵ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase برای لیگاسیون، مورد استفاده قرار گرفت.

تأیید لیگاسیون موتانت آنتاگونیست گیرنده‌ی اینترلوکین ۱ نوترکیب انسانی در وکتور pET28a: شناسایی و آنالیز کلونی‌های مثبت حاوی سازه‌ی ژنی با استفاده از روش Colony polymerase chain reaction (Colony PCR) انجام شد. جفت پرایمرهای مربوط به وکتور pET28a بدین صورت بودند:

T7 promoter: 5TAATACGACTCACTATAGGG3,

T7 terminator: 5GCTAGTTATTGCTCAGCGG3

برای این کار ابتدا کلنی با قطر حداقل ۱ میلی‌متر از پلیت آگار با خلال دندان استریل برداشته شد. سپس، باکتری به یک تیوب ۰/۵ سی‌سی حاوی ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل انتقال داده و سپس، ترکیب شد تا سلول‌ها پخش گردند. لوله در Head block در ۹۹ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه قرار داده شد تا سلول‌ها تجزیه شوند. آن گاه، به مدت ۱ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰ سانتی‌فیوژ گردید تا سلول‌های شکسته شده، برداشته شود. سپس، ۱۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به یک تیوب ۰/۵ سی‌سی انتقال داده شد.

برای انجام PCR، ۱ میکرولیتر Deoxynucleoside triphosphate mix (dNTP) ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر upstream primer ۱ میکرولیتر downstream primer هر دو با غلظت

به نام آن‌اکینرا در درمان آرتریت روماتوئید مؤثر است؛ این بیماری، یک بیماری خودایمنی است که IL-1 نقش کلیدی در آن ایفا می‌کند (۵). به علت بازده فراوان روش DNA نوترکیب، تولید تجاری بسیاری از پپتیدها و پروتئین‌ها به این روش در سلول‌های باکتری صورت می‌پذیرد (۶).

باکتری مورد نظر که برای کلونینگ و بیان مورد استفاده قرار می‌گیرد، سوش‌های Escherichia coli (E. coli) می‌باشد. سیستم بیانی E. coli دارای مزایای فراوانی نظیر کنترل ساده‌ی بیان ژن، بازده بالای تولید پروتئین نوترکیب (تا ۵۰ درصد کل پروتئین‌های سلول)، دارا بودن وکتورهای کلونینگ گوناگون و ساده بودن کشت می‌باشد (۷). هدف اصلی پژوهشگران در مطالعه‌ی حاضر، انتخاب سویه‌ی مناسب E. coli برای تولید بالای IL-IRA می‌باشد. در این مطالعه، از میزبان‌های بیانی E. coli برای تولید موتانت آنتاگونیست گیرنده‌ی اینترلوکین ۱ نوترکیب انسانی (۸) و تخلیص پروتئین مورد نظر استفاده شد.

روش‌ها

وکتور کلونینگ pUC18 به همراه ژن IL-IRA، از شرکت GeneScript امریکا تهیه شد. وکتور بیانی pET28a از انستیتو پاستور ایران، آنتی‌بادی آنتی‌هیپس horseradish peroxidase (HRP) از شرکت Sigma امریکا، آنزیم‌های محدود کننده‌ی BamHI-HF، NdeI و آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Biolab انگلستان خریداری شدند. کیت استخراج پلاسمید و استخراج ژل از شرکت کیاژن آلمان تهیه شدند.

طراحی و سنتز ژن: به منظور همسان‌سازی الگوی استفاده از کدون بین توالی پروتئین مورد نظر و میزبان بیانی انتخاب شد و همچنین، به منظور افزایش بیان ژن، بهینه‌سازی کدون توسط شرکت GeneScript انجام شد. سپس، این ژن به داخل پلاسمید کلونینگ pUC18 ساب کلون شد. سنتز ژن نیز توسط شرکت GeneScript انجام شد.

