Archive of SID

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۱ بهار ۹۶ (۶۴-۵۳)

مقاله پژوهشی

جداسازی، همسانه‌سازی و بیان فاکتور سلول بنیادی با استفاده از سیستم بیانی پروکاریوتی

مهسا نایب‌هاشمی[۱]، مهشید محمدی‌پور[۲]، حسین فهیمی[۳]، مهریار حبیبی رودکنار[۴]، محمد علی جلیلی[۵]

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور سلول بنیادی(SCF)، یک گلیکوپروتئین ۲۸ تا ۴۰ کیلودالتونی است که نقش مهمی را در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خونساز(HSCs) بازی می‌کند. هدف این مطالعه جداسازی، کلونینگ و بیان SCF در میزبان بیانی Rosetta بود. Rosetta علاوه بر ویژگی‌های میزبان بیانی پروکاریوتی، انتظار می‌رفت با فراهم کردن کدون‌های نادر پروتئین‌های یوکاریوتی، سطح بیان پروتئین نوترکیب را افزایش دهد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام از نوع تجربی بود. RNA تام از سلول‌های Hela استخراج و به دنبال آن cDNA ساخته شد. توالی رمزکننده SCF ، به وسیله آغازگرهای اختصاصی جداسازی و تکثیر شد و با استفاده از وکتور بیانی pET-32a در *E.coli* TOP 10 همسانه‌سازی شد. سازه نوترکیب به وسیله PCR ، هضم آنزیمی و تعیین توالی تایید شد. وکتور نوترکیب در میزبان بیانی Rosetta تراریخت شد. بیان SCF نوترکیب در حضور IPTG القا شد. بیان فاکتور سلول بنیادی انسانی(hSCF) با SDS-PAGE و وسترن بلات ارزیابی و تایید شد.

یافته‌ها

توالی رمزکننده SCF با موفقیت از سلول‌های Hela جداسازی و در وکتور بیانی pET-32a همسانه‌سازی و بیان پروتئین نوترکیب در میزبان بیانی Rosetta انجام شد.

نتیجه‌گیری

در سیستم بیانی Rosetta ، امکان تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با کدون‌های نادر مثل AGG ، AGA ، AUA ، CUA ، CCC و GGA وجود دارد بنابراین به میزان بالایی پروتئین فاکتور سلول بنیادی تولید می‌شود.

کلمات کلیدی: گلیکوزیلاسیون، سلول بنیادی، PCR

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۴
تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۲۵

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD ژنتیک مولکولی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- PhD ژنتیک مولکولی ـ استادیار گروه علوم سلولی و مولکولی ـ دانشکده علوم و فناوری‌های نوین ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی ـ تهران ـ ایران
۴- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ـ دانشکده پزشکی دانشگاه گیلان ـ رشت ـ ایران
۵- مؤلف مسئول: PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

مقدمه

خونسازی توسط تعدادی از سایتوکاین‌ها تنظیم می‌شود که باعث بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خونساز می‌شوند. یکی از مهم‌ترین این سایتوکاین‌ها فاکتور سلول بنیادی(Stem Cell Factor: SCF) است که به رسپتور C-kit (CD117) با فعالیت تیروزین کینازی متصل می‌شود (۵-۱). SCF یک گلیکوپروتئین هموداِیمر با وزن مولکولی ۴۰-۲۸ کیلو دالتون و دارای ۴ واحد سیستئین(Cys) است که در پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی شرکت می‌کنند (۸-۶). این فاکتور رشد توسط سلول‌های اندوتلیال، فیبروبلاست، سلول‌های استرومایی مغز استخوان و سلول‌های کراتینوسیت در پوست بیان می‌شود(۱۰، ۹). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که SCF مکمل ضروری در کشت سلول‌های بنیادی خونساز است(۱۲، ۱۱). فرم بالغ این پروتئین در انسان با حدود ۱۸۹ آمینواسید است. SCF دارای دو ایزوفرم تراغشایی و محلول است. SCF به شکل محلول با داشتن ۱۶۵ آمینو اسید در حدود ۱۸/۵کیلو دالتون وزن مولکولی دارد. SCF تراغشایی در حدود ۲۲۰ تا ۲۴۸ آمینواسید دارد(۱۴، ۱۳، ۲، ۱). حضور یا عدم حضور گلیکوزیلاسیون در فعالیت‌های خاص فاکتور سلول بنیادی تاثیر نمی‌گذارد(۶). از یک سو مشکلات عدیده در دسترسی و قیمت بالای این محصول به صورت تجاری و از سوی دیگر نیاز کشور در حوزه بهداشت و سلامت به این محصول، اهمیت تولید خودکفای این محصول را بر همگان آشکار می‌سازد. با در نظر گرفتن این نکته که به نظر می‌رسد گلیکوزیلاسیون در عملکرد این پروتئین نقش مهمی ندارد بنابراین استفاده از سیستم‌های بیانی یوکاریوتی با توجه به نیاز به صرف وقت و هزینه زیاد توجیه‌پذیر نخواهد بود. بلکه اکثر انواع تجاری این پروتئین در سیستم‌های بیانی پروکاریوتی مثل pET system و در میزبان بیانی *Ecoli BL21* تولید می‌شوند. این سیستم بیانی علاوه بر این که تولید در مقیاس وسیع را فراهم می‌کند، می‌تواند تولید این محصول را با صرف زمان و هزینه کمتری نسبت به سیستم‌های یوکاریوتی فراهم کند. در مطالعه حاضر از میزبان بیانی Rosetta استفاده شد که ضمن بهره‌برداری از تمامی مزایای یک سیستم بیانی پروکاریوتی مانند تولید مقادیر زیادی از پروتئین با هزینه نسبتاً کمتری نسبت به سایر سیستم‌های بیانی از جمله سلول‌های یوکاریوتی و امکان ارتقا به تولید در مقیاس وسیع و تجاری‌سازی را نیز فراهم می‌سازد. از سوی دیگر به دلیل وجود کدون‌های نادری در توالی رمزکننده پروتئین SCF و با توجه به این که میزبان بیانی Rosetta تمام tRNA های کدون‌های نادر را پشتیبانی می‌کند، برای تولید پروتئین SCF نوترکیب که توالی رمزکننده آن از منبع یوکاریوتی(رده سلولی Hela) جداسازی شده بود، از آن استفاده شد. استفاده از این میزبان برای تولید پروتئین فاکتور سلول بنیادی(SCF) تاکنون گزارش نشده است(۲۳-۱۵).

