ORIGINAL ARTICLE

Designing and Constructing Clone for Extracellular Expression of the Desirudin Anticoagulant Drug in E.coli

Sahar Sabaghzadeh[1],
Hasan Mirzahoseini[2],
Delavar Shahbazzadeh[2],
Tahereh Naji[3]

[1] MSc in Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received May 5, 2014 ; Accepted December 8, 2014)

Abstract

Background and purpose: Hirudin is a 65-66 amino acids polypeptide which is secreted as an anticoagulant compound from salivary glands of medical leech. This drug is a very potent inhibitor of thrombin and is so effective for arterial and venous thrombosis prevention. Therefore, it can compete with heparin. The aim of this study was to add a pelB signal peptide to pET-22b plasmid and to investigate the expression of recombinant hirudin in E.coli.

Materials and methods: At first, the 66 nucleotic sequence of hirudin's gene was obtained and entered to a powerful vector (pET-22b). N_terminal His-tag was used for protein purification. We inserted pelB signal sequence at the begining of the gene to secrete protein to periplasmic region and culture medium. The expression of the target protein by origami (DE3) strain was then measured. Finally, the target protein was measured in periplasmic region, cytoplasm and culture medium.

Results: The results showed that more protein was expressed in the periplasmic space and a small amount of protein secreted into the culture medium.

Conclusion: Using the vectors capable of transferring the proteins to the periplasmic region, that is very favorable space for the formation of disulfide bonds and properly folding of the target protein, could decrease the production of inclusion bodies and increase the production of soluble and active proteins

Keywords: pelB signal sequence, hirudin, desirudin, anticoagulant, periplasmic

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(119): 72-82 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۹ آذر سال ۱۳۹۳ (۸۲-۷۲)

طراحی و ساخت کلون بیان کننده داروی ضد انعقادی دسیرودین (هیرودین) به شکل خارج سلولی در اشرشیا کلی

سحر صباغ زاده[۱]
حسن میرزاحسینی[۲]
دلاور شهباز زاده[۲]
طاهره ناجی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: هیرودین پلی پپتیدی با ۶۵ تا ۶۶ اسید آمینه است که به عنوان داروی ضدانعقادی، از غدد بزاقی زالو ترشح می‌شود. این دارو، مهارکننده بسیار قوی ترومبین می‌باشد بنابراین می‌تواند رقیبی برای هپارین نیز باشد. هدف از این مطالعه، الحاق توالی سیگنال پپتید pelB (توالی سیگنال پپتید pelB روی سکانس پلاسمید pET-22b تعبیه شده است) و بررسی بیان پروتئین نوترکیب هیرودین در اشرشیاکلی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ترادف ۶۶ آمینواسیدی واریانت HV3 ژن هیرودین تهیه و به داخل یک وکتور بیانی قوی (pET-22b) انتقال داده شد. برای تسهیل در تخلیص پروتئین از His-tag در ناحیه N-ترمینال ژن استفاده گردید. سیگنال پپتید pelB در ابتدای ژن با هدف ترشح به فضای پری پلاسمیک و محیط کشت درج شد و ساختار پلاسمیدی حاصله توسط سویه OrigamiB (DE3) باکتری E.coli بیان شد. در نهایت میزان بیان پروتئین تولیدی در ناحیه سیتوپلاسم، فضای پری پلاسمی و محیط کشت مقایسه گردید.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که مقدار پروتئین بیشتری در فضای پری پلاسمیک بیان شده و مقدار کمی پروتئین نیز به محیط کشت ترشح گردیده است.

استنتاج: با به کارگرفتن وکتورهایی که قادر به انتقال پروتئین هدف به فضای پری پلاسمیک، که محیطی بسیار مطلوب برای شکل‌گیری باندهای دی سولفید و فلدینگ صحیح پروتئین هدف هستند، احتمال تشکیل اینکلوژن بادی‌ها کاهش یافته و تولید پروتئین‌های محلول و فعال افزایش می‌یابد.

واژه های کلیدی: سیگنال پپتید pelB، هیرودین، دسیرودین، ضد انعقادی، پری پلاسمیک

مقدمه

با توجه به مزیت‌های دارویی هیرودین و ارجحیت مصرف آن در مقایسه با هپارین به عنوان داروی ضد انعقاد خون، تولید آن در داخل کشور برای مصارف دارویی امری ضروری می‌باشد. در سال ۱۸۸۴پروفسور دانشگاه ولز به نام جابن هی کرافت به خاصیت ضد انعقادی ترشحات گوارشی زالو پی برد و در سال ۱۹۵۰ فریتس مارکواست از آلمان توانست پروتئین هیرودین را از *Hirudo medicinals* جدا کند(۲،۱).

