همسانه‌سازی ژن و بیان دُمین عملکردی ترومبوپویتین به‌صورت محلول با به‌کارگیری میزبان بیانی رزتاگامی

محمد مرادی[۱]، کامران عطاردی[۲]
مهشید محمدی‌پور[۱]، کامران موسوی حسینی[۱*]

۱- گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.
۲- گروه هماتولوژی، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون.
تلفن: ۸۲۰۵۲۱۶۰-۰۲۱
E-mail: mkmousavi@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۲۶ ویرایش: ۱۳۹۶/۱۲/۰۳ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۱۷ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۶/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: پروتیین ترومبوپویتین یک سایتوکین مهم است که در تنظیم تکثیر سلول‌های بنیادی‌خون‌ساز و تمایز مگاکاریوسیت‌ها دخیل است. به‌دلیل مقدار اندک این پروتیین در خون، در بسیاری از مراکز بیوتکنولوژی این پروتیین به‌صورت نوترکیب تولید می‌شود. هدف از این مطالعه همسانه‌سازی و بیان ژن این پروتیین بود.

روش بررسی: این مطالعه تجربی آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات انتقال خون تهران، از مرداد ۱۳۹۵ تا شهریور ۱۳۹۶ انجام گرفته است. سلول‌های رده سلولی HepG2 کشت و از آن‌ها RNA جهت الگوی سنتز cDNA استخراج شد. cDNA به‌عنوان الگوی واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قرار گرفت و توالی رمزکننده‌ی دُمین (Domain) عملکردی ترومبوپویتین جداسازی و وارد پلاسمید pET32 شد. وکتور نوترکیب با استفاده از روش ختم زنجیره توالی‌یابی و سپس وکتور نوترکیب به سویه‌ی بیانی رزتاگامی تلقیح شد. القای بیان پروتیین با استفاده از مقادیر مناسب Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) انجام گرفت. باکتری بیان‌کننده تهیه شده، تحت آزمون وسترن بلات قرار گرفت.

یافته‌ها: با خوانش توالی وکتور نوترکیب، حضور توالی ژن ترومبوپویتین تایید شد. القای بیان، ارزیابی پروتیین کل سلول حاکی از بیان پروتیین هدف به‌صورت محلول در فضای سیتوپلاسمی بود. جایگاه قرارگیری باندهای مربوط به توالی مورد انتظار در ژل پلی‌آکریل آمید و واکنش انجام گرفته با آنتی‌بادی‌های آنتی‌هیستگ در وسترن بلات گویای درستی بیان پروتیین هدف بود.

نتیجه‌گیری: باکتری رزتاگامی توانایی بیان پروتیین نوترکیب ترومبوپویتین را به‌صورت محلول دارد. با این روش می‌توان با استفاده از سیستم پربازده باکتریایی، پروتیین نوترکیبی تولید نمود که به‌صورت انکلوزیون‌بادی نبوده و مستلزم مراحل بازپردازی نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: سایتوکین‌ها، سلول‌های بنیادی خون‌ساز، ترومبوپویتین.

مقدمه

ترومبوپویتین که همچنین به لیگاند c-MPL و Megakaryocyte growth and development factor (MGDF) نیز معروف است، یک سایتوکین کلیدی است که سبب تنظیم تولید پلاکت می‌شود.[۱] این فاکتور سبب تولید، تمایز و بلوغ سلول‌های اجدادی مگاکاریوسیت شده و برای حفظ سطح نرمال ترمبوپویزیس ضروری می‌باشد. ترومبوپویتین همچنین سبب اتصال پلاکت‌ها به ماتریکس خارج سلولی و تجمع و فعال‌سازی آن‌ها نیز می‌شود.[۲]

صرف‌نظر از از تأثیر این سایتوکین بر مگاکاریوسیت‌ها، حذف این پروتیین باعث حذف عملکرد سلول‌های پروژنیتور و سلول‌های بنیادی خون‌ساز در تبدیل به رده‌های میلوییدی و اریتروییدی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

می‌شود.[۳] ترومبوپویتین در حفظ تعداد سلول‌های بنیادی خون‌ساز و توانایی بسط آن‌ها پس از پیوند نیز تأثیر دارد.[۲] این پروتیین همچنین دارای اثر تقویتی با اریتروپویتین، اینترلوکین-۳، SCF و FLT-3 بوده و سبب گسترش کلون‌های اریتروییدی شده و بر رده‌ی مگاکاریوسیت‌ها نیز اثر تقویتی دارد.[٤]