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون تهران در سال‌های ۹۵-۹۴ انجام شد.

پلاسمید pET-32a (آمریکا، نواژن) به عنوان وکتور کلونینگ و بیان، سویه باکتری *E. coli TOP10* به عنوان میزبان کلونینگ و سویه Rosetta (آمریکا، نواژن) به عنوان میزبان بیانی انتخاب شد. وکتور pET-32a حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است که به منظور غربالگری کلون‌های پایدار ترانسفکت شده در رده سلول پروکاریوتی استفاده گردید. این وکتور دارای دو برچسب هیستیدینی (His6-tag) در انتهای آمین و کربوکسیل برای شناسایی پروتئین در وسترن بلات و هم چنین یک برچسب تیوردوکسین(trx-tag) برای افزایش احتمال تشکیل پیوند دی‌سولفید در سیتوپلاسم باکتری میزبان است.

رده سلولی Hela با منشا سلول‌های سرطانی دهانه رحم انسان(بانک سلولی انستیتو پاستور، ایران) در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS ، ۱ ٪ پنی‌سیلین و ۱٪ استرپتومایسین در شرایط استریل و با استفاده از هود لامینار در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شد.

جداسازی ژن فاکتور سلول بنیادی:

استخراج RNA از سلول‌های Hela ، با استفاده از محلول ترایزول TriPure Isolation Reagent محصول شرکت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: آغازگر جهت ایجاد قطعه ۲۲۱ جفت بازی از نواحی داخلی فاکتور سلول بنیادی و آغازگر جهت ایجاد قطعه ۱۹۰ جفت بازی ژن بتا اکتین و آغازگر جهت ایجاد قطعه ۵۱۶ جفت بازی از ژن فاکتور سلول بنیادی

آغازگر	توالی		دمای اتصال	اندازه محصول
Beta-actin	جلوبرنده	5'-tcatgaagatcctcaccgag-3'	۵۵ درجه سانتی‌گراد	۱۹۰ جفت باز
	معکوس	5'-ttgccaatggtgatgacctg-3'		
SCF-internal	جلوبرنده	5'- cgggatggatgttttgccaa-3'	۵۵ درجه سانتی‌گراد	۲۲۱ جفت باز
	معکوس	5'- tgggttctgggctcttgaat-3'		
SCF-total	جلوبرنده	5' agtcaccatggaagggatctgcaggaatcg-3'	۵۹ درجه سانتی‌گراد	۵۱۶ جفت باز
	معکوس	5' ttaatctcgagggctgcaacaggggtaac-3'		

رُوش طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ بررسی و با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید گردید.

ساخت cDNA به‌روش نسخه‌برداری معکوس از RNA رده سلولی(Hela) با استفاده از کیت محصول بیونیر با ۲/۵ میکروگرم RNA در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر حاوی DEPC در ترمال سایکلر بیوراد به تعداد ۱۲ دور انجام شد. پیش از این مرحله، آغازگرهای اختصاصی برای ژن بتااکتین و نواحی داخلی ژن *SCF* به وسیله نرم‌افزار primer3 طراحی شد. سپس واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن خانه‌داری بتااکتین به‌عنوان کنترل و آغازگرهای اختصاصی نواحی داخلی ژن *SCF* به طور جداگانه در ۳۵ چرخه انجام شد. به منظور بررسی کیفیت cDNA ، ژن *β- actin* (ژنی که به صورت عمومی در تمام سلول‌ها وجود دارد و جزو ژن‌های خانه‌دار است) به عنوان کنترل انتخاب شد. جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی توالی رمزکننده SCF ، ابتدا توالی mRNA فاکتور سلول بنیادی از بانک ژن *NCBI* به دست آمد و پس از انتخاب توالی رمزکننده پروتئین بالغ SCF به فرم محلول به طول ۴۹۵ جفت باز، برای طراحی آغازگر رفت (Forward) ۲۰ نوکلئوتید از ابتدای این توالی انتخاب و به '۵ آن، توالی جایگاه برش اختصاصی با آنزیم NcoI اضافه شد. برای طراحی آغازگر برگشت(Reverse) ، ۲۰ نوکلئوتید ابتدایی مکمل معکوس توالی یاد شده انتخاب و به '۵ آن توالی جایگاه برش با آنزیم XhoI اضافه شد. توالی‌های اختصاصی برش با NcoI و XhoI در جایگاه کلونینگ وکتور وجود دارد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *SCF* در ۳۵ چرخه انجام شد (جدول ۱).

بعد از الکتروفورز محصول PCR برروی ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE، برای حذف ترکیبات اضافی شامل پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها و آغازگر دایمرهای احتمالی و به دست آوردن محصول خالص واکنش PCR ، تخلیص از ژل با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification مطابق دستورالعمل شرکت سازنده(آلمان، رُوش) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت.

همسانه‌سازی توالی رمزکننده SCF :

یک کلونی از پلیت کشت باکتری *Ecoli DH5α* دارای وکتور pET-32 (حامل ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین) انتخاب و در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کشت داده شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (ایران، یکتا تجهیز عظما) به روش Miniprep انجام شد. کمیت و کیفیت پلاسمید استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ سنجیده شد. به منظور همسانه‌سازی قطعه ژنی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی در وکتور pET-32a ، که در مرحله قبل با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی تکثیر شده بود و با توجه به وجود جایگاه‌های برش

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

اختصاصی با آنزیم‌های محدودکننده XhoI و NcoI در انتهای '۵ این دو آغازگر، وکتور و قطعه هدف هر دو تحت اثر این دو آنزیم برش داده شدند. وکتور و قطعه ژنی برش خورده پس از تخلیص و تعیین غلظت، به نسبت مولی ۱:۴ به وسیله آنزیم T4 DNA ligase به هم متصل شدند. بعد از آماده‌سازی سلول‌های *E. coli TOP10* جهت پذیرش پلاسمید، تراریختی سلول‌های مستعد(competent cells) انجام شد. جهت انتخاب کلونی‌های حاوی وکتور نوترکیب از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین(۱۰۰ µg/mL) استفاده شد و صحت انجام کلونینگ به وسیله colony-PCR، Digestion pattern و sequencing تأیید شد.