مولف مسئول: حسن میرزاحسینی– تهران: انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی پزشکی E mail:mirzahoseini@pasteur.ac.ir
۱. دانشجوی کارشناس ارشد علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۲/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۴/۱۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۹/۱۷

هیرودین نوترکیب با استفاده از تکنولوژی مهندسی ژنتیک ایجاد شده است که دارای خواص دارویی مشابهی با هیرودین طبیعی می‌باشد اما تفاوتی که با هیرودین طبیعی دارد در این است که فاقد گروه سولفات روی تیروزین شماره ۶۳ می‌باشد بنابراین تحت عنوان دسولفاتوهیرودین بیان می‌شود، گرچه این تغییر کوچک ساختاری باعث تمایل کم‌تر دسولفوهیرودین به ترومبین می‌شود با این حال هیرودین نوترکیب مهارکننده بسیار اختصاصی برای ترومبین در حدود پیکو مولار می‌باشد(۳). داروی دسیرودین، مهار کننده دوظرفیتی، طبیعی، مستقیم، انتخابی و بسیار قوی ترومبین می باشد که برای اعمال عملکردش نیاز به کوفاکتوری ندارد و توسط فاکتور ۴- پلاکتی و سایر پروتئین‌های پلاسما، غیر فعال نمی‌گردد. در مقایسه با مهارکننده‌های غیر مستقیم ترومبین (مانند هپارین) که تشکیل کمپلکس های کوالان آنتی ترومبین- ترومبین را می دهند، هیرودین به طور غیر کوالان به ترومبین اتصال می یابد. با این وجود، اتصال هیرودین به ترومبین برگشت ناپذیر بوده که این، ناشی از Affinity بالای هیرودین می‌باشد و فقط در حضور مهارکننده‌های سنتتیک ترومبین و به دنبال دناتوراسیون حرارتی ترومبین، جدا می‌شود و باعث تبدیل فیبرینوژن به فیبرین شده و اتصال ترومبوسیت‌ها را مسدود کرده و باعث مهار تجمع آن‌ها در سطح کلاژن می‌گردد(۴). هیرودین پایداری بالایی علیه اسید نشان داده و همچنین دارای پایداری پروتئولیتیک علیه تریپسین بوده و نسبت به شرایط محیطی نامناسب از قبیل افزایش دما و افزایش pH مقاومت نشان می‌دهد. به علاوه دسیرودین به عنوان مهارکننده ترومبین، برای پیشگیری از ترومبوزیس عمیق عروقی (Deep vein thrombosis) در طی جراحی‌های ارتوپدیک به کار می‌رود که به نظر می‌رسد نسبت به هپارین موثرتر است و بر خلاف آن، منجر به کاهش تعداد پلاکت ها در گردش خون (Thrombocytopenia) نمی‌گردد. دسیرودین به عنوان درمانی برای Acute myocardial infarction (آنفارکتوس حاد عضله قلب عبارت است از مرگ سلول‌های عضلانی قلب در اثر کاهش یا توقف جریان خون سرخرگ‌های قلب) و Unstable angina pectoris (آنژین صدری عبارت است از درد قفسه سینه که از قلب برخواسته باشد) به کار می‌رود(۵).

انواع هیرودین شامل

HVI، HVII و HVIII (Hirudin Variant) است. داروهای مشتق شده از هیرودین شامل دسیرودین و Lepirudin و نیز آنالوگ‌های هیرودین شامل Bivalirudin و Hirulogs می‌باشند(۸-۶). شایان ذکر است که تمام داروهای مشتق شده از هیرودین به شکل تزریقی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به نیمه عمر کوتاه هیرودین و خونریزی‌های بعد از جراحی، سعی در گسترش تجویز آن به شکل غیر تزریقی، وجود دارد. دوز پیشنهادی دسیرودین به صورت ۱۵ mg روزی دوبار به صورت تزریق زیرجلدی (s.c.) و به مدت ۹ تا ۱۲ روز بعد از عمل جراحی، می‌باشد(۵).

استراتژی متداول برای به‌دست آوردن پروتئین‌هایی فعال و محلول، به کارگیری وکتورهایی است که قادر به انتقال پروتئین هدف به فضای پری پلاسمی هستند. فضای پری پلاسمی محیطی بسیار مطلوب برای شکل گیری باندهای دی سولفید است، مناسب بودن شرایط اکسیداسیون و احیایی برای فلدینگ صحیح پروتئین هدف، کم‌تر بودن فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک، سهولت فرآیندهای پایین دستی تخلیص و افزودن به فعالیت بیولوژیکی پروتئین از دیگر مزایای این محیط است. DsbA(Bacterial disulfide oxidoreductase) ، DsbC(Disulfide-bond isomerase) آنزیم‌های پری پلاسمیک می‌باشند که شکل گیری و ایزومریزاسیون باندهای دی سولفید را در باکتری‌های گرم منفی کاتالیز می‌کنند. اکسیداسیون و ایجاد باندهای دی سولفید از جمله تغییراتی هستند که منجر به ایجاد فلدینگ و

عملکرد پروتئین می‌شوند(۹). در جریان تولید پروتئین نوترکیب هیرودین در E.coli، بخشی از پروتئین در ساختارهای نامحلول سیتلاسمی به نام اینکلوژن بادی تجمع پیدا می‌کند. محدودیت اصلی در بیان پروتئین نوترکیب در E.coli در میزان تجمع بالای پروتئین‌های ناهمگن در سیتوپلاسم است(۶). اگرچه می‌توان پروتئین نوترکیب مورد نظر را از اینکلوژن بادی استخراج و خالص نمود ولی هیچ تضمینی جهت دارا بودن فعالیت بیولوژیکی آن وجود ندارد و مطالعات محدود هم بیانگر عدم موفقیت در Refolding اینگونه پروتئین‌ها است. فعالیت پروتئین بستگی به فلدینگ‌دقیق و صحیح ساختار سه بعدی دارد. حالت‌های استرس‌زا مانند شوک حرارتی یا زمانی که پروتئین‌های نوترکیب به میزان بالا بیان می‌شوند باعث شکل‌گیری اینکلوژن بادی‌های E.coli می‌شوند(۷).