کلونینگ سازه‌ی بیانی موتانت آنتاگونیست گیرنده‌ی اینترلوکین ۱ نوترکیب انسانی: در ابتدا، سازه‌ی کلونینگ IL-IRA-pUC18 به منظور تکثیر پلاسمید، به داخل باکتری کلونینگ مستعد E. coli DH5 α منتقل شد. پس از انتقال، باکتری‌ها در محیط Luria-Bertani agar (LB agar) حاوی 5-bromo-4-(IPTG) Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (X-Gal) chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside و آمپی‌سیلین با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر کشت و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن،

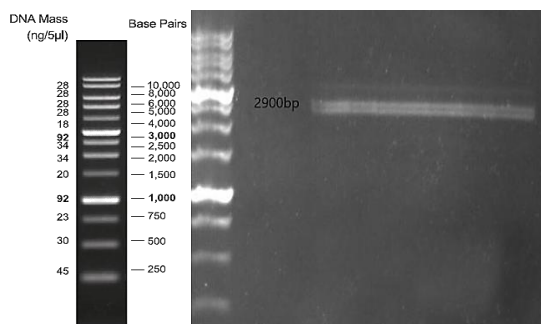
شد. SDS-PAGE بر روی ژل پلی آکریل آمید ۲۰ درصد انجام شد و نمونه‌ها با برموفنول بلو، رنگ آمیزی شدند. Western blotting مطابق با دستورالعمل Sigma با استفاده از آنتی بادی آنتی هیس HRP انجام شد.

تخلیص پروتئین به روش رزین نیکل: رزین خریداری شده از Genabioscience آماده شد و ابتدا مواد رویی از رزین با سانتیفریوژ جدا گردید. ستون با بافر Binding buffer (حاوی NaH_2PO_4 ۵۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۳۰۰ میلی مولار و Imidazol ۱۰ میلی مولار با $\text{pH} = 8$) متعادل سازی شد. پس از آن، نمونه‌ی باکتری بر روی رزین ریخته و بعد از آن، رزین شستشو داده شد (NaH_2PO_4 ۵۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۳۰۰ میلی مولار و Imidazol ۲۰ میلی مولار با $\text{pH} = 8$) و سپس، با استفاده از بافر Elution (NaH_2PO_4 ۵۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۳۰۰ میلی مولار و Imidazol ۲۵۰ میلی مولار با $\text{pH} = 8$)، پروتئین هیس تگ استخراج شده به دست آمد.

به منظور ارزیابی تولید پروتئین به روش Bradford، ۱۰۰ لاندا از نمونه به ۵ میلی لیتر معرف Bradford اضافه شد و جذب آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای کنترل نیز ۱۰۰ لاندا آب مقطر به طور جداگانه به ۵ میلی لیتر معرف Bradford اضافه شد. برای تهیه‌ی منحنی استاندارد، از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin یا BSA) کیت استفاده شد. برای نمونه شاهد منفی نیز ۵ میلی لیتر از محلول Bradford همراه با ۱۰۰ لاندا آب مقطر ترکیب شد.

یافته‌ها

برای تأیید تکثیر پلاسمید در باکتری E. coli DH5 α محصول مورد نظر بر روی ژل ۱ درصد آگارز، الکتروفورز گردید. نتایج الکتروفورز در شکل ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱. الکتروفورز استخراج پلاسمید. همان‌طور که مشاهده می‌گردد، باندی با وزن ۲۹۰۰ جفت‌باز دیده می‌شود که نشان از حضور pUC18 می‌باشد و ژن IL1-RA در داخل آن ساب کلون شده است.

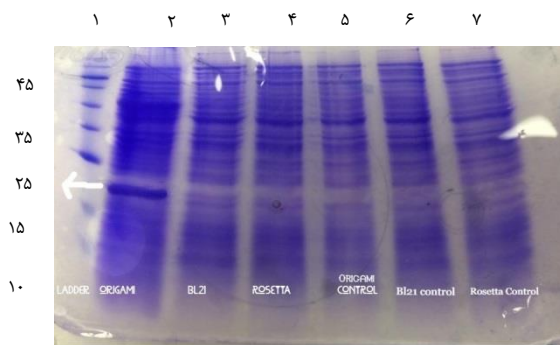
۵ پیکومول/میکرولیتر، ۵ میکرولیتر 10x buffer به همراه کلرید منیزیم (MgCl_2) و ۳۰/۲۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده گردید. پس از انجام Colony PCR، محصول به دست آمده الکتروفورز گردید و باند مربوط به تکثیر ژنی مرتبط بین این دو پرایمر شناسایی شد.