پس از تعیین توالی، ۱۳ کدون نادر مربوط به پروتئین یوکاریوتی به وسیله نرم‌افزار Rare Codon Analysis یافت شد. سپس باکتری Rosetta دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در محیط LB (Lysogeny broth) حاوی این آنتی‌بیوتیک کشت داده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. پس از تهیه سلول‌های مستعد برای پذیرش وکتور نوترکیب و تراریختی آن‌ها، باکتری‌های تراریخته بر روی محیط کشت انتخابی شامل آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل (که ژن مقامت به آن در Rosetta وجود دارد) و هم چنین آمپی‌سیلین(که ژن مقامت به آن بر روی وکتور نوترکیب pET32-SCF قرار دارد)، رشد کرده و کلونی تشکیل دادند که نشان‌دهنده ورود وکتور نوترکیب به سلول‌های باکتری بود.

بیان پروتئین نوترکیب فاکتور سلول بنیادی:

یک کلونی از باکتری Rosetta تراریخته حاوی وکتور نوترکیب در محیط LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و ۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه(rpm) نگهداری شد. از کشت شبانه باکتری، کشت تازه تهیه شده تا دانسیته جذب نوری(OD) رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۴ رسید. ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت باکتری به عنوان کنترل قبل از القای بیان پروتئین برداشت شد. جهت القای بیان پروتئین، IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار اضافه شد. سپس به منظور تعیین زمان مناسب برای بیان پروتئین در فواصل ۲ و ۴ ساعت، ۲ میلی‌لیتر نمونه از سوسپانسیون باکتری برداشت شد. پس از تهیه عصاره سلولی از نمونه‌های ۲ و ۴ ساعته باکتری‌های القا شده، بیان پروتئین با الکتروفورز عصاره سلول‌های باکتری بر روی ژل پلی‌آکریل امید ۱۲٪ و سپس رنگ‌آمیزی با رنگ کوماسی بلو R-250 مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین در نتیجه بهینه‌سازی بیان پروتئین، ۴ ساعت القا با IPTG زمان مناسب ارزیابی شد.

آزمایش SDS-PAGE و وسترن بلات (Western Blot):

الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE در سیستم بافری ناپیوسته شامل ژل متراکم‌کننده و ژل جداکننده انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ، همراه با شاخص وزن مولکولی به وسیله سرنگ همیلتون به چاهک‌های ژل منتقل شدند. بعد از اتمام الکتروفورز به مدت ۴ ساعت در اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت، کاست حاوی ژل باز شد و بخش بالایی ژل (متراکم‌کننده) جدا شد. سپس با استفاده از رنگ کوماسی به مدت ۲ ساعت رنگ شده و پس از رنگ‌زدایی با محلول رنگ‌بری به مدت ۲ ساعت روی شیکر مورد بررسی قرار گرفت.

برای تأیید اختصاصیت پروتئین نوترکیب، آزمایش وسترن بلات طبق روش استاندارد انجام شد. به طور خلاصه پس از الکتروفورز پروتئین بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید به روش SDS-PAGE ، عمل انتقال باندهای تفکیک شده پروتئین‌ها به غشای PVDF (رُوش، آلمان) با روش الکتروبلاتینگ نیمه خشک انجام شد. برای کنترل انتقال پروتئین از رنگ پانسواس استفاده شد. مسدود سازی غشای PVDF با محلول شیرخشک بدون چربی(skim milk) ۵٪ در PBS انجام گرفت و پس از شستشو با PBS در محلول آنتی‌بادی مونوکلونال Anti His-Tag متصل به HRP (سیتومتین ژن، ایران) با رقت ۱:۱۰۰۰ به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. شستشو با بافر PBS حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۲۰ به منظور حذف اتصالات غیر اختصاصی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

آنتی‌بادی‌ها و کاهش پس زمینه غیر اختصاصی انجام شد. غشاء پس از شستشو با محلول سوبسترای رنگزای دی-آمینوبنزیدین (DAB) به مدت یک دقیقه مجاور شده و باندهای مربوطه پس از ظهور، عکس برداری گردید.

یافته‌ها

جداسازی توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی از سلول Hela:

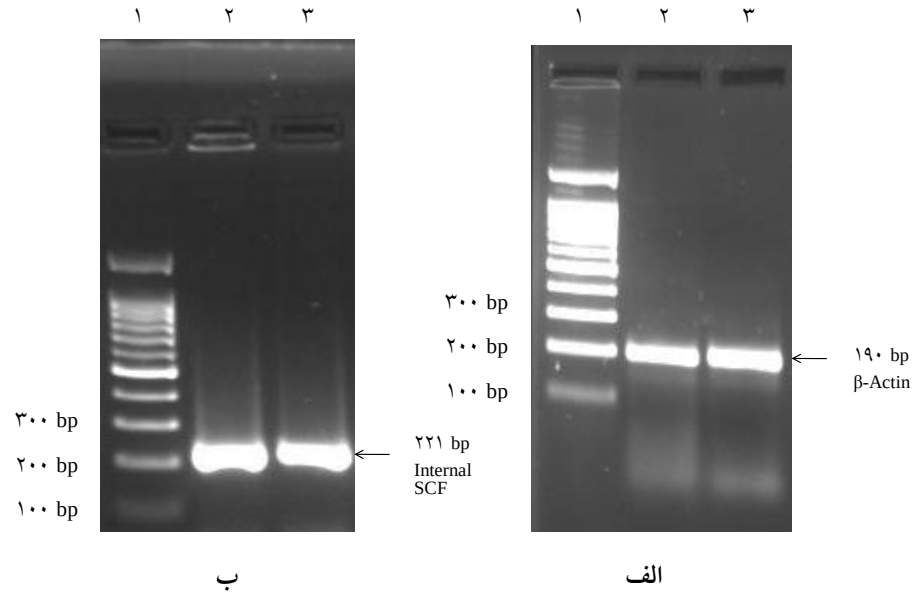
پس از استخراج RNA از سلول‌های Hela و ساخت cDNA و به دنبال آن PCR با آغازگرهای اختصاصی بتا اکتین، مشاهده باند ۱۹۰ جفت بازی در نتیجه الکتروفورز محصول واکنش تکثیر ژن بتااکتین بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TAE نشان‌دهنده کیفیت cDNA ساخته شده می‌باشد(شکل ۱ـ الف)