راه‌های مختلف برای کاهش تشکیل اینکلوژن بادی در تجربیات متفاوت به کار رفته است، از جمله آن می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱-رشد باکتری در درجه حرارت پایین‌تر.

۲-انتخاب گونه‌های متفاوت E.coli

۳-جایگزین اسیدهای آمینه

۴-استفاده از تیوردوکسین E.coli یا به عنوان Fusion partner با بیان همزمان

۵-اضافه کردن قند غیر قابل متابولیسم به محیط کشت

۶-تغییر pH محیط کشت

۷-استفاده از گونه‌هایی که نقص تیوردوکسین ردوکتاز دارند

استفاده از Fusion partner همانند Signal peptide جهت ترشح به فضای پری‌پلاسمیک یا خارج سلولی و ایجاد حلالیت

هدف از انجام پروژه حاضر، این بود که برای افزایش میزان بیان پروتئین هیرودین، ژن آن به داخل پلاسمید بیانی (+) pET-22b وارد شود و از آن‌جایی که این پلاسمید حاوی سیگنال پپتید *pelB* می‌باشد، ترشح پروتئین هدف به فضای پری پلاسمیک و احتمالا محیط کشت را تسهیل می‌کند در این تحقیق استفاده از Signal sequence کاملا مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به این‌که هیرودین به طور طبیعی فاقد Signal sequence است، در نظر گرفته شده است که با الحاق این بخش به ژن هیرودین و بیان پروتئین هیرودین، مکان ترشح پروتئین به فضای پری‌پلاسمیک یا محیط خارج سلول و یا سیتوپلاسم مشخص گردد و پروتئین محلول به دست آید.

مواد و روش ها

مواد: سویه استاندارد *Origami(DE3)* (خریداری شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران) باکتری E.coli به عنوان سویه مناسب جهت بیان ژن و وکتور pET22b(+) مورد استفاده قرار گرفت. محیط‌های کشت مورد استفاده در این مطالعه شامل محیط مایع LB-Broth و آگار LB-Agar (Merck,Germany) بود. آنزیم‌های به کاربرده شده نیز شامل آنزیم‌های محدودکننده و Taq DNA Polymerase و T_4 DNA Ligase بودند که همگی از شرکت فرمنتاز خریداری شدند. آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (خریداری شده از شرکت داروسازی فارابی) به هنگام نیاز با غلظت نهایی ۱۰۰ µg/mL و هم‌چنین محلول ذخیره IPTG (خریداری شده از شرکت فرمنتاز) به هنگام نیاز با غلظت نهایی ۱ mM مورد استفاده قرار گرفتند(۱۰).

تکثیر DNA با روش PCR: (تیتر جداگانه) توالی ژن هیرودین III با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژنی، تهیه و توسط شرکت Biomatik کانادایی ساخته و ارسال شد. ژن مورد نظر توسط شرکت سازنده، داخل پلاسمیدی به نام pGH-Gene 3 (3130 bp) وارد گردید. با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner و بر اساس توالی ژن‌هیرودین در ساختار پلاسمیدی مربوطه، به جهت این‌که بعد از کلون کردن ژن در پلاسمید (+) pET-22b می‌بایست ژن دقیقا بعد از توالی سیگنال پپتید

pelB leader قرار می‌گرفت، پرایمرهای جلو رونده و معکوس جهت انجام PCR طراحی شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. (تصویر شماره یک اشتباه جایگذاری شده بود، تصویر مربوطه توالی پرایمرها میباشد که در صفحه زیر مشخص شده است)

پس از انجام PCR در دمای اتصال مناسب و خالص‌سازی ژن هیرودین از روی ژل آگارز با استفاده از کیت جداسازی (K0513 DNA) شرکت فرمنتاز، محصول تخلیص شده به وکتور pET-22b(+) در دو محل برش آنزیم NcoI (5') و SalI (3') اضافه شد.

کلونینگ ژن هیرودین III در داخل pTG19-T PCR cloning vector: (تیتر جداگانه) جهت انجام این کلونینگ از کیت #TA010pTG19-T PCR cloning vector مربوط به کمپانی Vivantis استفاده شد. این وکتور توسط شرکت مربوطه به وسیله آنزیم BamHI برش خورده و دارای نوکلئوتید تیمین با 3′OH آزاد در دو انتها می‌باشد. در نتیجه می‌توان محصولات PCR تولید شده توسط آنزیم Taq Polymerase با آدنین آزاد در دو انتها را به راحتی داخل آن کلون نمود. محصول PCR حاوی A-overhang، با این وکتور در نسبت بالایی ترکیب شده و overhang های مکمل از T vector و محصول PCR با یکدیگر هیبرید می‌گردند. سرانجام یک Recombinant DNA ایجاد گشته که این نوترکیبی توسط T_4 DNA Ligase واقع می‌شود. سویه Top10 باکتری E.coli جهت تهیه سلول‌های مستعد، مورد استفاده قرار گرفت و وکتور نوترکیب، به روش شوک حرارتی به درون سلول‌های مستعد انتقال داده شد شد. سلول‌های منتفل شده شده بر روی محیط آگار حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و X-gal کشت داده شدند. کلون‌های سفید رنگ به منظور تأیید با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ژن هیرودین، PCR و همچنین توسط هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های NcoI و SalI مورد بررسی قرار گرفتند.