انتقال وکتور بیانی pET28a به داخل سیستم بیانی Escherichia coli شامل (DE3) BL21 (DE3) و Origami (DE3) و Rosetta (DE3) و بیان موتانت آنتاگونیست گیرنده‌ی اینترلوکین ۱
نو ترکیب انسانی: وکتور بیانی حامل ژن مورد نظر به داخل باکتری‌های بیانی Rosetta، Origami، E. coli BL21(DE3) منتقل شد. سپس، بر روی محیط کشت LB Agar کشت داده و به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. آن گاه، تک کلنی از روی کلنی‌های ایجاد شده بر روی محیط برداشته و در ۱۰۰ سی سی محیط LB agar آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر کشت داده و در Shaker انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن که OD آن پس از ۱۶ ساعت به عدد ۰/۴ رسید، از ۱ میلی مولار IPTG، برای القای پروتئین استفاده و به محیط کشت اضافه شد و بار دیگر، به مدت ۵-۶ ساعت در Shaker انکوباتور قرار داده شد تا بیان پروتئین به طور کامل انجام گردد. بیان پروتئین به صورت اینکلوزن بادی در داخل سیتوپلاسم باکتری انجام شد. سپس، کل محیط با شتاب ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد.

شکستن سلول باکتری و تجزیه کردن سلول: رسوب حاصل، به مقدار ۰/۲ گرم به دست آمد. سپس، در ۴۰۰ سی سی Dithiothreitol (DTT) حل گردید و با استفاده از دستگاه هموژنایزر شرکت SOAVI، رسوب حل شده ۴ مرتبه با فشار ۱۲۰ بار (Bar) شکسته شد. پس از شکستن، محلول با شتاب ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتیفریوژ گردید و بار دیگر، رسوب حاصل وزن شد و مقدار ۰/۱ گرم به دست آمد. سپس، رسوب مورد نظر در Wash buffer حل گردید که حاوی ۵۰ میلی مولار، Triton x100، Trisaminomethane، Tris (۵۰ میلی مولار و EDTA) ۵ میلی مولار و Dithiothreitol (DTT) ۱ میلی مولار بود. سپس، محصول به دست آمده به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و پس از آن، محلول با شتاب ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. رسوب نهایی در ۱۰۰ میکرولیتر Water for injection (WFI) حل شد.

آنالیز بیان پروتئین نو ترکیب: بیان ژن در سوش‌های القا شده با استفاده از دو روش SDS-PAGE و Western blotting بررسی

پس از تأیید لیگاسیون ژن مورد نظر در وکتور بیانی pET28a بیان پروتئین نوترکیب صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، باندی با وزن ۱۶/۸۳ کیلودالتون دیده شد که نشان دهنده‌ی بیان پروتئین نوترکیب است و در سیستم بیانی *E. coli* Origami بیشترین میزان بیان مشاهده گردید. نتیجه‌ی Western blotting نیز در شکل ۵ آمده است.