در نتیجه واکنش PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪، وجود یک باند ۲۲۱ جفت بازی محصول تکثیر نواحی داخلی ژن *SCF* با استفاده از آغازگرهای داخلی نشان داده که سلول‌های اپیتلیالی Hela منبع مناسبی برای جداسازی ژن فاکتور سلول بنیادی است(شکل ۱ـ ب).

بخش رمزکننده پروتئین محلول بالغ به طول ۱۶۵ اسید آمینه از cDNA رده سلولی Hela با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن مذکور به وسیله آنزیم pfu DNA polymerase که دارای قدرت تصحیح خطای همانندسازی است، به وسیله PCR تکثیر شد. مشاهده قطعه‌ای به طول ۵۱۶ جفت باز به عنوان محصول نهایی PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ ، جداسازی توالی رمزکننده SCF محلول را تأیید کرد(شکل ۲).

همسانه‌سازی توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی در وکتور pET32:

توالی رمزکننده SCF پس از برش با آنزیم‌های محدودالاثر اختصاصی به درون وکتور pET-32a ، کلون شد و به درون باکتری *E.coli TOP10* انتقال یافت و کلون‌های باکتری با رشد در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل غربالگری شد.



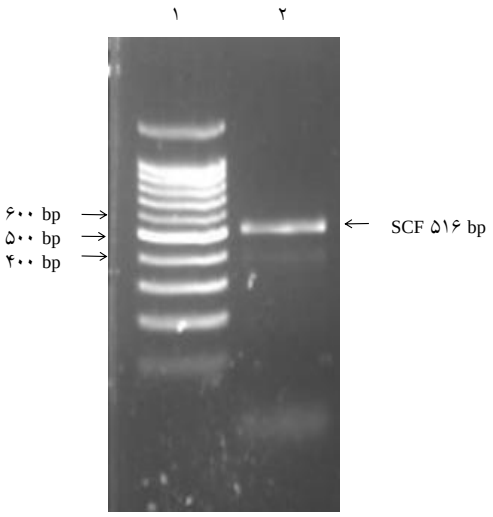
الف ب

شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE ؛ الف: در ستون اول شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، در ستون دوم و سوم باند ۱۹۰ جفت‌بازی محصول تکثیر ژن خانه‌داری بتااکتین با آغازگرهای اختصاصی به عنوان کنترل نشان داده شده است. ب: در ستون اول شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، در ستون دوم و سوم باند ۲۲۱ جفت بازی حاصل تکثیر بخشی از توالی SCF با آغازگرهای داخلی اختصاصی نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی بر روی ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE؛ در ستون اول شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت بازی و در ستون دوم باند ۵۱۶ جفت بازی محصول تکثیر توالی رمزکننده SCF به وسیله آنزیم pfu DNA polymerase و در حضور آغازگرهای اختصاصی با پیکان نشان داده شده است.

در نتیجه الکتروفورز پلاسمیدهای نوترکیب pET32a-SCF استخراج شده از کلونی‌های مثبت در کنار پلاسمید pET-32a به عنوان شاخص، پلاسمیدهای نوترکیب با نشان دادن تأخیر در حرکت بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ از لحاظ وجود قطعه همسانه‌سازی شده، مثبت ارزیابی شدند(شکل۳ – الف). به منظور بررسی صحت همسانه‌سازی ژن هدف در حامل pET-32a از روش تعیین الگوی هضم آنزیمی استفاده شد. بعد از هضم پلاسمید نوترکیب pET32a-SCF استخراج شده از یک کلونی مثبت با دو آنزیم محدودکننده NcoI و XhoI و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪، دو باند مجزا مربوط به پلاسمید خطی به طول ۵/۹ کیلو باز و قطعه هدف به طول ۵۱۶ جفت باز به دست آمد. مقایسه اندازه قطعات حاصل از هضم آنزیمی با شاخص اندازه مولکولی ۱ کیلو جفت بازی، نتیجه همسانه‌سازی را تأیید کرد(شکل ۳ ـ ب). سپس وکتورهای نوترکیب حاوی ژن *SCF* با PCR جداسازی و انتخاب گردید و به منظور اطمینان از صحت توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی کلون شده در وکتور نوترکیب، تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای عمومی T7 promoter و T7 terminator انجام شد. نتایج هم ردیفی توالی SCF کلون شده با توالی ژن فاکتور سلول بنیادی موجود در بانک ژن *NCBI* و نیز نتایج BLAST نوکلئوتیدی توالی‌ها، صحت همسانه‌سازی را تاییدکرد. مقایسه نتایج توالی یابی با توالی‌های مرجع نشان داد هیچ گونه تغییر و جهشی در این قطعه ژن کلون شده روی نداده است. پس از تعیین توالی، کدون‌های نادر به وسیله نرم‌افزار Rare Codon Analysis شامل ۳ کدون AGG، AGA و CGA مربوط به آمینو اسید آرژنین، کدون CTA مربوط به آمینواسید لوسین، کدون ATA مربوط به آمینو اسید ایزولوسین و کدون CCC مربوط به آمینو اسید پرولین یافت شد. در مجموع کدون‌های نادر موجود در توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی کلون شده در پلاسمید pET-32 ، شامل ۵ کدون نادر مربوط به آمینواسید آرژنین در موقعیت ۵ و ۱۰۸ (AGG)، در موقعیت ۱۱۷، ۱۲۱ و ۱۵۱ (AGA) و در موقعیت ۲۸، ۴۳، ۷۴و۸۰، چهار کدون ATA مربوط به آمینو اسید ایزولوسین، در موقعیت ۳۴ ، ۱۰۷ و ۱۳۱، سه کدون CCC مربوط به آمینواسید پرولین و هم چنین در موقعیت ۹۶ کدون CTA مربوط به آمینو اسید لوسین یافت شد.

