

کلون سازی و بیان ترشحی فاکتور رشد بتا-NGF انسانی با استفاده از پپتید نشانه‌ی اصلاح شده‌ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران



سمانه قبادی نصر، زهرا حاجی حسن* و ناصر انصاری پور*

ایران، تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

فاکتور رشد عصبی (NGF) عضوی شناخته شده از خانواده‌ی پروتئین‌های نوروتروفین است که در درمان بیماری‌هایی مانند مولتی پل اسکلروزیس و آلزایمر بکار گرفته می‌شود. تولید پروتئین نوترکیب در *E. coli* دارای معایب خاصی است که شکل‌گیری اینکلوژن بادی و عدم شکل‌گیری پیوندهای دی‌سولفیدی در سیتوپلاسم در درجه اول قرار دارند. بنابراین ما بمنظور هدایت β -NGF نوترکیب تولید شده به سمت پری‌پلاسم، استفاده از پپتید نشانه‌ی اصلاح شده آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران را به عنوان یک رویکرد مؤثر برای تولید β -NGF با تا خوردگی صحیح، مورد هدف قرار دادیم. به همین منظور ژن β -NGF انسانی به‌مراه توالی پپتید نشانه مذکور در وکتور pET21a(+) کلون شدند و سپس وکتور نوترکیب به سویه‌های BL21(DE3)plysS و BL21(DE3) انتقال داده شد. بیان پروتئین در سویه‌های دارای وکتور نوترکیب و سویه‌ی کنترل مثبت حاوی وکتور pET39b(+) دارای پپتید نشانه DsbA با استفاده از IPTG، ۱ میلی‌مولار آلفا گردید. بیان سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی β -NGF با تکنیک‌های SDS-PAGE و سنجش دات بلات تأیید شد. در نهایت، پروتئین‌های پری‌پلاسمی بیان شده با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی تخلیص و صحت تخلیص با روش SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. نتایج نشان می‌دهد که در تولید ترشحی و هدایت پروتئین β -NGF به فضای پری‌پلاسمی توالی پپتید نشانه‌ی اصلاح شده آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران نسبت به پپتید نشانه DsbA عملکرد بهتری داشته و سویه‌ی BL21(DE3)plysS میزان مناسبتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور رشد عصبی، پروتئین نوترکیب، توالی نشانه، بیان پری‌پلاسمی.

* نویسندگان مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۸۳۳۳۵۶۳ و ۰۹۱۲۱۲۳۸۱۸۰، پست الکترونیکی: hajihasan@ut.ac.ir و ansaripour@ut.ac.ir

مقدمه

بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره یک انسانی واقع شده است. هومودایمر ۲۶ کیلودالتونی β -NGF متشکل از دو زیرواحد بتای ۱۲۰ آمینواسیدی یکسان است که با پیوندهای هیدروفوبی و غیرکووالانسی به هم متصل شده‌اند و ساختار چهارم دارای عملکرد را تشکیل می‌دهند. هر مونومر β -NGF دارای صفحات بتای ناهمسو (Anti-Parallel β Sheet) که دور هم پیچیده شده‌اند و چهار لوپ می‌باشد. لوپ‌های L1، L2 و L4 در یک انتهای مولکول و لوپ L3 در انتهای دیگر آن واقع شده‌اند. صفحه‌های بتا توسط موتیف

فاکتور رشد عصبی (NGF= Nerve Growth Factor) به عنوان عضوی از خانواده نوروتروفینها (Neurotrophins)، حدود نیم قرن پیش کشف شد و اولین بار به دلیل نقش حیاتی اش در بقا، رشد و تمایز نورونهای سیستم عصبی مرکزی و محیطی مورد توجه قرار گرفت و ساختار سه بعدی آن برای اولین بار با استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس منتشر شد (۲۱ و ۲۳). کمپلکس پروتئینی NGF از زیر واحدهای آلفا، بتا و گاما ($\alpha 2\beta 2\gamma 2$) تشکیل شده است که زیر واحد بتا مسئول فعالیت بیولوژیک NGF است (۳۱). ژن β -NGF

های برشی مورد نظر در دو طرف ژن قرار داده شد. قطعه تکثیر شده توسط آنزیمهای محدودالثر بریده شده و به هراه توالی پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران در وکتور pET21a(+) کلون گردید و سپس میزان بیان در دو سویه BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS مورد بررسی قرار گرفت.

مواد روشها

مواد مورد استفاده: محیط های کشت از شرکت مرک آلمان، آنتی بیوتیک و IPTG از شرکت سیگما، کلیه ی آنزیم ها از شرکت فرمتاز (Fermentase)، Master Mix از شرکت آمپلیکون (Apliqon) مارکر DNA از شرکت SMO BIO و مارکر پروتئینی از شرکت سیناکلون خریداری شدند.

سویه ی باکتریایی و وکتور: سویه ی باکتریایی Gold10 جهت تکثیر وکتور نوترکیب، از طرف گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی اهدا شد. سویه های بیانی BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS ، وکتور pET21a(+) به عنوان وکتور بیانی و وکتور pET39b(+) حاوی کل ژن *Dsb A* و توالی پپتید نشانه آن به عنوان کنترل مثبت، از شرکت نوژن (Novagene) آمریکا خریداری شدند.

پپتید نشانه: در این بررسی از پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران (Accession No. AY842512) که در آن یک اسید آمینه متیونین بین اسید آمینه های شماره ۱۳ و ۱۴ آن وارد شده، استفاده گردید (۱). توالی پپتید نشانه به همراه توالی مربوط به β -NGF cDNA توسط شرکت شاین جین (ShineGene) کشور چین سنتز شد.

کلونینگ ژن و تأیید آن: پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق پس از طراحی با استفاده از نرم افزار Primer3Plus،

گره ی سیستئینی (Cysteine Knot) موجود در نزدیکی لوپ L3 با برقراری سه پیوند دی سولفیدی به هم متصل شده اند (۷ و ۱۲ و ۱۶ و ۳۱).