ساب کلونینگ ژن هیرودین III در pET-22b (+): بدین منظور، ساختار وکتور نوترکیب هیرودین III / pTG19-T با استفاده از آنزیم‌های NcoI و SalI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت تا بدین وسیله ژن هیرودین III دارای انتهای چسبنده از آن خارج گردد. سپس داخل وکتور بیانی pET-22b هضم یافته با دو آنزیم مذکور، ساب کلون شد. در نهایت ساختار حاصل شده، در سلول‌های مستعد اشرشیا کولی سویه Origami (DE3) ترانسفورم و روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. جهت بررسی صحت کلونینگ، Colony PCR انجام شد.

بیان ژن هیرودین III و الکتروفورز SDS-PAGE: پس از تایید کلونی‌های حاصله توسط Colony PCR، کلنی‌های مثبت جهت بررسی بیان به ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تلقیح شدند. سپس لوله های مذکور داخل شیکر انکوباتور ۳۷ درجه با دور 180 rpm قرار داده شدند. پس از حدود سه ساعت جذب نوری محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. زمانی که OD محیط به ۰.۴ تا ۱ رسید، لوله‌ها توسط IPTG با غلظت نهایی یک میلی‌مولار القا گردیدند. سپس لوله‌ها مجددا داخل

توالی پرایمر جلورونده همراه با سکانس شناسایی آنزیم NcoI (67 mer): (توالی پرایمر نادرست بود)

SacI NcoI His-Tag Entrokinase

T TC GAGCTC G CCATGG CATCATCATCATCATCAC AGCAGCGGC GACGACGACGACAAA ATG ATCACC - 3′

توالی پرایمر معکوس رونده همراه با سکانس آنزیم SalI (21 mer): (جایگاه برش آنزیم نادرست تعیین شده بود)

SalI

5′- CGA CAG GTT **TGT** CGA CAA AAA - 3′

تصویر شماره ۱ : توالی پرایمر جلورونده و معکوس

شیکر انکوباتور ۳۷ درجه با دور 180rpm در زمان‌های متفاوت ۳ ساعت، ۵ ساعت و یک شبانه روز انکوبه شدند. پس از جمع‌آوری باکتری‌ها بوسیله سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه به مدت ۶ دقیقه، عمل شکست دیواره به‌وسیله سونیکاسیون انجام شد. رسوب سلولی به‌دست آمده از ۱ میلی لیتر حاوی نمونه پروتئینی تحت شرایط دناتوره بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵ درصد الکتروفورز شد و ژل SDS-PAGE حاصله جهت بررسی بیان هیرودین نوترکیب با استفاده از رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی گردید.

مکان‌یابی پروتئین نوترکیب هیرودین: برای شناسایی و تجزیه و تحلیل مکاهایی که پروتئین هیرودین در آن وجود دارد، جداسازی فراکشن‌های مختلف سلولی شامل فراکشن پروتئین‌های محلول، فراکشن پروتئین‌های نا محلول، فراکشن پروتئین‌های پری پلاسمی و فراکشن محیط کشت انجام شد. جهت جداسازی فراکشن های مختلف، محیط کشت حاوی باکتری رشد کرده را سانتریفوژ کرده مایع رویی فراکشن محیط کشت را تشکیل خواهد داد در این مرحله باید از ورود هرگونه رسوب سلولی به نمونه محیط کشت اجتناب نمود. جهت جداسازی فراکشن پری پلاسمیک؛ رسوب سلولی به دست آمده از مرحله قبل با استفاده از پروتکل شوک اسموتیک ($MgSO_4$،EDTA،Sucrose 20%،Tris-Hcl) تیمار شد. در مرحله بعد جهت جداسازی پروتئین‌های محلول سیتوپلاسمی رسوب باقیمانده از مرحله تهیه فراکشن پری پلاسمی را در بافر سرد Tris-HCl حل کرده و سلول‌ها با استفاده ازسونیکاتور لیز شد. پس از سانتریفوژ مایع رویی حاوی پروتئین‌های محلول و رسوب سلولی باقیمانده حاوی پروتئین‌های نامحلول می‌باشد. فراکشن‌های به‌دست آمده با استفاده از دستگاه لیوفیلیزه تغلیظ شدند. این فراکشن‌ها جهت آزمایش‌های SDS-PAGE (نمونه‌های پروتئینی تحت شرایط دناتوره به همراه نشانگرپروتئینی روی ژل پلی آکریل آمید با غلظت ۱۸درصد و جریان ۲۵ میلی آمپر به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند) و وسترن بلاتینگ به کار برده شدند.