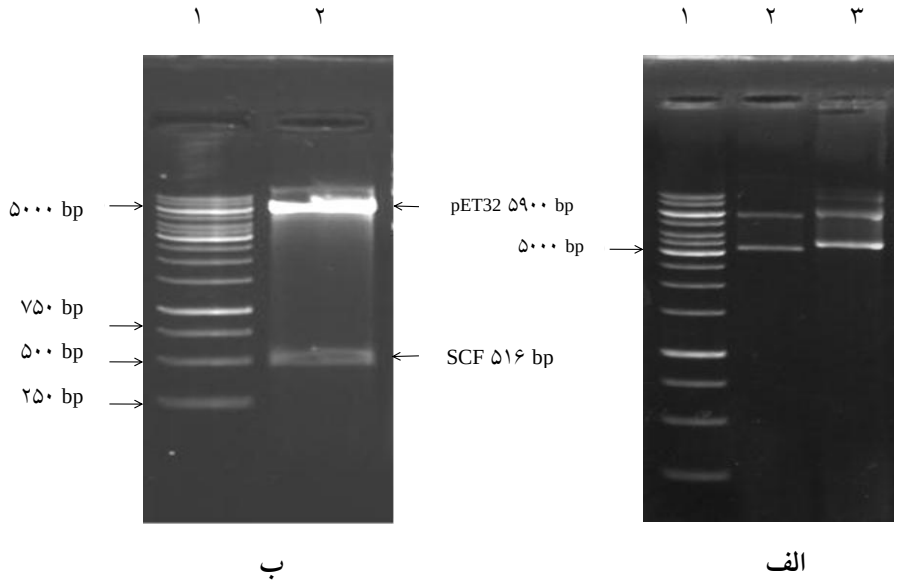
بیان فاکتور سلول بنیادی در میزبان بیانی Rosetta:

پس از تراریختی سلول‌های باکتری Rosetta برای پذیرش وکتور نوترکیب، باکتری‌ها بر روی محیط کشت انتخابی شامل آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل(که ژن مقامت به آن در Rosetta وجود دارد) و هم چنین آمپی‌سیلین(که ژن مقامت به آن بر روی وکتور نوترکیب pET32-SCF قرار

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017



شکل۳ : الف) الکتروفورز پلاسمید نوترکیب در مقایسه با پلاسمید pET-32 کنترل؛ الکتروفورز پلاسمید استخراج شده از کلونی مثبت(ستون ۳) در کنار پلاسمید pET-32 به عنوان کنترل(ستون ۲) با نشان دادن تأخیر در حرکت بر روی ژل آگارز ۱/۵٪، نوترکیب ارزیابی شد. ستون ۱ شاخص اندازه مولکولی ۱ کیلوبازی است. ب) الکتروفورز محصول واکنش هضم آنزیمی وکتور نوترکیب؛ ستون ۱ شاخص اندازه مولکولی ۱ کیلو بازی، ستون ۲ جدا شدن توالی رمزکننده SCF به طول ۵۱۶ جفت باز از وکتور نوترکیب که با پیکان مشخص شده است را نشان می‌دهد.

دارد)، رشد کرده و کلونی تشکیل دادند که نشان‌دهنده ورود وکتور نوترکیب به سلول‌های میزبان Rosetta بود. بعد از القاء بیان پروتئین به وسیله IPTG ، الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE در سیستم بافری ناپیوسته شامل ژل متراکم‌کننده و ژل جداکننده انجام شد.

نتایج الکتروفورز ژل پلی آکریل امید، بیان یک پروتئین در محدوده میان باندهای ۳۵ الی ۴۵ کیلودالتونی شاخص وزن مولکولی را نشان می‌دهد که با وزن مولکولی حدود ۳۶ کیلودالتون پیش‌بینی شده هم خوانی دارد. عدم وجود باند ۳۶ کیلودالتون در نمونه سلول‌های Rosetta خالی و باکتری‌های قبل از القا با IPTG و وجود باند ۳۶ کیلودالتون در نمونه سلول‌های Rosetta دارای وکتور نوترکیب بعد از القا، تأییدکننده بیان پروتئین فاکتور سلول بنیادی در سیستم بیانی Rosetta بود. لازم به ذکر است بیان پروتئین‌ها در مدت زمان ۴ ساعت القا بهتر از مدت زمان ۲ ساعت القا با IPTG ارزیابی شد(شکل۴ ـ الف).

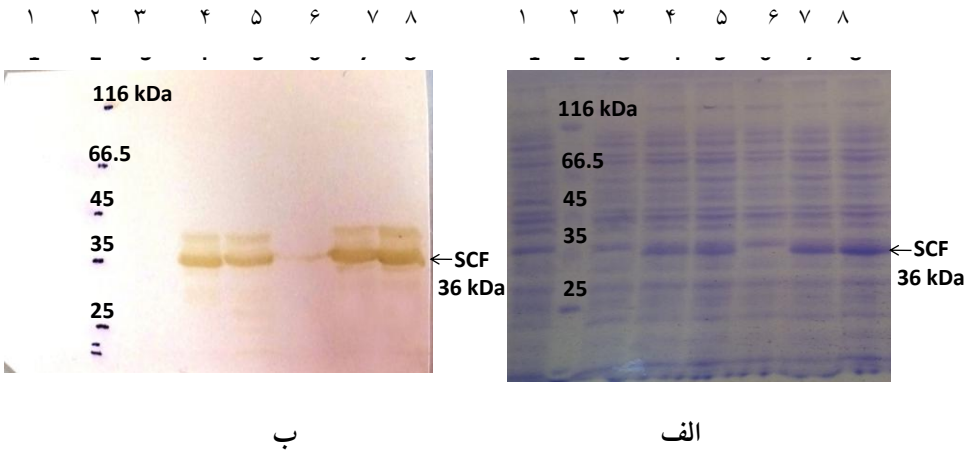
برای تایید وجود پروتئین، آزمایش وسترن بلات طبق روش استاندارد انجام شد. پس از الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE و انتقال باندهای تفکیک شده پروتئین‌ها به غشای PVDF ، سنجش ایمنی به وسیله آنتی‌بادی مونوکلونال His-Tag Anti متصل به HRP انجام شد. نتایج وسترن بلات نشان می‌دهد برچسب هیستیدینی متصل به فاکتور سلول بنیادی نوترکیب (pET32a- SCF)، توسط آنتی‌بادی مونوکلونال Anti His-Tag متصل به HRP قابل شناسائی می‌باشد.