اندکی پس از کشف NGF در اواسط قرن بیستم، پتانسیل دارویی NGF برای درمان بیماری های تخریب سیستم عصبی مرکزی و نوروباتی محیطی (Neuropathy) روشن شد. آزمایشات نشان دهنده ی کاربردهای بالینی این پروتئین در درمان بیماران مبتلا به آلزایمر، پارکینسون، دیابت و بیماری های مربوط به قرنیه ی چشم است. یکی از کاربردهای بالینی NGF مربوط به فعالیت این پروتئین به عنوان یک تنظیم کننده ی سیستم ایمنی است. بر اساس این ویژگی، این پروتئین در درمان بیماری های خود ایمنی مانند مالتی پل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis) و بیماری های التهابی مزمن می تواند مؤثر باشد (۴).

با توجه به عملکرد فاکتورهای رشد متعلق به خانواده ی نوروتروفین ها مثل NGF بر روی تکثیر، تمایز، بقا و مرگ سلول های عصبی و با توجه به این مسئله که بدست آوردن مقادیر زیاد این پروتئین از منابع طبیعی اش کار مشکل، زمان بر و پرهزینه ای است، توجه محققان به سمت تولید نوترکیب NGF جلب شده است. از آنجائیکه تولید پروتئینهای نوترکیب بصورت سیتوپلاسمی در میزبانهایی مانند *E. coli* منجر به تولید اینکلوژن بادی (Inclusion body) می شود و تولید پروتئین در فضای پری پلاسمی میتواند به تاخوردگی صحیح پروتئین نوترکیب و تشکیل پیوند های دی سولفیدی در باکتری کمک کند (۸). در بررسی حاضر تولید پروتئین β -NGF به روش ترشچی برای نخستین بار با استفاده از یک پپتید نشانه نوین مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق cDNA زیر واحد بتای پروتئین NGF از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شده و توالی آن بمنظور بیان در باکتری *E. coli* با استفاده از رویکردهای بیوانفورماتیکی بهینه سازی شد. سپس با طراحی پرایمرهای مناسب و انجام واکنش PCR جایگاه

اتصال قطعه ژنی β -NGF و وکتور به کمک آنزیم *DNA T4 Ligase* صورت پذیرفت.

بمنظور تأیید صحت کلونینگ از روش های کلونی PCR، هضم دو آنزیمی و توالی یابی (با استفاده از پرایمر T7 terminator که توسط شرکت ماکروژن انجام شد) استفاده شد.

ترانسفورماسیون: انتقال وکتور نو ترکیب به میزبان کلونینگ Gold10 و میزبان های بیانی BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS با روش شوک اسمزی در حضور کلسیم کلراید صورت پذیرفت و سپس باکتری های نو ترکیب بر روی پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت ۱۰۰ mg/ml) در ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شده و انکوبه شدند (۲۸).

بیان پروتئین: میزان ۱٪ از کشت شبانه هر دو سویه ی BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3) دارای وکتور β -NGF::pET21a(+) به طور جداگانه در محیط کشت LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (غلظت ۱۰۰ mg/ml) کشت داده شد. رشد باکتری ها تا زمان رسیدن به OD ۰/۵-۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر ادامه یافت. بیان پروتئین با اضافه کردن غلظت ۱ میلی مولار IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت انجام شد. سپس باکتری ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در ادامه بمنظور استخراج پروتئین های پری پلاسمی و سیتوپلاسمی، رسوب سلولی در بافر سرد ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر TES (سوکروز ۰/۵ مولار، Tris-HCl ۰/۰۳ مولار و EDTA ۱ میلی مولار) با pH ۸ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط مخلوط شد. در مرحله بعد سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، به رسوب $MgSO_4$ ۵ میلی مولار سرد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس مجدداً سانتریفیوژ با دور

توسط شرکت ماکروژن (Macrogen) کره سنتز شدند. توالی پرایمرها به صورت زیر می باشد:

5'-
ATCCTACCAATGGCCTCTTCCAGCCATCCGAT
TTTC-3'

5'-
ATCCTAGAATTCGGCAGACGGACGGCTTTA
-3'

بمنظور تخلیص پروتئین با استفاده از ستون IMAC جایگاه های برشی به گونه ای انتخاب شدند که در انتهای پروتئین β -NGF یک توالی ۶ اسید آمینه ای از هیستیدین قرار گیرد (۲). پرایمرها دارای توالی مکان برشی برای آنزیم های *NcoI* و *EcoRI* می باشند. قطعه مورد نظر طی واکنش PCR با مقادیر (جدول ۱) و برنامه دمایی (جدول ۲) زیر تکثیر گردید:

جدول ۱- ترکیب مواد در هر واکنش PCR به حجم ۱۰ میکرولیتر

ترکیب	حجم (میکرولیتر)
PCR Master mix	۵
پرایمر فوروارد	۰/۲
پرایمر ریورس	۰/۲
DNA	۱
آب استریل	۳/۶
حجم نهایی	۱۰

جدول ۲- برنامه دمایی واکنش PCR

نام مرحله	زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی گراد)	تعداد چرخه
Pre-denaturation	۳۰۰	۹۵	۱
Denaturation	۳۰	۹۵	۳۲
Annealing	۴۰	۶۰	۳۲
Extension	۴۰	۷۲	۳۲
Final extension	۴۲۰	۷۲	۱

پس از برش دو انتهای قطعه و نیز جایگاه برشی موجود در وکتور pET21a(+) توسط دو آنزیم *NcoI* و *EcoRI*،

نمونه‌های مختلف، تصویر حاصل از دات بلات با استفاده از نرم افزار IMAGE J نسخه ی 1.50i (از NIH) به آدرس (<https://imagej.nih.gov/ij/>) آنالیز و مورد بررسی قرار گرفت.

تخلیص پروتئین: تخلیص پروتئین β -NGF بیان شده بصورت پری پلاسمی توسط سویه ی BL21(DE3)pLysS با استفاده از ستون IMAC انجام شد (۳).

بررسی پروتئین تخلیص شده با استفاده از روش وسترن بلات: بمنظور انجام وسترن بلات، پس از الکتروفورز پروتئین‌ها توسط ژل SDS-PAGE، پروتئین‌های تفکیک شده به کمک بافر انتقال (گلاسیسین ۱۹۲ میلی مولار، تریس ۲۵ میلی مولار و ۱۵٪ متانول) توسط جریان ثابت ۲۰۰ میلی آمپر به مدت ۴ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد بر روی کاغذ نیتروسولوز منتقل گردیدند. پس از پایان مدت زمان انتقال، مراحل بلوکه کردن، شست و شو و افزودن آنتی بادی و سوبسترا مطابق با روش دات بلات انجام شد (۱۰).