وسترن بلاتینگ: پس از الکتروفورز SDS-PAGE به منظور انجام وسترن بلاتینگ باندهای پروتئینی روی کاغذ PVDF انتقال داده شد. سپس کاغذ PVDF با استفاده از بافر مسدودکننده (حاوی ۳ درصد BSA) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و سپس با PBST شست و شو داده شد. پس از آن کاغذ PVDF به همراه آنتی‌بادی anti his6–peroxidase (مونوکلونال آنتی بادی علیه His-tag کونژوگه شده با پراکسیداز خریداری شده از شرکت Roche) به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از شستشو با PBST، سوبسترا شامل دی آمینوبنزیدین تتراهیدروکلراید (DAB) و H_2O_2 بر روی کاغذ ریخته و پس از ظاهر شدن باند، واکنش بلافاصله با آب مقطر متوقف شد.

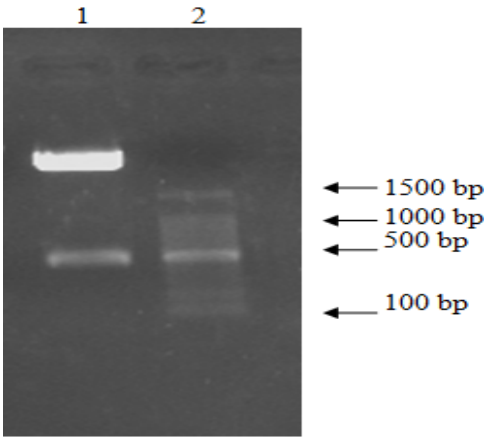
یافته ها

تکثیر ژن هیرودین توسط روش PCR: ابتدا با کمک روش Gradient PCR دماهای مختلف اتصال پرایمر آزمایش گردید و دمای ۴۹/۵ درجه بهترین دما جهت اتصال پرایمرها تعیین شد. پس از انجام واکنش PCR، با توجه به اندازه قطعه ژن هیرودین یک باند حدودا ۵۲۲ جفت بازی در کنار مارکر استاندار روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید.

کلونینگ و ساب کلونینگ ژن هیرودین:

سپس کلونینگ به داخل T vector صورت گرفت و پس از ترانسفورماسیون به داخل سویه Top10 از باکتری اشرشیا کولی به حدود ۴۸ تک کلنی سفید رنگ دسترسی یافته شد. برای مشخص کردن کلنی‌های واجد محصول PCR، تعدادی از کلنی‌های مشکوک، توسط آنزیم BamHI (تعبیه شده بر روی نقشه T vector) برش داده شدند. بعد از الکتروفورز نمونه‌های هضم شده، باند مورد نظر که حاوی محصول PCR می‌باشد مورد شناسایی قرار گرفت. سپس محصول PCR (ژن هیرودین)

از داخل T-vector توسط آنزیم‌های NcoI, SalI خارج گردید. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱ درصد به همراه مارکر وزن مولکولی DNA، لود شد. قطعه ۵۰۱ جفت باز که همان محصول PCR حاوی ژن هیرودین می‌باشد، از روی ژل آگارز تخلیص شد. این قطعه به داخل پلاسمید بیانی pET-22b (+) منتقل شد. واکنش اتصال، توسط آنزیم T4 DNA Ligase برقرار و ساختار حاصل، جهت بررسی کلونینگ و بیان، به داخل سویه Origami (DE3) باکتری E.coli ترانسفورم شد. این پلاسمید به این جهت انتخاب شد که توالی سیگنال پپتید pelB leader را در خود دارد. جهت تایید ورود پلاسمید نوترکیب pTE-22b (+) به داخل سویه مذکور از باکتری اشرشیا کولی، فرآیند Colony PCR انجام گردید. همچنین برای تایید دقیق‌تر صحت ساب کلونینگ، ساختار پلاسمید نوترکیب pET-22b(+) حاوی ژن هیرودین تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های NcoI و SalI قرار گرفت. انتظار می‌رفت که در صورت ساب کلونینگ صحیح، پس از هضم آنزیمی، یک قطعه حدود ۵۰۱ جفت باز و یک قطعه بزرگتر حدود ۵۴۵۲ جفت باز جدا شوند (تصویر شماره ۱).

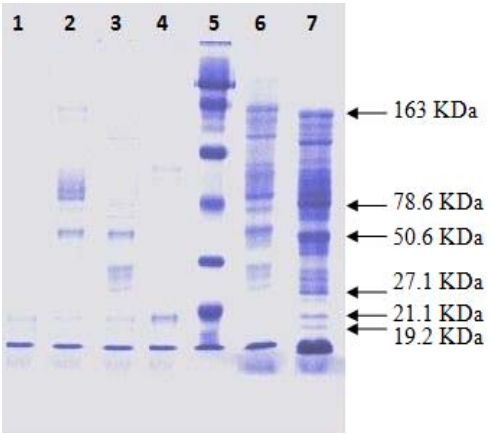


تصویر شماره ۱: تصویر الکتروفورز هضم آنزیمی ساختار پلاسمید نوترکیب pET-22b(+) حاوی ژن هیرودین توسط آنزیم های NcoI, SalI برای تایید دقیق تر صحت ساب کلونینگ

ستون ۱: مشاهده باند ۵۰۱ جفت بازی که نشاندهنده خروج ژن هیرودین پس از هضم آنزیمی می باشد.

ستون۲: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (maxcell).