مشاهده باند پروتئین نوترکیب فاکتور سلول بنیادی با ۳۲۴ آمینواسید با وزن مولکولی ۳۶ کیلو دالتون که از مجموع وزن مولکولی SCF با ۱۶۵ آمینو اسید و His6-tag و trx-tag با ۱۵۹ آمینواسید تشکیل شده است، نشان‌دهنده بیان پروتئین نوترکیب بود. مطابق انتظار، بیان پروتئین فاکتور سلول بنیادی در سلول‌های کنترل مشاهده نشد، اما همه سلول‌های تراآلوده بعد از القاء با IPTG ، بیان این پروتئین را نشان داد (شکل ۴ ـ ب).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017



شکل ۴ ـ الف: SDS-PAGE فاکتور سلول بنیادی (ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲٪)؛ ستون ۱ عصاره سلولی Rosetta به عنوان کنترل منفی است که عدم بیان پروتئین فاکتور سلول بنیادی را نشان می‌دهد. ستون ۲: شاخص وزن مولکولی، ستون‌های بعدی به‌ترتیب؛ عصاره سلول‌های کلونی شماره ۱ قبل از القاء(ستون ۳)، ۲ ساعت پس از القاء(ستون ۴) و ۴ ساعت بعد از القاء(ستون ۵)، عصاره سلول‌های کلونی شماره ۲ قبل از القاء (ستون ۶)، ۲ ساعت پس از القاء (ستون ۷) و ۴ ساعت بعد از القاء(ستون ۸)؛ در ستون‌های ۴، ۵، ۷ و ۸ پروتئین SCF نوترکیب با وزن مولکولی حدود ۳۶ کیلودالتون با پیکان نشان داده شده است. ب) آزمایش وسترن بلات پروتئین فاکتور سلول بنیادی؛ ستون ۱: عصاره سلول‌های کنترل Rosetta، ستون ۲: شاخص وزن مولکولی پروتئین، ستون‌های بعدی به‌ترتیب؛ عصاره سلول‌های کلونی شماره ۱ قبل از القاء (ستون ۳)، ۲ ساعت پس از القاء (ستون ۴) و ۴ ساعت بعد از القاء (ستون ۵)، عصاره سلول‌های کلونی شماره ۲ قبل از القاء (ستون ۶)، ۲ ساعت پس از القاء (ستون ۷) و ۴ ساعت بعد از القاء (ستون ۸)؛ در ستون‌های ۴، ۵، ۷ و ۸ باند مربوط به پروتئین SCF با وزن مولکولی حدود ۳۶ کیلودالتون با پیکان نشان داده شده است.

بحث

بقا و تمایز انواع متعدد سلول‌های میلوئید، اریتروئید، مگاکاریوسیت، لنفاوی، سلول زایا و اجداد ملانوسیت به حضور فاکتور سلول بنیادی وابسته است. فاکتور سلول بنیادی(SCF) به طور گسترده‌ای در تحقیقات سلول‌های بنیادی و نیز در تحقیقات مربوط به بررسی روند مولکولی بیماری‌زایی سرطان‌هایی از جمله لوسمی حاد و مزمن میلوبلاستی، نوروبلاستوما، سرطان تخمدان و پروستات و لنفوما، هم چنین در مطالعه‌های مهاجرت سلول‌های بنیادی سرطانی و مطالعه‌های مولکولی در انواع کم خونی‌ها و حتی ایجاد روش‌های درمانی جدید استفاده می‌شود. نقش بارز پروتئین فاکتور سلول بنیادی درکشت و توسعه سلول‌های بنیادی خونساز و جنینی، اهمیت مطالعه و تولید فاکتور سلول بنیادی(SCF) را نشان می‌دهد.

در تحقیق حاضر ابتدا از سلول‌های Hela کشت داده شده در آزمایشگاه، RNA کل استخراج شد و پس از ساخت cDNA ، ژن کدکننده فاکتور سلول بنیادی به طول ۵۱۶ جفت باز تکثیر گردید. قطعه ژنی هدف به حامل مناسب منتقل و صحت کلون‌سازی و ایجاد حامل نوترکیب با استفاده از روش‌های PCR ، الگوی هضم توسط آنزیم‌های محدودکننده و توالی‌یابی تایید شد. در مرحله بعد ژن رمزکننده فاکتور سلول بنیادی در میزبان بیانی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

Rosetta تولید شد. بیان پروتئین حاصل متصل به بر چسب هیستیدینی و trx ، از نظر وزن مولکولی(۳۶ کیلو دالتون) تایید شد. هم چنین ماهیت پروتئین بیان شده به عنوان فاکتور سلول بنیادی به روش لکه‌گذاری وسترن و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال His-Tag Anti متصل به آنزیم HRP تایید شد.

ژن کدکننده فاکتور سلول بنیادی با منشا انسانی دارای ۱۳ کدون نادر(rare codon) است، در مطالعه حاضر از میزبان بیانی Rosetta برای بیان پروتئین نوترکیب فاکتور سلول بنیادی انسانی استفاده شد. این میزبان ضمن این که تمامی مزایای یک سیستم بیانی پروکاریوتی مانند تولید مقادیر زیادی از پروتئین با هزینه نسبتاً کمتر نسبت به سایر سیستم‌های بیانی را دارد، امکان افزایش میزان تولید محصول را نیز فراهم می‌کند. میزبان بیانی Rosetta یک سویه مهندسی شده است که امکان تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با کدون‌های نادر مثل AGG ، AGA ، AUA ، CUA ، CCC و GGA وجود دارد. بنابراین مشکل تولید فاکتور سلول بنیادی با کدون‌های نادر نیز مرتفع شده و نیازی به بهینه‌سازی توالی و سنتز ژن با کدون‌های متناسب با سیستم بیانی پروکاریوتی وجود ندارد.