نتایج

کلونینگ ژن β -NGF در وکتور pET21a(+): پس از کلونینگ ژن β -NGF به درون وکتور pET21a(+) و انتقال وکتور نو ترکیب به باکتری‌های مستعد، بمنظور تشخیص کلونی‌های حاوی وکتور نو ترکیب، کلونی‌های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین مورد بررسی قرار گرفتند. تست‌های غربالگری شامل کلونی PCR (شکل ۱)، هضم دو آنزیمی توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *NcoI* (شکل ۲) و توالی‌یابی با استفاده از پرایمر T7 terminator (شکل ۳) نشان دهنده کلون شدن ژن مورد نظر در وکتور pET21a(+) بود. در شکل ۱ مشاهده ی قطعه ی ۳۷۴ bp بر روی ژل آگارز نشان دهنده ی حضور این قطعه در کلونی‌های بررسی شده است. شکل ۲ نشان می‌دهد پس از استفاده از آنزیم‌های *EcoRI* و *NcoI*

۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و مایع رویی جدا و از رسوب سلولی برای استخراج سیتوپلاسمی با استفاده از اوره ۸ مولار استفاده شد. به محلول رویی ۱۲٪ حجم نهایی TCA ۱۰۰٪ اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ مخلوط گردید. در مرحله ی بعد پس از انجام سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل که حاوی پروتئین‌های پری پلاسمی بود در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده روش SDS-PAGE: برای الکتروفورز پروتئین‌ها در شرایط دنا توره کننده (در حضور SDS)، از روش لاملی استفاده گردید. بدین منظور از ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد استفاده گردید، بدین ترتیب که در هر یک از چاهک‌های ژل مقدار مساوی از پروتئین‌های سیتوپلاسمی و پری پلاسمی استخراج شده بارگذاری شدند. پس از پایان الکتروفورز با استفاده از کوماسی بلو R250 رنگ آمیزی انجام شد (۱۹).

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از روش دات بلات: ابتدا مقادیر مساوی از پروتئین‌های سیتوپلاسمی و پری پلاسمی استخراج شده روی کاغذ نیتروسولوز قرار داده شد. سپس بمنظور بلاک کردن نقاط غیر اختصاصی، کاغذ در پلیت حاوی بافر بلوکه کننده TBST (شامل Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، NaCl ۱۵۰ میلی مولار و ۵٪ Tween20) حاوی ۵٪ شیر خشک به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. پس از مدت زمان مذکور سه مرحله شست و شو با بافر TBST انجام شد. در مرحله ی بعد کاغذ در محلول حاوی آنتی بادی مونوکلونال ضد His-tag متصل به آنزیم HRP با رقت ۱:۱۰۰۰ قرار داده شد. در انتها کاغذ با سوبسترای رنگی DAB (شرکت بایوبیسیک Biobasic) کانادا) در حضور پر اکسید هیدروژن به عنوان سوبسترای آنزیم در محیط تاریک انکوبه شد.

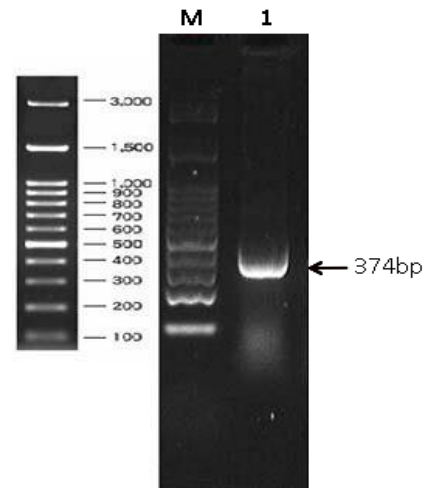
بررسی میزان بیان پروتئین با نرم افزار IMAGE J: بمنظور بررسی و مقایسه دقیق سطح پروتئین بیان شده در

هضم دو آنزیمی از وکتور جدا شده است در ناحیه ی ۳۷۴ جفت باز قابل مشاهده است. M نشان دهنده مارکر مولکولی 100bp+3k می‌باشد.

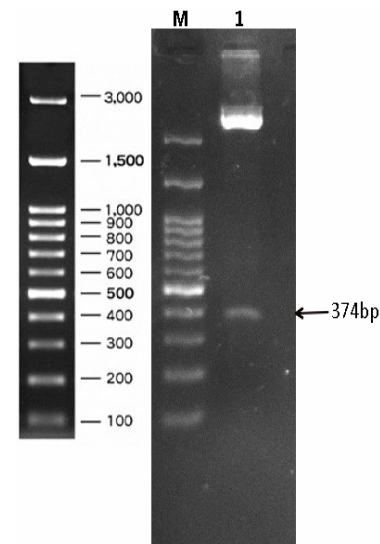
بررسی بیان پروتئین β -NGF در دو سویه ی BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS با استفاده از ژل SDS-PAGE و روش دات بلات و آنالیز کمی با استفاده از نرم افزار IMAGE J : پس از بیان پروتئین با استفاده از روش گفته شده در قسمت روش کار، مقادیر مساوی از پروتئین های استخراج شده پری پلاسمی و سیتوپلاسمی مربوط به هر دو سویه ی BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. با توجه به اینکه پروتئین مذکور دارای وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون می باشد همانطور که در شکل ۴ قابل مشاهده است در این محدوده وزن مولکولی تفاوت خاصی بین سویه های دارای وکتور نوترکیب و سویه کنترل بدون وکتور قابل مشاهده نیست.