شکل ۴. طرح الکتروفورزی - Sodium dodecyl sulfate- (SDS-PAGE) Polyacrylamide gel electrophoresis

موتانت آنتاگونیست گیرنده‌ی اینترلوکین ۱ نوترکیب انسانی القا شده در

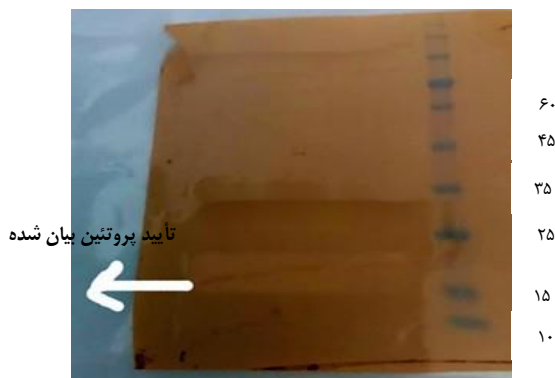
***E. coli* BL21**

چاهک ۱: پروتئین لدر (کیلودالتون)، چاهک‌های ۲، ۳، ۴: پس از القای

، Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)

چاهک‌های ۵، ۶ و ۷: شاهد منفی

پروتئین بیان شده در سیستم بیانی *E. coli* Origami، پس از تخلیص با رزین نیکل، بر روی ژل SDS-PAGE برده شد و پروتئین خالص شده مشاهده گردید. شکل ۶، نتیجه‌ی آزمایش تخلیص پروتئین نوترکیب با رزین نیکل را نشان می‌دهد.



شکل ۵. نتیجه‌ی Western blotting تأییدکننده‌ی تولید پروتئین IL-IRA

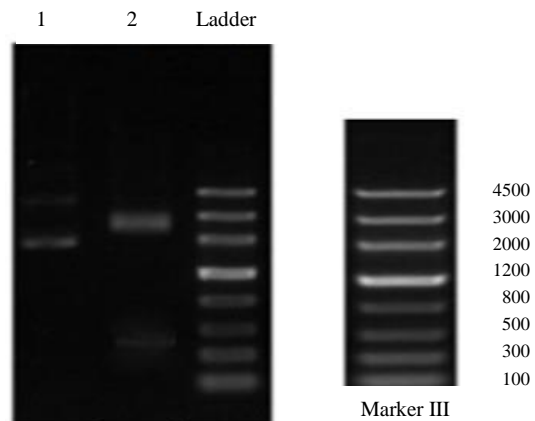
چاهک ۱: باند نشانگر پروتئین شرکت Sigma، چاهک ۲: *E. coli* BL21

چاهک ۳: *E. coli* Rosetta، چاهک ۴: *E. coli* Origami (مقدار ۳۰ میکرولیتر)،

چاهک ۵: باکتری منتقل شده بدون القای -IPTG

thiogalactopyranoside (IPTG)

هضم آنزیمی بر روی پلاسمید pUC18 با دو آنزیم محدود کننده‌ی BamHI-HF و NdeI انجام گرفت و ژن مورد نظر در ناحیه‌ی ۴۵۹ جفت‌بازی به وسیله‌ی الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید. در شکل ۲، این ژن جداسازی شده، قابل مشاهده است.



Lnae M: Mrker III
Lane 1: 419493-6 plasmid
Lane 2: 419493-6 plasmid digested by NdeI and BamHI

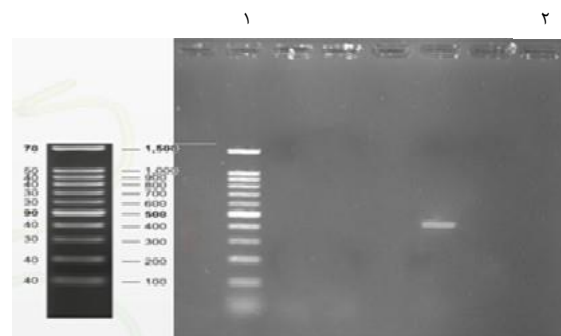
شکل ۲. هضم آنزیمی پلاسمید pUC18 با آنزیم‌های NdeI و

BamHI-HF بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

چاهک M: نشانگر DNA، چاهک ۱: نمونه‌ی پلاسمید حلقوی دو رشته‌ای برش

نخورده، چاهک ۲: پلاسمید هضم شده‌ی pUC18

از ۳ چاهک موجود در ژل الکتروفورز، در چاهک دوم، ژن IL-IRA هضم شده از پلاسمید کلونینگ pUC18 مشاهده می‌گردد. به منظور تأیید لیگاسیون ژن در داخل وکتور بیانی pET28a، Colony PCR انجام داده شد که نتیجه‌ی آن بر روی ژل الکتروفورز در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳. Colony polymerase chain reaction