در تحقیق حاضر ابتدا از سلول‌های Hela کشت داده شده در آزمایشگاه، RNA کل استخراج شد و پس از ساخت cDNA ، ژن کدکننده فاکتور سلول بنیادی به طول ۵۱۶ جفت باز تکثیر گردید. قطعه ژنی هدف به حامل مناسب منتقل و صحت کلون سازی و ایجاد حامل نوترکیب با استفاده از روش‌های PCR ، الگوی هضم توسط آنزیم‌های محدود کننده و توالی‌یابی تایید شد. در مرحله بعد ژن رمزکننده فاکتور سلول بنیادی در سلول‌های Rosetta بیان گردید. بیان پروتئین حاصل متصل به برچسب هیستیدینی و trx ، از نظر وزن مولکولی (۳۶ کیلو دالتون) تایید شد. هم چنین ماهیت پروتئین بیان شده به عنوان فاکتور سلول بنیادی به روش لکه‌گذاری وسترن و با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال His-Tag Anti متصل به آنزیم HRP تایید شد.

هن و همکاران در سال ۲۰۰۳ فاکتور سلول بنیادی نوترکیب انسانی را با استفاده از سیستم بیانی یوکاریوتی در سلول‌های حشره تولید کردند. به این منظور توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی محلول(۱۶۵ آمینواسید) را به فرم کوتاه شده آن (۱۴۵ آمینواسید) به وسیله یک لینکر ۱۲ آمینو اسیدی متصل کرده، در وکتور pAcSecG2T همسانه‌سازی نموده و در سیستم بیانی باکلوویروس بیان کردند. این سیستم از نظر هزینه و زمان نسبت به سیستم بیانی پروکاریوتی پرهزینه‌تر و زمانبر است(۲۴).

در سال ۲۰۱۳ عسگری و همکاران فاکتور سلول بنیادی محلول را در وکتور pET-26b همسانه‌سازی کردند. اما گزارشی از بیان و تخلیص این پروتئین ارائه نکردند(۲۵).

در سال ۲۰۱۳ فرهادی و همکاران فاکتور سلول بنیادی محلول را با استفاده از یک شاتل وکتور(مورد استفاده در سیستم بیانی پروکاریوتی و هم یوکاریوتی) به نام pPIC9 در سیستم بیانی یوکاریوتی مخمر Picha pastoris همسانه‌سازی و بیان کردند. این سیستم نیز از نظر هزینه نسبت به سیستم بیانی پروکاریوتی معمولاً در اولویت انتخاب قرار نمی‌گیرد(۲۶).

لو و همکاران در سال ۲۰۰۵، ابتدا توالی رمز کننده فاکتور سلول بنیادی نوترکیب انسانی را به صورت دایمر (که کدکننده ۱۶۵ آمینواسید بود)(rdhSCF) تکثیر کرده، به فرم کوتاه شده آن(۱۴۵ آمینواسید) به وسیله یک لینکر ۱۲ آمینواسیدی متصل نموده و در وکتور pET-22b همسانه‌سازی کردند و سپس در سیستم بیانی *Ecoli BL21* بیان نمودند(۲۷).

در سال ۲۰۱۵، آکوتا و همکاران فاکتور سلول بنیادی محلول را با استفاده از وکتور pET-3b همسانه‌سازی کرده و در میزبان بیانی *Ecoli BL21* تولید کردند(۲۸).

در سال ۲۰۱۶، یوادا و همکاران بیان و تخلیص فاکتور سلول بنیادی محلول نوترکیب انسانی را در میزبان بیانی *Ecoli BL21* عاری از اندوتوکسین به وسیله مخلوط کردن سولفید با پرسولفید بهبود بخشیدند. آن‌ها نشان دادند که بیان هم زمان پروتئین با تیوردوکسین، تولید فاکتور سلول بنیادی نوترکیب انسانی به شکل محلول را افزایش می‌دهد(۲۹).

در این مطالعه پروتئین SCF نوترکیب انسانی در اتصال با برچسب هیستیدینی و trx ، در سویه Rosetta که به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

صورت مهندسی شده می‌تواند کدون‌های نادر مربوط به پروتئین‌های یوکاریوتی را پشتیبانی کند، تولید شد.

نتیجه‌گیری

حاصل این مطالعه جداسازی موفقیت‌آمیز توالی رمزکننده فاکتور سلول بنیادی(SCF) از سلول‌های Hela و همسانه‌سازی در وکتور بیانی pET-32a بود که به دنبال آن پروتئین نوترکیب در میزبان بیانی Rosetta بیان شد. در این سیستم بیانی امکان تولید پروتئین‌های یوکاریوتی با کدون‌های نادر مثل AGG ، AGA ، AUA ، CUA ، CCC و GGA وجود دارد بنابراین به میزان بالایی پروتئین فاکتور سلول بنیادی تولید شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بودجه این تحقیق توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام شده است.

References :

1- Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Ness KV, March CJ, *et al*. Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene. Cell 1990; 63(1): 167-74.

2- Flanagan JG, Leder P. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts. Cell 1990; 63(1): 185-94.

3- Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: Implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(14): 7732-7.

4- Huang E, Nocka K, Beier DR, Chu TY, Buck J, Lahm HW, *et al*. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. Cell 1990; 63(1): 225-33.

5- Arakawa T, Yphantis DA, Lary JW, Narhi LO, Lu HS, Prestrelski SJ, *et al*. Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure. J Biol Chem 1991; 266(28): 18942-8.

6- Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Fausset PR, Lauren S, Mendiaz EA, *et al*. Amino acid sequence and post-translational modification of stem cell factor isolated from Buffalo rat liver cell-conditioned medium. J Biol Chem 1991; 266(13): 8102-7.