بمنظور بررسی اختصاصی تر بیان از روش دات بلات استفاده گردید. میزان مساوی از نمونه های سیتوپلاسمی و پری پلاسمی کنترل مثبت (سویه ی BL21(DE3) دارای وکتور pET39b(+)) حامل ژن β -NGF انسانی و دارای توالی نشانه Dsb A، کنترل منفی (BL21(DE3) بدون وکتور) و سویه های BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS حامل وکتور نوترکیب β -NGF::pET21a(+) روی کاغذ نیتروسولوز قرار داده شد که نتایج آن در شکل ۵ قابل مشاهده است. همانطور که در تصویر قابل مشاهده است بیان پری پلاسمی در سویه های BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS دارای وکتور نوترکیب که پپتید نشانه مورد نظر را نیز در کنار پروتئین های خود بیان می کنند، نسبت به نمونه ی کنترل مثبت افزایش یافته است. با توجه به تصویر مشاهده می شود که بیان پری پلاسمی در سویه ی BL21(DE3)pLysS بیشتر از سویه ی BL21(DE3) است.

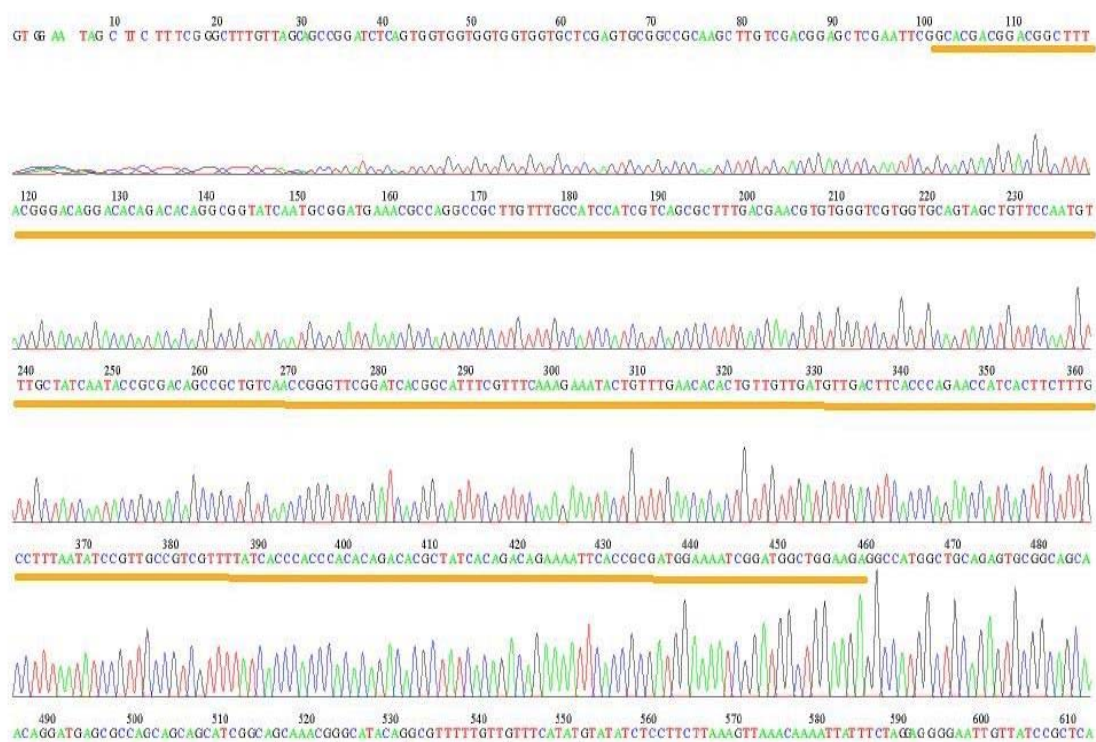
انجام واکنش هضم دو آنزیمی قطعه ای هم اندازه با ژن مورد نظر ما از وکتور جدا شده است. در نهایت در شکل ۳ در کروماتوگرام حاصل از توالی یابی وکتور نوترکیب مشاهده می گردد که قطعه ی ژنی مربوط به ژن β -NGF بدون تغییر در تعداد یا نوع نوکلئوتید در وکتور نوترکیب حضور دارد.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول کلونی PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد. باند مربوط به ژن β -NGF در تصویر با فلش نشان داده شده است. M نشان دهنده مارکر وزن مولکولی 100bp+3k می باشد.

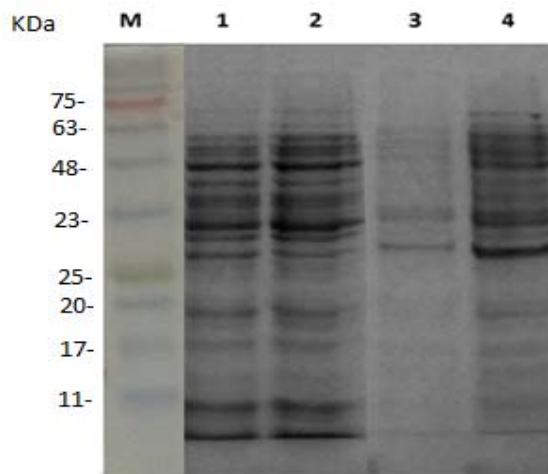


شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول واکنش هضم دو آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱ درصد. باند مربوط به ژن β -NGF که پس از واکنش



شکل ۳- تصویر کروماتوگرام حاصل از توالی یابی وکتور نوترکیب β-NGF::pET21a(+) دارای پپتید نشانه‌ی اصلاح شده‌ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران با استفاده از پرایمر T7 terminator. توالی مربوط به قطعه‌ی ژن β-NGF در تصویر مشخص شده است.

در ادامه بمنظور آنالیز کمی و بررسی دقیق تر، نتایج حاصل از دات بلات با استفاده از نرم افزار IMAGE J مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۳ قابل مشاهده است. همانطور که انتظار می‌رفت آنالیز کمی هم نشان می‌دهد که بیان پری پلاسمی در سویه‌های BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3) حامل وکتور نوترکیب β-NGF::pET21a(+) دارای پپتید نشانه‌ی اصلاح شده‌ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران بیشتر از نمونه‌ی کنترل مثبت می‌باشد. همچنین می‌توان مشاهده نمود که میزان بیان پری پلاسمی در سویه‌ی BL21(DE3)pLysS بیشتر از سویه BL21(DE3) است.



شکل ۴- طرح الکتروفورزی محتوای پروتئینی پری پلاسمی و سیتوپلاسمی بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو.