(Colony PCR) توالی IL-IRA داخل وکتور بیانی pET28a

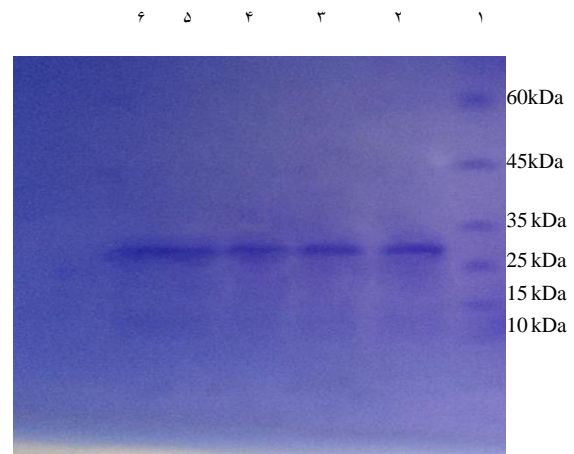
چاهک ۱: DNA Ladder، چاهک ۲: توالی IL-IRA و توالی بین دو ناحیه‌ی

پرایمر با وزن ۴۵۹ جفت‌باز

که میزان بیان پروتئین با پیوند دی سولفیدی، بالاتر می باشد (۹). بیان پروتئین به صورت اینکلوژن بادی (تجمعات داخل سیتوپلاسمی) مزایایی دارد. به عنوان مثال، مقدار بیان پروتئین، بالا می باشد و پروتئین از تجزیه ی پروتئولیتیک آنزیم ها در امان می ماند. مشکل اصلی آن، این است که برای محلول کردن پروتئین، راه پیچیده و طولانی وجود دارد. در این مطالعه، چنین نتیجه گیری شد که فرم بهینه سازی شده ی این پروتئین در سیستم های بیانی باکتری *E. coli* بیان شود.

سیستم بیانی *E. coli* دارای مزایای فراوانی است؛ از جمله این که کنترل بیان ژن ساده است، بازده پروتئین نو ترکیب بالا (تا ۵۰ درصد کل پروتئین های سلول) و نیز کشت آن ساده می باشد (۱۰). در این مطالعه، ابتدا از باکتری *E. coli* DH5 α به عنوان میزبان کلونینگ و سپس، جهت بیان پروتئین از وکتور بیانی pET28a استفاده شد. قدرتمندترین سیستمی که تا کنون به منظور کلونینگ و بیان پروتئین های نو ترکیب در *E. coli* طراحی شده است، سیستم pET می باشد که به وسیله ی کمپانی نواژن تولید شده است (۱۲-۱۱). باکتری *E. coli* Rosetta، *E. coli* Origami و *E. coli* BL21 (DE3) دارای ژن T7 در داخل کروموزوم خود می باشند و همچنین، نقص در پروتئازهای Lon و OmpT دارند. این باکتری ها لیزوژن باکتریوفاژ DE3 (یکی از مشتقات فاژ لامبدا) هستند (۱۳).