بررسی بیان پروتئین هیرودین III و تایید حضور آن در فراکشن‌های مختلف سلولی: پس از القای نمونه‌ها و الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE در مقایسه با نشانگر پروتئینی، در ناحیه ۲۱ کیلو دالتون باند پروتئین نوترکیب موردنظر مشاهده شد (تصویر شماره ۲) و با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ تایید گردید (تصویر شماره ۳). به علاوه بعد از انجام فراکشن گیری و تغلیظ نمونه ها، نمونه های مربوط به فراکشن های مختلف سلولی با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شدند. نتیجه نشانگر اینست که به علت وجود سیگنال پپتید، باند بیانی پروتئین نوترکیب هیرودین در فراکشن های پری پلاسمیک و محیط کشت نیز مشاهده گردید (تصویر شماره ۲). پس از انجام SDS-PAGE و مشاهده باند بیانی مذکور، جهت تایید نهایی بیان پروتئین نوترکیب هیرودین در فراکشن های مختلف سلولی، وسترن بلاتینگ انجام گردید. در نهایت، باند مربوط به پروتئین نوترکیب هیرودین در ناحیه ۲۱ کیلو دالتون بر روی کاغذ PVDF به همراه مارکر وزن پروتئینی مشاهده گردید. باند مذکور بر روی کاغذ PVDF تنها در فراکشن محیط کشت مشاهده نگردید (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۲: تصویر ژل SDS_PAGE مربوط به فراکشن های مختلف سلولی در OrigamiB (DE3)

ستون ۱: فراکشن محیط کشت

ستون ۲: فراکشن پروتئین های نامحلول سیتو پلاسمی

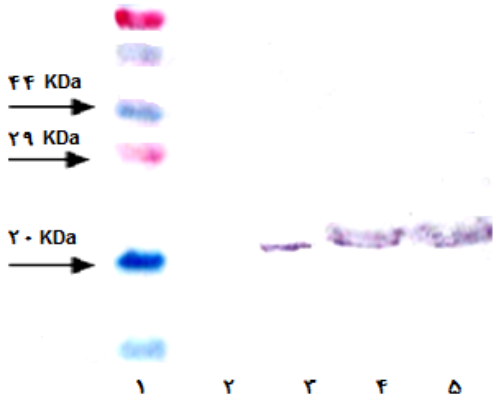
ستون ۳: فراکشن پروتئین های محلول سیتوپلاسمی

ستون ۴: فراکشن پری پلاسمی.

ستون ۵: Protein Ladder.

ستون ۶: نمونه کنترل منفی (باکتری OrigamiB (DE3) دارای پلاسمید نوترکیب pET-22b (+) که توسط IPTG القا نشده است).

ستون ۷: نمونه کنترل مثبت (باکتری OrigamiB (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET1008).



تصویر شماره ۳: تصویر کاغذ وسترن بلاتینگ مربوط به فراکشن های مختلف سلولی در Origami (DE3).

ستون۱: مارکر وزن پروتئینی.

ستون۲: فراکشن محیط کشت.

ستون۳: فراکشن پری پلاسمیک.

ستون۴: فراکشن پروتئین های محلول سیتوپلاسمی.

ستون۵: فراکشن پروتئین های نامحلول سیتوپلاسمی

بحث

تقاضا جهت پروتئین‌های انسانی مورد نیاز به عنوان مواد داروئی و یا درخواست‌هایی که جهت اهداف تحقیقاتی وجود دارد را نمی‌توان به طور کامل از منابع طبیعی استخراج و تهیه نمود. کشت و توانایی بیان وکتورها در باکتری E.coli، این باکتری را میزبان مناسبی جهت تولید مقادیر فراوانی از پروتئین های نوترکیب نموده است(۱۱). از این رو در پروژه حاضر، تصمیم بر این شد که برای افزایش میزان بیان هیرودین، ژن آن به داخل پلاسمید بیانی pET-22b (+) وارد شود و از آن‌جایی که این پلاسمید حاوی سیگنال پپتید pelB می باشد، ترشح پروتئین هدف به فضای پری پلاسمیک که محیطی بسیار مطلوب برای شکل گیری باندهای دی سولفید و فلدینگ صحیح پروتئین هدف می‌باشد را تسهیل می کند. نتیجه نشان از بیان موفقیت‌آمیز پروتئین هیرودین در ساختار pET-22b (+) داد. هر چند وزن پروتئین سنگین تر از حد معمول مشاهده شد که بر اساس نظرات یافت شده در مقالات، این پدیده به این علت می‌باشد که محصول ترشحی پس از ترشح به محیط خارج سلولی، دایمر می‌شود. این دایمری شدن پروتئین هیرودین، به دلیل شکل گیری باندهای دی سولفیدی داخل مولکولی نمی‌تواند باشد، زیرا وزن مولکولی هیرودین توسط آنالیز Mass، ۷ کیلودالتون تشخیص داده شده است که نشاندهنده مونومر شدن دایمر مربوطه می باشد. اگر باندهای دی سولفیدی داخل مولکولی به طرز نادرستی شکل گیرند، پس دایمر مربوطه نمی‌تواند مونومر شود، به عبارت دیگر، این پدیده باعث می گردد که توسط آنالیز Mass، وزن مولکولی هیرودین ۱۴ کیلودالتون نشان داده شود و در این‌صورت، ساختار سه بعدی طبیعی محصول از فلدینگ صحیح خود خارج شده و این باعث از دست رفتن فعالیت بیولوزیکی آن می گردد. این مسئله می‌تواند به علت برهم کنش هیدروفوبیک بین دو یا سه مولکول هیرودین رخ دهد(۱۲).