بترتیب M: مارکر وزن مولکولی (10-250KDa)، شماره ۱: بیان سیتوپلاسمی سویه ی BL21(DE3) دارای وکتور نوترکیب، شماره ۲: بیان سیتوپلاسمی سویه ی BL21(DE3)pLysS دارای وکتور نوترکیب، شماره ۳: بیان پری پلاسمی سویه ی BL21(DE3) دارای وکتور نوترکیب، شماره ۴: بیان پری پلاسمی سویه ی BL21(DE3)pLysS دارای وکتور نوترکیب.

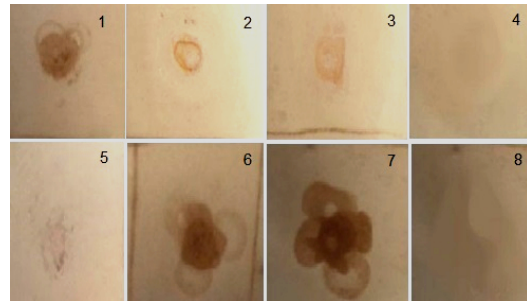
تخلیص پروتئین β -NGF بیان شده بصورت پری پلاسمی توسط سویه ی BL21(DE3)pLysS و بررسی صحت آن با استفاده از ژل SDS-PAGE و روش وسترن بلات :

پس از اینکه مشاهده گردید بیان پری پلاسمی در سویه ی BL21(DE3)pLysS بیشتر از سویه BL21(DE3) و نمونه کنترل مثبت است، پروتئین β -NGF بیان شده بصورت پری پلاسمی توسط این سویه با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni^{+2} -NTA (IMAC) تخلیص شد. سپس پروتئین مورد نظر بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد و همانطور که در شکل ۶ (A) قابل مشاهده است تک باند مربوط به پروتئین β -NGF در ناحیه ی ۱۴ کیلو دالتون قابل مشاهده می باشد که نشان دهنده تخلیص موفقیت آمیز پروتئین مورد نظر است.

بمنظور اطمینان بیشتر از صحت تخلیص پروتئین از روش وسترن بلات استفاده گردید. همانطور که در شکل ۶ (B) دیده میشود تک باند مربوط به پروتئین β -NGF در ناحیه ی مورد نظر قابل مشاهده است و میان کنش آن با آنتی بادی ضد His-tag نشان دهنده صحت ساختار پروتئین NGF خالص شده است.

بحث

نوروتروفین ها که شامل فاکتور رشد عصبی، فاکتور نوروفیک مشتق شده از مغز (BDNF)، NT-3 و NT-4 می باشند به طور گسترده ای در سیستم عصبی بیان می شوند و به خوبی شناخته شده اند. نوروتروفین ها برای رشد و حفاظت سیستم عصبی مرکزی و محیطی ضروری می باشند (۲۲). فاکتور رشد عصبی NGF، اولین عضو شناخته شده ی خانواده ی نوروتروفین ها است که در بقا و رشد نوروون های حسی و همچنین در حفظ و نگهداری نوروون های سیستم عصبی مرکزی نقش دارد (۲۴).



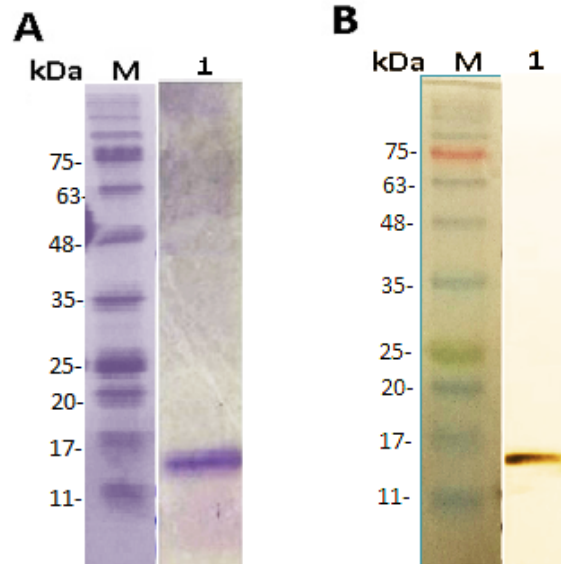
شکل ۵- طرح دات بلات محتوای پروتئینی پری پلاسمی و سیتوپلاسمی استخراج شده. بترتیب ۱- بیان سیتوپلاسمی کنترل مثبت، ۲- بیان سیتوپلاسمی BL21(DE3) حاوی وکتور نوترکیب، ۳- بیان سیتوپلاسمی سویه ی BL21(DE3)pLysS حاوی وکتور نوترکیب، ۴- بیان سیتوپلاسمی سویه ی BL21(DE3) بدون وکتور، ۵- بیان پری پلاسمی کنترل مثبت، ۶- بیان پری پلاسمی سویه ی BL21(DE3) حاوی وکتور نوترکیب، ۷- بیان پری پلاسمی سویه ی BL21(DE3)pLysS حاوی وکتور نوترکیب، ۸- بیان پری پلاسمی سویه ی BL21(DE3) بدون وکتور.

جدول ۳- داده های کمی حاصل از آنالیز نتایج دات بلات با استفاده از

نرم افزار IMAGE J

نمونه	درصد تولید پروتئین (%)
بیان سیتوپلاسمی کنترل مثبت	۴۸/۷۵۶
بیان سیتوپلاسمی سویه BL21(DE3) حامل وکتور نوترکیب	۳۳/۹۴۳
بیان سیتوپلاسمی سویه BL21(DE3)pLysS حامل وکتور نوترکیب	۱۷/۳۰۱
بیان پری پلاسمی کنترل مثبت	۱۵/۵۵۷
بیان پری پلاسمی سویه BL21(DE3) حامل وکتور نوترکیب	۲۸/۵۲۵
بیان پری پلاسمی سویه BL21(DE3)pLysS حامل وکتور نوترکیب	۴۵/۹۱۸