پلاسمید بیانی مورد استفاده در این مطالعه، pET28a بود که دارای ویژگی های مهمی نظیر پروموتور قدرتمند T7 برای تولید بیشترین پروتئین، توالی His-tag در انتهای کربوکسیلی برای تسهیل خالص سازی پروتئین هدف و ژن مقاومت به کانامایسین برای غربالگری آسان است. تاکنون، از سیستم های بیانی مختلفی نظیر مخمر (۱۴) استفاده شده است؛ اما سیستم بیانی *E. coli* (DE3) دارای ویژگی هایی از جمله بازدهی بالای پروتئین و رشد باکتری بر روی محیط های کشت ارزان و ساده می باشد. همچنین، از آن جایی که فرم نو ترکیب آنتاگونیست گیرنده ی اینترلوکین ۱ غیر گلیکوزیله می باشد، نیازی به سیستم بیانی مخمر و یا سلول پستانداران ندارد. با توجه به نتایج به دست آمده از بیان این پروتئین در باکتری، تفاوت محسوسی در بیان این پروتئین در سوش *E. coli* Origami نسبت به دو سوش دیگر مشاهده گردید. از آن جایی که بیشتر به صورت تجاری بر روی این پروتئین کار شده است و اطلاعات اندکی از آن موجود می باشد، بر روی مطالعات انجام شده در این زمینه، بحث می شود. در مطالعه های میزان بیان پروتئین با افزایش روبرو شد (۱۵). محققین در شرایط مختلف محیطی و همچنین، غلظت های مختلف IPTG و زمان های معین، میزان بیان را مشخص کردند. آن ها دریافتند که اگر القای باکتری با غلظت IPTG معادل ۱ میلی مولار و یک



شکل ۶. نتیجه ی Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel

electrophoresis (SDS-PAGE) تأیید کننده ی تولید پروتئین

IL-IRA بعد از تخلیص با رزین نیکل

چاهک ۱: پروتئین Ladder، چاهک های ۲ و ۳: پروتئین تخلیص شده از سوش *E. coli* Origami، چاهک ۴: پروتئین تخلیص شده از سوش *E. coli* Rosetta، چاهک ۵: پروتئین تخلیص شده از سوش *E. coli* BL21 و چاهک ۶: شاهد

سپس، غلظت پروتئین بیانی در سه سوش انتخابی، اندازه گیری شد. مقدار پروتئین بیان شده در باکتری های *E. coli* BL21 و *E. coli* Origami به ترتیب، ۰/۱۰، ۰/۱۰، ۱/۰۲ و ۰/۵۰ میلی گرم/میلی لیتر بود.

بحث

یافته های مطالعه حاکی از آن است که با مقایسه ی سه سویه ی رایج جهت بیان پروتئین، مقدار قابل توجهی از IL-IRA نو ترکیب، از باکتری *E. coli* Origami (DE3) به صورت خالص شده به دست آمده است. در این مطالعه، جهت فرایند تولید و بومی سازی این پروتئین، تا مرحله ی بیان و تخلیص این پروتئین اقدام شد و با توجه به اهمیت این پروتئین در بیماران نیازمند، تولید آن می تواند پیشرفت خوبی در زمینه ی تولید پروتئین های نو ترکیب درمانی به شمار آید. پروتئین های نو ترکیبی که در سیتوپلاسم باکتری تولید می شوند، به دلیل میزان رشد بالا در کنار افزایش میزان پروتئین تولید شده، منجر به تجمع پروتئین در سیتوپلاسم باکتری (اینکلوژن بادی) می گردد.

در این مطالعه، در خصوص مقایسه ی سوش باکتریایی انتخابی برای بیان بالاتر پروتئین آنتاگونیست گیرنده ی اینترلوکین ۱، باکتری *E. coli* Origami (DE3) به عنوان سوش مناسب برای بیان بالای پروتئین در نظر گرفته شد و این یافته، می تواند به علت جهش آنزیم های تیوردوکسین ردوکتاز و گلوکاتایون ردوکتاز باشد که ایجاد باندهای دی سولفیدی را تسهیل می کند و در مطالعات دیده شده است

پروتئین دارند، بررسی انجام نگرفته است (۹).