در جریان تولید پروتئین نوترکیب هیرودین در E.coli بخشی از پروتئین در ساختارهای نا محلول سیتوپلاسمی به نام اینکلوژن بادی تجمع می‌یابد(۱۳). محدودیت اصلی در بیان پروتئین نوترکیب در E.coli میزان تجمع بالای پروتئین های ناهمگن در سیتوپلاسم است(۱۴). اگرچه می توان پروتئین نوترکیب موردنظر را از اینکلوژن بادی استخراج و خالص نمود، ولی هیچ تضمینی جهت دارا بودن فعالیت بیولوژیکی آن وجود ندارد و مطالعات معدود هم نشان از عدم موفقیت در Refolding اینگونه پروتئین ها می‌باشد(۶).

ترشح پروتئین نوترکیب به فضای پری پلاسمی مزایای فراوانی نسبت به تولید سیتوپلاسمی آن دارد، این مزایا شامل مناسب بودن شرایط اکسیداسیون و احیایی برای فلدینگ صحیح پروتئین، کمتر بودن فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک، سهولت فرآیندهای پایین دستی

تخلیص و بالا بردن و افزودن به فعالیت بیولوژیکی پروتئین می‌باشد(۴). ترشح پروتئین به محیط کشت نیز دارای مزایایی می‌باشد از جمله می‌توان به عدم نیاز به تخریب غشای خارجی و نتیجتا جلوگیری از پروتئولیز توسط آنزیم‌های پری پلاسمی اشاره کرد. این مسئله اجازه می‌دهد تولید پروتئین نوترکیب به صورت پیوسته (Continuous) ادامه یابد(۱۵).

با توجه به مطالعات انجام شده بر روی پروتئین‌هایی که دارای اهمیت پزشکی برای انسان هستند (فاکتور محرک کلنی ماکروفاژ-گرانولوسیت (GM-CSF) و قطعه ناپایدار آنتی بادی تک زنجیره (scFv-phOx)، که پیش از این با استفاده از سیگنال پپتید pelB انجام گرفته است، اثرات قابل توجهی بر روی سطوح کلی بیان این دو پروتئین مشاهده شده است(۱۶) و هم چنین اثرات ترکیبی فیوژن پروتئین و سیگنال پپتید (pelB) به طور قابل توجهی تولید پروتئین نوترکیب بالغ HCVC173 (ویروس بالغ هپاتیت C که توالی pelB را تحت عنوان سیگنال پپتید حمل می‌کند) را در باکتری اشرشیا کلی افزایش داده است(۱۷). هم‌چنین با توجه به مطالعات انجام شده بر روی پروتئین هیرودین با استفاده از سیگنال پپتید های متفاوت، واریانت HVIII با استفاده از سیگنال پپتید L-آسپاراژیناز II به طور کارآمدی داخل E.coli سویه AS1.357 بیان شد، بعد از ارزیابی‌های انجام شده، دیده شد که در 250 ml محیط shake-flask سطح تولیدی هیرودین بعد از ۲۱ ساعت از القای بیان ژنی توسط 1mM IPTG، به (~60 mg/L) 500 ATU/ml رسید و با ادامه کشت، این مقدار کاهش نیافت(۱۰). همچنین واریانت HVIII با استفاده از سیگنال پپتید phoA به‌طور کارآمدی داخل E.coli سویه BMH71-18 بیان شد، بعد از ارزیابی‌های انجام شده، دیده شد که بعد از ۲۱ ساعت از القای بیان ژنی توسط ۰/۵ mM IPTG فعالیت پروتئین تولیدی به A_{578} 350 mIU/1 واحد سلولی در کل عصاره‌های سلولی و فراکشن‌های پری پلاسمیک رسید و تا ۱۰ ساعت بعد، پایدار باقی ماند.

نتایج نشان می‌دهد که محصول تخلیص شده دارای توالی آمینواسیدی مورد انتظار در ناحیه N-ترمینال بوده و همچنین فعالیت آنتی ترومبین (ضد انعقادی) قوی از خود نشان می‌دهد(۱۸). در مجموع می‌توان گفت نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با سایر تجربیات و تحقیقات در زمینه ترشح پروتئین‌های نوترکیب در اشرشیا کولی همخوانی دارد، و ما نشان دادیم برای استفاده از مزایای ترشح پروتئین نوترکیب به خارج از سیتوپلاسم، با استفاده از سیگنال پپتید، می‌توان پروتئین هیرودین را به فضای خارج سلولی منتقل کرد. هم‌چنین در پروسه‌ای مشابه، با بررسی اثر سیگنال پپتید Protein A بر روی پروتئین هیرودین، مشاهده شد که پروتئین نامبرده در اثر الحاق با سیگنال پپتید مذکور، به فضای خارج سلولی ترشح گردید. با توجه به پیچیدگی فرآیند ترشح در E.coli پیشنهاد می‌شود از راه‌کارهای پیشرفته‌تری جهت بهینه‌سازی فرآیند ترشح و افزایش کارایی آن استفاده شود. انتخاب یک Signal sequence بهینه برای کارایی بهتر تولید ترشحی پروتئین نوترکیب مهم می‌باشد(۱۶)، بنابراین می‌توان از سایر سیگنال پپتیدها مانند phoA, OmpA استفاده کرد. سویه E.coli، میزبان و نوع پروتئینی که ترشح خواهد شد نیز بر کارایی ترشح تأثیرگذار است.