سلول‌های CHO بیان و سپس فعالیت بیولوژیکی آن بر روی تمایز سلول‌های PC12 به سلول‌های عصبی نسبت به فعالیت NGF موش سنجیده شد (۱۷). علاوه بر این در همین سال به کمک وکتور باکلو ویروس این پروتئین به صورت Pre-Pro- β -NGF در سلول‌های حشرات بیان و سپس تاثیر آن در درمان بیماری آلزایمر تایید شد (۶). در سال ۱۹۹۲ تحقیقات بیشتری بر روی بیان نوترکیب این پروتئین انجام شد به طوری که بر روی بیان rhNGF صورت اینکلوزن بادی در CHO و *E. coli* چندین بررسی صورت گرفت (۱۱ و ۱۴ و ۲۹). در سال ۱۹۹۳ با روش کشت غیر مداوم خوراک دهی شده (Fed-Batch Culture) تراکم سلول‌های حشره در کشت سوسپانسیون افزایش داده شد و متعاقب آن میزان تولید hNGF افزایش یافت (۲۵). در ادامه ی تحقیقات انجام شده در سال ۱۹۹۳، NGF انسان و موش در مخمر ساکارومایسز سرویزیه بیان و با استفاده از توالی راهنمای فاکتور آلفا به سوپرناتانت محیط کشت ترشح شدند. سپس تاثیر این پروتئین‌های نوترکیب تولید شده بر روی گیرنده‌های NGF مربوط به سلول‌های PC12 موش مورد بررسی قرار گرفت (۲۶). در سال ۱۹۹۷ بیان hNGF با استفاده از وکتور pET11c در *E. coli* افزایش داده شد (۳۲). در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که بیان بالای پروتئین‌های DsbCD که وظیفه ی کاتالیز و ایزومریزاسیون پیوندهای دی‌سولفیدی را دارند، به طور قابل توجهی تولید rhNGF را در فضای اکسید کننده ی پری پلاسم بهبود می‌بخشد. بدین منظور از دو نوع وکتور بیانی سازگار با هم که یکی دارای ژن Dsb و دیگری حامل ژن NGF به‌مراه پپتید نشانه OmpT بود استفاده شد و پس از بیان تاثیر پروتئین تولید شده بر روی سلول‌های PC12 موش مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در همین سال یک گروه تحقیقاتی بمنظور افزایش بازده و سرعت دوباره تا خوردن اینکلوزن بادی‌ها جهت تشکیل صحیح پیوندهای دی‌سولفیدی، rh-NGF pro-NGF را در سیتوپلاسم *E. coli* بیان کردند (۱۷ و ۲۷). از آنجائیکه دمای پایین برای بیان و ترشح محصول به فضای



شکل ۶- طرح الکتروفورزی بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد (A) و سترن بلات (B) پروتئین β -NGF تخلیص شده با استفاده از ستون IMAC استخراج شده از سویه ی pLysS (DE3) BL21. M مارکر وزن مولکولی (10-250KDa) می باشد.

از پروتئین NGF در درمان بیماری‌هایی مانند آلزایمر، پارکینسون و بیماری‌های خود ایمن مانند مالتی پل اسکلروزیس استفاده می‌شود. از دیگر فعالیت‌های این پروتئین می‌توان به درمان بیماری‌های مربوط به قرنیه ی چشم اشاره کرد (۱۵ و ۲۰).

با توجه به کاربردهای فراوانی که در رابطه با NGF مطرح شد این پروتئین مود توجه قرار گرفته است. غدد بزاقی موش نر به عنوان منبع طبیعی فاکتور رشد عصبی، مخلوط هتروژنی از دایمرهای نسبتاً تخریب شده است و به همین دلیل برای اهداف درمانی مناسب نمی‌باشد. به علاوه ایمنی زایی، دشواری، گرانی و زمان بر بودن تخلیص این پروتئین از دیگر مشکلات استفاده از منابع طبیعی محسوب می‌شود؛ به همین دلیل تولید نوترکیب آن حائز اهمیت است.

در سال ۱۹۸۹ بمنظور مطالعه ی نقش NGF در بهبود بیماری‌های تخریب عصبی انسانی، اگزون چهار ژن NGF انسانی در سلول‌های COS به صورت نوترکیب بیان شد (۹). پس از آن در سال ۱۹۹۰ ژن NGF انسانی در

در بررسی نتایج حاصل از تست دات بلات مربوط به پروتئین‌های بیان شده ی سیتوپلاسمی و پری پلاسمی مشاهده گردید که بیان پری پلاسمی در سویه‌های BL21(DE3) و pLysS حامل وکتور نوترکیب دارای پپتید نشانه ی اصلاح شده ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران بیشتر از سویه ی کنترل مثبت حاوی پپتید نشانه و کل ناحیه ی کد کننده ی ژن DsbA است اما بیان سیتوپلاسمی به طور قابل توجهی کاهش یافته است. بخشی از این کاهش در بیان سیتوپلاسمی با توجه به افزایش بیان پری پلاسمی قابل توجیح است. از سوی دیگر با توجه به لکه‌های ایجاد شده بیان پری پلاسمی در سویه ی pLysS بیشتر از سویه ی BL21(DE3) است که احتمالاً یکی از دلایل این تفاوت سمیت پروتئین تولیدی برای باکتری میزبان می باشد چرا که در سویه ی BL21(DE3) در حالت بدون القا بیان نشتی وجود دارد. بمنظور بررسی کمی میزان پروتئین بیان شده در سویه‌های مختلف، داده‌های حاصل از تست دات بلات با استفاده از نرم افزار J IMAGE مورد بررسی قرار گرفت. آنالیزها نشان می داد که بیان پروتئین با استفاده از سویه‌های حامل وکتور نوترکیب دارای پپتید نشانه ی اصلاح شده ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران به میزان قابل توجهی بیشتر از نمونه ی کنترل مثبت می باشد. همچنین داده‌های کمی نشان می داد که بیان پری پلاسمی در سویه BL21(DE3)plyS حاوی وکتور نوترکیب دارای پپتید نشانه ی اصلاح شده ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران بیشتر از سویه ی BL21(DE3) دارای همین وکتور است. در مرحله ی بعد نمونه‌های پری پلاسمی سویه ی pLysS با استفاده از ستون IMAC تخلیص شدند و پس از دیالیز بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند و باند مربوط به پروتئین مورد نظر در ناحیه ی ۱۷ کیلودالتون مشاهده گردید. در ادامه بمنظور تایید نهایی از روش وسترن بلات استفاده شد و باند مورد نظر مشاهده گردید.