بیان این پروتئین در سیستم‌های *E. coli* به علت عدم توانایی در اعمال تغییرات پس از ترجمه، با محدودیت‌هایی نظیر تشکیل باند دی‌سولفیدی مواجه می‌شود که در این حالت، می‌توان از ارگانیس‌هایی نظیر مخمر و یا Chinese hamster ovary (CHO) استفاده کرد اما با توجه به این که کار با این دو نوع ارگانیس‌م بسیار هزینه‌بر است و همچنین، بیان بسیار پایین پروتئین، تصمیم گرفته شد که از سیستم بیانی باکتری *E. coli* استفاده شود تا بتوان به مقادیر بالای پروتئین دست یافت. به دلیل این که این پروتئین دارای باندهای دی‌سولفیدی می‌باشد، و باکتری *E. coli Origami* توانایی تشکیل باندهای دی‌سولفیدی را دارد، بیان این پروتئین در باکتری افزایش می‌یابد و تمام مراحل خالص‌سازی پروتئین با این باکتری، پیش رفت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که باکتری *E. coli Origami* سوش مناسبی برای تولید بالای پروتئین نوترکیب آنتاگونیست گیرنده‌ی ایترلوکین ۱ می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی میکروبیولوژی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران پزشکی بوده است. بدین وسیله از تمام کسانی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

شبانروز، در *Shaker* انکوباتور قرار گیرد، بیشترین میزان بیان را به دست می‌آورد. در واقع، این مطالعه، به دنبال بهینه‌سازی پروتئین در سویی مشخص باکتری انجام شد و عوامل مؤثر در میزان بیان پروتئین بررسی گردید، اما در مطالعه‌ی حاضر، به دنبال انتخاب سویی مناسب برای افزایش بیان پروتئین با توجه به ویژگی‌های باکتریایی بودیم.

Birikh و همکاران، مقاله‌ای در خصوص بیان IL-IRA به چاپ رساندند. در این مطالعه، از وکتور بیانی pGMCE و همچنین، دست‌کاری ژنتیکی ناحیه‌ی شروع ترجمه، به منظور افزایش بیان ژن استفاده کردند (۱۶). آن‌ها متوجه شدند که با دست‌کاری وکتور بیانی، می‌توان بیان پروتئین را بالا برد، اما بر روی باکتری بیانی مطالعه‌ای انجام نشد. در مطالعه‌ای در خصوص بیان با مقدار بالا، سیستم بیانی *E. coli* به عنوان سوش بیانی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه، به مقدار ۰/۴۳ گرم/لیتر محیط کشت باکتریایی به دست آوردند. این مقدار، با توجه به آن که در فرمانتور تولید شده بود، بسیار کم بود و این می‌تواند به دلیل عدم بهینه‌سازی سیستم بیانی باکتری *E. coli* باشد (۱۷).

در مطالعه‌ی دیگری، از باکتری *E. coli BL21 (DE3)* استفاده شد. در این تحقیق، ارتباط بین زمان القا و میزان بیان پروتئین بررسی و مشاهده شد که بعد از یک شبانه‌روز، بیان این پروتئین بالاتر بوده است، اما بر روی سوش‌های باکتریایی که نقش به‌سزایی در بیان

References

- Wood DD, Ihrie EJ, Dinarello CA, Cohen PL. Isolation of an interleukin-1-like factor from human joint effusions. *Arthritis Rheum* 1983; 26(8): 975-83.
- Schulz MF, Buell G, Schmid E, Movva R, Selzer G. Increased expression in *Escherichia coli* of a synthetic gene encoding human somatomedin C after gene duplication and fusion. *J Bacteriol* 1987; 169(12): 5385-92.
- Carter DB, Deibel MR, Jr., Dunn CJ, Tomich CS, Laborde AL, Slightom JL, et al. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 1990; 344(6267): 633-8.
- Perrier S, Darakhshan F, Hajduch E. IL-1 receptor antagonist in metabolic diseases: Dr Jekyll or Mr Hyde? *FEBS Lett* 2006; 580(27): 6289-94.
- Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30(5 Suppl 2): 1-6.
- Chen Z, Chen H, Wang X, Ma X, Huang B. Expression, purification, and characterization of secreted recombinant human insulin-like growth factor-binding protein-6 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2007; 52(2): 239-48.
- Kim SO, Lee YI. High-level expression and simple purification of recombinant human insulin-like growth factor I. *J Biotechnol* 1996; 48(1-2): 97-105.
- Khuzaima I, Iftikhar K, Tabarruk U, Sadia H, Akhtar H, Shami K. Studying the pharmacokinetics of interleukin-IRA mutants. *BioScientific Review* 2019; 1(1): 17-23.
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 1989; 85(1): 109-14.
- Al-Hejin A, Bora R, Ahmed M. Plasmids for optimizing expression of recombinant proteins in *E. coli*. In: Gull M, editor. *Plasmid*. London, UK: IntechOpen; 2019.
- Studier FW. Improved cloning and expression vectors and systems (WO2017139412A1) [Google Patents]. 2017.
- Miller MG, Chng C, Alvizo O, Mayo MA, Riggins JN, Yi X, et al. T7 ma polymerase variants. Redwood City, CA; US20190002851. 2019.
- Ranjbari J. Engineered recombinant protein production systems originated from *Escherichia coli*. *Trends in Peptide and Protein Sciences* 2018; 3: e2.
- Buryškova M, Pospisek M, Grothey A, Simmet T,