7- Langley KE, Wypych J, Mendiaz EA, Clogston CL, Parker VP, Farrar DH, *et al*. Purification and characterization of soluble forms of human and rat stem cell factor recombinantly expressed by Escherichia coli and by Chinese hamster ovary cells. Arch Biochem Biophys 1992; 295(1): 21-8.

8- Lu HS, Clogston CL, Wypych J, Parker VP, Lee TD, Swiderek K, *et al*. Post-translational processing of membrane-associated recombinant human stem cell factor expressed in Chinese hamster ovary cells. Arch Biochem Biophys 1992; 298(1): 150-8.

9- Heinrich MC, Dooley DC, Freed AC, Band L, Hoatlin ME, Keeble WW, *et al*. Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells. Blood 1993; 82(3): 771-83.

10- Linenberger ML, Jacobsen FW, Bennett LG, Broudy VC, Martin FH, Abkowitz JL. Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts. Exp Hematol 1995; 23(10): 1104-14.

11- Leary AG, Zeng HQ, Clark SC, Ogawa M. Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(9): 4013-7.

12- Li CL, Johnson GR. Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. Blood 1994; 84(2): 408-14.

13- Geissler EN, Liao M, Brook JD, Martin FH, Zsebo KM, Housman DE, *et al*. Stem cell factor (SCF), a novel hematopoietic growth factor and ligand for c-kit tyrosine kinase receptor, maps on human chromosome 12 between 12q14.3 and 12qter. Somat Cell Mol Genet 1991; 17(2): 207-14.

14- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Oki no KH, *et al*. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. Cell 1990; 63(1): 203-11.

15- Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. J Biol Chem 1997; 272(25): 15661-7.

16- Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 1995; 6(5): 494-500.

17- Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression. Curr Opin Biotechnol 1996; 7(5): 489-93.

18- 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Gene 1989; 85(1): 109-14.
19- Seidel HM, Pompliano DL, Knowles JR. Phosphonate biosynthesis: molecular cloning of the gene for phosphoenolpyruvate mutase from Tetrahymena pyriformis and overexpression of the gene product in Escherichia coli. Biochemistry 1992; 31(9): 2598-608.
20- Baca AM, Hol WG. Overcoming codon bias: a method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in Escherichia coli. Int J Parasitol 2000; 30(2): 113-8.
21- Novy R, Drott D, Yaeger K, Mierendorf R. Overcoming the codon bias of E.coli for enhanced protein expression. inNovations 2001; 12: 1-3.
22- Rosenberg A, Griffin G, Studier FW, McCormick M, Berg J, Mierendorf R. T7Select phage display system: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. inNovations 1996; 6: 1-6.
23- Del Tito BJ Jr, Ward JM, Hodgson J, Gershater CJ, Edwards H, Wysocki LA, *et al*. Effects of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in Escherichia coli. J Bacteriol 1995; 177(24): 7086-91.
24- Han J, Yan X, Zhu J, Zhi X, Zang Y, Shen B, *et al*. Expression of a novel recombinant dual human stem cell factor in insect cells. Protein Expr Purif 2003; 31(2): 311-7.
25- Asghari S, Shekari Khaniani M, Darabi M, Mansoori Derakhshan S. Cloning of soluble human stem cell factor in pET-26b(+) vector. Adv Pharm Bull 2014; 4(1): 91-5.
26- Farhadi B, Shekari Khaniani M, Mansoori Derakhshan S. Construction of pPIC9 Recombinant Vector Containing Human Stem Cell Factor. Adv Pharm Bull 2013; 3(2): 303-8.
27- Lu H, Zang Y, Ze Y, Zhu J, Chen T, Han J, *et al*. Expression, refolding, and characterization of a novel recombinant dual human stem cell factor. Protein Expr Purif 2005; 43(2): 126-32.
28- Akuta T, Kikuchi-Ueda T, Imaizumi K, Oshikane H, Nakaki T, Okada Y, *et al*. Expression of bioactive soluble human stem cell factor (SCF) from recombinant Escherichia coli by coproduction of thioredoxin and efficient purification using arginine in affinity chromatography. Protein Expr Purif 2015; 105: 1-7.
29- Ueda T, Akuta T, Kikuchi-Ueda T, Imaizumi K, Ono Y. Improving the soluble expression and purification of recombinant human stem cell factor (SCF) in endotoxin-free Escherichia coli by disulfide shuffling with persulfide. Protein Expr Purif 2016; 120: 99-105.

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 14(1): 53-64

Original Article

Isolation, cloning and expression of human stem cell factor using prokaryotic expression system

Nayebhashemi M.[1], Mohammadipour M.[1], Fahimi H.[2], Habibi Roudkenar M.[3], Jalili M.A.[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*
[2]*Faculty of Advanced Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch of Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran*
[3]*Biotechnology Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran*

Downloaded from bloodjournal.ir at 14:22 +0430 on Sunday July 2nd 2017

Abstract

Background and Objectives

Stem cell factor (SCF) is a 28-40 kDa glycoprotein which plays an important role for the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells (HSCs). SCF binds to the C-kit receptor, and improves the survival of HSCs in vitro. SCF is one of the essential supplements for cultivation of HSCs in vitro. It plays a vital role to increase the number and size of HSC colonies.

Materials and Methods

In this experimental study, glycosylation of SCF does not seem to influence its biological activity; therefore, it would be possible to produce it in prokaryotic expression system. The aim of this study was isolation, cloning and expression of SCF in the Rosetta expression host. In addition to the features of prokaryotic expression system, Rosetta was expected to provide rare codons of eukaryotic proteins and increase the recombinant protein expression level.

Results

The SCF coding sequence was isolated and amplified using the specific primers and cloned in E.coli TOP10 using pET-32a expression vector. The recombinant construct was confirmed by PCR, digestion and sequencing. The recombinant vector was transformed to the expression host, Rosetta.

Conclusions

The SCF coding sequence was successfully isolated and cloned into the expression vector pET-32a, followed by recombinant protein expression in Rosetta host strain.

Key words: Glycosylation, Stem cell, PCR

Received: 14 Aug 2016
Accepted:15 Nov 2016

Correspondence: Jalili MA., PhD of Medicinal Chemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052155; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: *m.jalili@ibto.ir*

www.SID.ir