پری پلاسمی میزبان، سبب تسهیل تاخوردگی صحیح پروتئین‌های سخت مانند rhNGF با سه پیوند دی سولفیدی میشود ایلینا وینتینی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با استفاده از میزبان سرما دوست *Pseudoalteromonas haloplanktis* rhNGF، *TAC125* را در دمای چهار درجه سانتی گراد بیان کردند(۳۰). در نهایت در سال ۲۰۱۰ rhNGF در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش (rMSCs) بیان و مشاهده گردید که فعالیت بیولوژیکی این پروتئین روی سلول‌های PC12 و سلول‌های عصبی جنین جوجه مانند rhNGF تجاری، کامل بود(۱۳).

از آنجاییکه پیوندهای دی سولفیدی در محیط احیا کننده ی سیتوپلاسم *E. coli* تشکیل نمی شوند، سنتز پروتئین‌هایی نظیر β -NGF که دارای سه پیوند دی سولفیدی در ساختمان خود هستند منجر به شکل گیری اینکلوزن بادی و تشکیل رسوبات درون سلولی می شود. در چنین وضعیتی پروتئین‌های تولید شده پس از بیان می بایست رناتوره شوند که این فرآیند بسیار زمان بر است و بازده پایینی دارد. به دلیل این مشکلات هدایت پروتئین به سمت فضای پری پلاسمی می تواند یک رویکرد مفید باشد. از سوی دیگر در بیشتر موارد، هدایت پروتئین به سمت فضای پری پلاسمی یا محیط کشت فرآیندهای پایین دستی و تاخوردگی پروتئین را تسهیل می کند، پایداری پروتئین در شرایط زنده (*in vivo*) را افزایش می دهد و منجر می شود که طی یک فرآیند مقرون به صرفه پروتئین‌های فعال و محلول تولید گردد. علاوه بر این بیان ترشعی سبب می شود پپتید هایی با N-ترمینال صحیح ایجاد گردد و از اضافه شدن متیونین به پروتئین‌هایی که فرم بالغ آنها با متیونین شروع نمی شود جلوگیری می کند. بنابراین در این تحقیق برای هدایت پروتئین β -NGF به سمت پری پلاسم از پپتید نشانه ی اصلاح شده ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران استفاده شد.

و پروتئین هدف یکی از فاکتورهای تاثیر گذار است. برای دست یابی به بیان بالای پروتئین‌های هترولوگوس یک سرعت بهینه‌ی ترجمه وجود دارد. ترشح ممکن است در سرعت‌های بالاتر به شدت کاهش یابد که این تاثیر احتمالا نتیجه‌ای از ظرفیت ترشحي محدود ماشین انتقالی مربوط به *E. coli* است. زمانیکه این ظرفیت پر می‌شود احتمالا باقی مانده‌ی پروتئین‌های نوترکیب به فرم اینکلوژن بادی تجمع می‌یابد. بنابراین یک راه حل برای بهینه‌سازی سطح بیان ایجاد توازن در قدرت پروموتور و تعداد کپی‌های ژن است. در هر حال در بررسی‌های انجام شده بمنظور ترشح پروتئین‌ها با استفاده از پپتیدهای نشانه نباید انتظار داشت که پروتئین هدف ۱۰۰ درصد به پری پلاسم منتقل شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه تهران تحت شماره گرنت ۳۰۰۹۶/۰۶/۰۱ به دکتر ناصر انصاری پور انجام شده است. نویسندگان از ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول بنیادی به خاطر حمایت مالی که تحت شماره طرح ۱۱/۲۵۸۰۲ به دکتر زهرا حاجی حسن انجام شده است تشکر می‌کنند.

در مجموع با توجه به داده‌های به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پپتید نشانه‌ی اصلاح شده‌ی آنزیم آلفا آمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران بیان پری پلاسمی را نسبت به سویه‌ی کنترل مثبت حاوی پپتید نشانه و کل ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن Dsb A به میزان بیشتری افزایش می‌دهد و به عبارتی پپتید نشانه بهتری برای بیان پری پلاسمی پروتئین β -NGF می‌باشد. همچنین با توجه به بررسی‌های مقایسه‌ای که انجام شد می‌توان نتیجه گرفت سویه‌ی BL21(DE3)pLysS نسبت به سویه BL21(DE3) میزان بهتری برای بیان پروتئین β -NGF با استفاده از پپتید نشانه‌ی مذکور است.

همانطور که در نتایج مربوط به دات بلات دیده می‌شود کل پروتئین تولید شده به پری پلاسم هدایت نشده است. در واقع باید توجه داشت که ترشح پروتئین در *E. coli* یک فرآیند پیچیده است و تلاش برای ترشح پروتئین‌های نوترکیب می‌تواند با چندین مشکل مواجه باشد. مهم‌ترین این مشکلات انتقال ناقص در عرض غشا داخلی، ظرفیت ناکافی ماشین انتقال پروتئین و تخریب پروتئولیتیک است. چندین فاکتور ترشح یک پروتئین نوترکیب در *E. coli* را تحت تاثیر قرار می‌دهند. ترکیب آمینو اسیدی پپتید نشانه

منابع

- ۱- حاجی حسن، ز.، حسینی، س.، زمردی پور، ع. ۱۳۹۵. بهینه‌سازی رمزه و مقایسه‌ی بیان فاکتور رشد اکتوین A در میزبان‌های باکتریایی BL21(DE3)pLysS. BL21(DE3) و BL21(DE3)Rosetta. مجله زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس. ۷(۲)، ۷۱-۶۱.
- ۲- شجاع‌ز.، رجیبی معماری، ح.، رعایایی اردکانی، م. ۱۳۹۴. جداسازی همسانه‌سازی و بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در سیستم
- 3- مرتضوی، م.، امین زاده، س.، قنبری، ع.، فرخی، ن.، کارخانه، ع.، جواهری صفا، ز. ۱۳۹۶. تولید باکتریایی پروتئین نوترکیب کیتیناز از باکتری ترموفیل *Paenibacillus sp A01*. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۳۰(۲)، ۳۵۹-۳۵۲.
- 4- Aloe, L., Rocco, M.L., Bianchi, P., Manni, L., 2012. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. Journal of translational medicine 10, 239.
- 5 - Althaus, H.H., 2004. Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins? Progress in brain research 146, 415-432.
- 6 - Barnett, J., Baecker, P., Routledge-Ward, C., Bursztyjn-Pettegrew, H., Chow, J., Nguyen, B., Bach, C., Chan, H., Tuszynski, M.H., Yoshida, K., 1990. Human β nerve growth factor obtained from a baculovirus expression system has potent in vitro and in vivo neurotrophic activity. Experimental neurology 110, 11-24.
- 7 - Bax, B., Ferguson, G., Blaber, M., Sternberg, M.J., Walls, P.H., 1993. Prediction of the