- Burysek L. Intracellular interleukin-1alpha functionally interacts with histone acetyltransferase complexes. *J Biol Chem* 2004; 279(6): 4017-26.
15. Wang YX, Yang ZX, Zhu HQ, Zhou XW, Huang PT. Construction, expression and preliminary pharmacokinetic analysis of IL-1ra mutants. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2006; 22(3): 472-6. [In Chinese].
16. Birikh KR, Lebedenko EN, Boni IV, Berlin YA. A high-level prokaryotic expression system: Synthesis of human interleukin 1 alpha and its receptor antagonist. *Gene* 1995; 164(2): 341-5.
17. Zanette D, Dundon W, Soffientini A, Sottani C, Marinelli F, Akeson A, et al. Human IL-1 receptor antagonist from *Escherichia coli*: Large-scale microbial growth and protein purification. *J Biotechnol* 1998; 64(2-3): 187-96.

Cloning and Expression of Recombinant Human Interleukin 1 Receptor Antagonist in Escherichia Coli Strains, BL21 (DE3), Rosetta (DE3), and Origami (DE3)

Hanieh Fardgoli¹, Seyed Nezameddin Hoseini², Setareh Haghighat³

Original Article

Abstract

Background: Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) is a protein with 153 amino acids and molecular weight of 16.83 kDa. This drug protein is known as Anakinra, and has an effective application in the treatment of rheumatoid arthritis. This study was conducted to examine the produce of the recombinant IL-1RA protein in Escherichia coli (E. coli) strains.

Methods: Codon optimization of IL-1RA gene was done using GenScript, and the gene was cloned in the pUC18 as cloning vector. Then, plasmid was cut by two restriction enzymes including NdeI and BamHI enzymes. IL-1RA gene was purified from the agarose gel. IL-1RA gene was ligated into expression vector. The constructed expression cassette was transformed into E. coli BL21 (DE3) Origami (DE3) and Rosetta (DE3) using CaCl₂ and heat shock method.

Findings: Identification and confirmation of transformed colonies was performed using colony polymerase chain reaction (PCR). Induction of this gene was done with isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The protein expression was analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting techniques, and it purified by Ni nickel resin. Expression analysis of transformed E. coli strains confirmed that gene integrated into expression host. Molecular weight of expressed protein was estimated to be 16.83 kDa.

Conclusion: In this study, Human IL-1RA was successfully produced in E. coli Origami with high quantity other than the rest of E. coli strains. Therefore, E. coli BL21 Origami (DE3) can be used as the suitable host for production of recombinant IL-1RA, and this technology has a potential for localization.

Keywords: Interleukin 1 receptor antagonist protein, Recombination, Escherichia coli

Citation: Fardgoli H, Hoseini SN, Haghighat S. Cloning and Expression of Recombinant Human Interleukin 1 Receptor Antagonist in Escherichia Coli Strains, BL21 (DE3), Rosetta (DE3), and Origami (DE3). J Isfahan Med Sch 2019; 37(539): 965-72.

1- MSc Student, Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Recombinant Hepatitis B Vaccine, Production and Research Complex, Pasteur Institute of Iran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Setareh Haghighat, Email: setareh_haghighat@yahoo.com