تا امروز هیچ قاعده و روش عمومی برای انتخاب Signal sequence مناسب برای یک پروتئین مشخص که تضمین کننده ترشح موفقیت‌آمیز آن باشد، وجود ندارد. چندین Signal sequence بایستی به روش آزمون- خطا آزمایش شوند تا مناسب‌ترین آن‌ها انتخاب گردد(۱۵). استفاده از سویه‌های دیگر E.coli نیز راهکار دیگری است که پیشنهاد می‌شود. به علت محدودیت در پروتئین‌های مؤثر در ترشح که باعث محدودیت در میزان ترشح می‌شود، استفاده از راهکارهایی که باعث Overproduction اجزای سیستم ترشحی مانند SecA می‌شود، نیز می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در صورتی که ترشح و آزادسازی پروتئین به فضای خارج سلولی

مورد نظر باشد می‌توان از راهکارهای دیگری نیز استفاده کرد.

مثلاً با افزایش نفوذپذیری غشای خارجی به روش‌های مکانیکی (اولتراسوند)، شیمیایی (با اضافه کردن منیزیوم، کلسیم، EDTA، گلایسین و Triton X-100) و یا آنزیمی (توسط لیزوزیم) می‌توان به نتیجه رسید. ترشح خارج سلولی همچنین به وسیله تغییر پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مانند دما، اجزای محیط کشت، pH و هوادهی افزایش می‌یابد. روش پیشنهادی دیگر، استفاده از سویه‌هایی است که در ساخت غشای سلول نقص دارند. معروف‌ترین مثال در این مورد استفاده از باکتری‌های L-Form می‌باشد.

References

1. Corral-Rodriguez MA, Macedo-Ribeiro S, Pereira PJ, Fuentes-Prior P. Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical application. J Med Chem 2010; 53(10): 3847-3861.
2. Samama MM. Once upon a time there was hirudin. Presse Med 1998; 27(suppl 2): 5-6.
3. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherchia Coli. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(5): 411-421.
4. Vanholder R, Dhondt A. Recombinant hirudin: clinical pharmacology and potential applications in nephrology. Bio Drugs 1999; 11(6): 417-429.
5. Minigh J. Desirudin. Medical communication consultants. 2007. p. 1-3.
6. Bagdy D, Barabas E, Graf L. Hirudin Methods Enzymol. 1976; 45: 669-678.
7. Cao S, Zhang Y, Liu F, Qin W, Zhang Q, Liu Q, et al. Secretory expression and purification of recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit and its applications on intranasal vaccination of hantavirus. Mol Biotechnol 2009; 41(2): 91-98.
8. Markwardt F. Isolation and chemical characterization of hirudin. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1957; 308(2-4): 147-156.
9. Weiss AA, Stenson TH. DsbA and DsbC are required for secretion of pertussis toxin by bordetella pertussis. Infect Immun 2002; 70(5): 2297-2303.
10. Tan S, Wu W, Liu J, Kong Y, Pu Y, Yuan R. Efficient expression and secretion of recombinant HirudinIII in E. coli using the L-asparaginase II signal sequence. Protein Expr Purif 2002; 25(3): 430-434.
11. Lord RV, Park JM, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Oberg S, Salonga D, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgey 2003; 125(2): 7-9.
12. Tan S, Wu W, Li X, Cui L, Li B, Ruan Q. Enhanced secretion of adhesive recognition sequence containing hirudin III mutein in E.coli. Mil Biotechnol 2007; 36(1): 1-8.
13. Rinas U, Hoffmann F, Betiku E, Estape D, Marten S. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in Escherichia coli. J Biotechnol 2007; 127(2): 244-257.
14. Schrodel A, Volz J, de Marco A. Fusion tags and chaperone co-expression modulate both the solubility and the inclusion body features of the recombinant CLIPB14 serine protease. J Biotechnol 2005; 120(1): 2-10.

15. Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64(5): 625-635.
16. Brautaset T, Sletta H, Tøndervik A, Hakvåg S, Vee Aune TE, Nedal A, et al. The Presence of N-Terminal Secretion Signal Sequences Leads to Strong Stimulation of the Total Expression Levels of Three Tested Medically Important Proteins during High-Cell-Density Cultivations of Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 2007; 73(3): 906-912.
17. Yakhchali B, Hemmat J, Khajeh Kh, M.Movahedi A, Karkhane A. Overexpression of full-length core protein of hepatitis C virus by Escherichia coli cultivated in stirred tank fermentor. Iranian Journal of Biotechnology 2011; 9(4): 245-252
18. Dodt J, Schmitz T, Schgfer T, Bergmann C. Expression, secretion and processing of hirudin in E.coli using the alkaline phosphatase signal sequence. FEBS Lett 1986; 202(2): 374-376.