- three-dimensional structures of the nerve growth factor and epidermal growth factor binding proteins (kallikreins) and an hypothetical structure of the high molecular weight complex of epidermal growth factor with its binding protein. *Protein Science* 2, 1229-1241.
- 8 - Brondyk, W.H., 2009. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 131-147.
 - 9 - Bruce, G., Heinrich, G., 1989. Production and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Neurobiology of aging* 10, 89-94.
 - 10 - Demaio, A., 1996. Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes. *Protein blotting*. Oxford University Press, Oxford, 11-32.
 - 11 - Dicou, E., 1992. Expression of recombinant human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Neurochemistry international* 20, 129-134.
 - 12 - Fahnestock, M., 1991. Structure and biosynthesis of nerve growth factor, *Neuronal Growth Factors*. Springer, pp. 1-26.
 - 13 - Fan, B.-S., Lou, J.-Y., 2010. Recombinant expression of human nerve growth factor beta in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular biology reports* 37, 4083-4090.
 - 14 - Fujimori, K., Fukuzono, S., Kotomura, N., Kuno, N., Shimizu, N., 1992. Overproduction of biologically-active human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 56, 1985-1990.
 - 15 - Heese, K., Low, J.W., Inoue, N., 2006. Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's disease. *Neurosignals* 15, 1-12.
 - 16 - Ibáñez, C.F., 1998. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends in neurosciences* 21, 438-444.
 - 17 - Iwane, M., Kitamura, Y., Kaisho, Y., Yoshimura, K., Shintani, A., Sasada, R., Nakagawa, S., Kawahara, K., Nakahama, K., Kakinuma, A., 1990. Production, purification and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Biochemical and biophysical research communications* 171, 116-122.
 - 18 - Kurokawa, Y., Yanagi, H., Yura, T., 2001. Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 14393-14399.
 - 19 - Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227, 680.
 - 20 - Lambiase, A., Sacchetti, M., Bonini, S., 2012. Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Current opinion in ophthalmology* 23, 296-302.
 - 21 - Levi-Montalcini, R., 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237, 1154-1162.
 - 22 - Ma, W., Wang, C., Su, Y., Tian, Y., Zhu, H., 2015. Expression of nerve growth factor and its receptor, tyrosine kinase receptor A, in rooster testes. *Animal reproduction science* 161, 40-46.
 - 23 - McDonald, N.Q., Lapatto, R., Rust, J.M., Gunning, J., Wlodawer, A., Blundell, T.L., 1991. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354, 411.
 - 24 - Meakin, S.O., Shooter, E.M., 1992. The nerve growth factor family of receptors. *Trends in neurosciences* 15, 323-331.
 - 25 - Nguyen, B., Jarnagin, K., Williams, S., Chan, H., Barnett, J., 1993. Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *Journal of biotechnology* 31, 205-217.
 - 26 - Nishizawa, M., Ozawa, F., Higashizaki, T., Hirai, K., Hishinuma, F., 1993. Biologically active human and mouse nerve growth factors secreted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology* 38, 624-630.
 - 27 - Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., Rudolph, R., 2001. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *The FEBS Journal* 268, 3296-3303.
 - 28 - Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
 - 29 - Schmelzer, C.H., Burton, L.E., Chan, W.P., Martin, E., Gorman, C., Canova-Davis, E., Ling, V.T., Sliwkowski, M.B., McCray, G., Briggs, J.A., 1992. Biochemical characterization of recombinant human nerve growth factor. *Journal of neurochemistry* 59, 1675-1683.
 - 30 - Vigentini, I., Merico, A., Tutino, M.L., Compagno, C., Marino, G., 2006. Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic

- Pseudoalteromonas haloplanktis. Journal of biotechnology 127, 141-150.
- 31- Wiesmann, C., De Vos, A., 2001. Nerve growth factor: structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 58, 748-759.
- 32 - Zhang, J., Zhang, L., Zhang, X., Chai, J., Li, C., 1997. The high expression of human beta-nerve growth factor in E. coli. Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica 37, 429-433.

Cloning and secretory expression of human β -NGF using the modified signal peptide of the Iranian native *Bacillus licheniformis* alpha amylase

Qobadi Nasr S., Hajihassan Z. and Ansari-Pour N.

Dept. of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nerve growth factor (NGF) is a well-characterized member of the neurotrophin protein family, which has been shown to play a pivotal role in treating diseases such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease. Production of recombinant proteins in *E. coli* has particular disadvantages, which are primarily inclusion body formation and lack of disulfide bond formation in the cytoplasm. We therefore aimed to use the modified signal peptide of the Iranian native *Bacillus licheniformis* alpha-amylase to target the expressed recombinant β -NGF to the periplasm as an effective strategy to produce correctly-folded β -NGF. For this purpose, the human β -NGF gene with the signal sequence of the Iranian native *Bacillus licheniformis* alpha-amylase was cloned into a pET21a (+) vector and then the recombinant vector was transformed to BL21 (DE3) and BL21 (DE3) plysS strains. Protein expression was induced by 1mM IPTG in strains with the recombinant vector and the positive control strain containing the pET39b (+) vector with the DsbA signal peptide. Cytoplasmic and periplasmic expression of β -NGF was confirmed by SDS-PAGE and dot-blot assays. Finally, the expressed periplasmic proteins were purified using affinity chromatography and this purification was confirmed by using SDS-PAGE and Western blot assays. The results show the modified signal peptide of the Iranian native *Bacillus licheniformis* alpha-amylase is more effective for the secretory expression and directing β -NGF to the periplasmic space than the DsbA signal peptide. Also, these results indicate that the BL21 (DE3) plysS strain is an appropriate host for periplasmic expression of β -NGF.

Key words: Nerve growth factor, recombinant protein, signal sequence, periplasmic expression