منابع اصلی تولید ترومبوپویتین در بدن کبد (هپاتوسیت‌ها)، کلیه (سلول‌های توبولار)، مغز استخوان و طحال می‌باشد. البته بیان ژن این پروتیین همچنین در ماهیچه‌های اسکلتی، تخمدان، بیضه و ریه‌ی جنین نیز دیده شده است.[۵] مشاهده شده است که میزان ترومبوپویتین خون وابسته به تعداد پلاکت می‌باشد یعنی یک بازخورد منفی وجود دارد و با کاهش تعداد پلاکت‌ها میزان ترومبوپویتین خون افزایش می‌یابد.[٤] بر خلاف دیگر پروتیین‌های خونی که بوسیله پالایش پلاسما قابل استحصال است، به‌علت میزان بسیار ناچیز این پروتیین در خون باید آن را به روش نوترکیب تهیه نمود.[۱۱-٦] در مطالعات پیشین نشان داده شده است که با حذف امکان گلیکوزیلاسیون در سایت عملکردی این پروتیین اختلالی در عملکرد آن حاصل نشده است.[۱۲] با توجه به این موضوع می‌توان از میزبان بیانی باکتری استفاده نمود ولی از طرفی برای عملکرد صحیح این پروتیین حضور باندهای دی سولفیدی لازم می باشند.[۵]

ژن کدکننده‌ی این پروتیین بر روی کرموزوم ۳ ناحیه q27 قرار دارد. این ژن از پنج اگزون تشکیل شده که بین ژن هایکودرین و RNA پلیمراز II واقع شده است. این پروتیین دارای واریانت‌های برشی هفت مختلفی (پنج واریانت اصلی) می‌باشد که از نظر عملکردی مشابه بوده و در بافت‌ها و موجودات مختلف محافظت شده می‌باشد.[۱۳] ترومبوپویتین عملکرد خود را از طریق واکنش خود با رسپتور c-MPL که یک پروتیین غشایی با همولوژی مشابه با رسپتور سایتوکین تیپ ۱ است، انجام می‌دهد.[۱٤] این پروتیین از طریق واکنش با رسپتور خود منجر به فسفریلاسیون Jak-2 و راه‌اندازی مسیر Jak-Stat می‌شود و از این طریق عملکرد فیزیولوژیک خود را اعمال می‌کند.[۱۲] از مهمترین نقش‌های ترومبوپویتین می‌توان به عملکرد آن در تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز، تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز به رده‌ی میلوییدی، تنظیم مثبت آبشارهای پیام رسانی ERK1 و ERK2، تنظیم مثبت تمایز به مگاکاریوسیت‌ها و تنظیم مثبت پیام رسانی پروتیین کیناز B اشاره نمود.[۳] ترومبوپویتین همچنین می‌تواند با تحریک بیان Tie2 (گیرنده‌ی آنژیوپویتین-۱) در سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سبب اتصال این سلول‌ها در آشیانه‌های خود در مغز استخوان شده که این خود سبب افزایش امکان تکثیر سلولی و بقای سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شود.[۱۵] از کاربردهای این پروتیین می‌توان به استفاده از ترومبوپویتین در کشت Ex vivo سلول‌های هماتوپوییتیک اشاره نمود.[۱٦] ژن این پروتیین تاکنون از منابع گوناگونی کلون شده و در میزبان‌های مختلفی همسانه‌سازی و بیان شده است.[۲] در سال ۱۹۹٤ برای اولین بار این ژن توسط پنج گروه مستقل همسانه‌سازی شد.[۱۷]

هدف از این مطالعه همسانه‌سازی، بیان و تعیین شرایط بهینه برای تولید ترومبوپویتین با میزبان بیانی رزتاگامی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی می‌باشد و در مرکز تحقیقات موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون از مرداد ۱۳۹۵ تا شهریور ۱۳۹٦ با نظارت موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون صورت پذیرفته است.

رده سلولی Hep G2 از بانک سلولی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد و به منظور استخراج ژن در محیط اختصاصی (Glibco, DMEM-F12 (USA کشت داده شد. پس با استفاده از محلول YTzol Isolation of RNA (Yekta Tajhiz Azma, Tehran, Iran) و مطابق با کاردستور شرکت RNA استخراج شد. در مراحل استخراج جهت سانتریفوژ از Sigma centrifuge (Model 3K30, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) استفاده شد. از RNA استخراج شده مطابق با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) توسط Thermal cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) توالی cDNA سنتز شد.

از الگوی cDNA سنتز شده به منظور واکنش PCR استفاده شد. برای تکثیر توالی مربوطه، از پرایمرهایی که به تناسب توالی مورد نظر طراحی شده بودند و در خود جایگاه برش برای آنزیم‌های محدودکننده مناسب وکتور را داشتند، استفاده گردید. پرایمر پیشرو با جایگاه برش Nco1 CATGCCATGGTGAGCCCGGCTCCTCCTGC- 5'- 3' پرایمر پسرو با جایگاه برش Xho1:

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

5'- CCGCTCGAGGAGCTCGTTCAGTGTGAGGAC-3' به‌دلیل نبود فعالیت Proofreading در آنزیم ۱۸ (Thermo scientific, USA) Taq، پس از بهینه‌سازی شرایط دمایی، از آنزیم Pfu (Thermo scientific, USA) برای ساخت توالی ترومبوپویتین استفاده شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و باند سنتز شده از ژل استخراج شد. به منظور تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از کیت استخراج از ژل (Qiagen, Germany) استفاده شد.

به‌منظور قرارگیری توالی مدنظر در ناقل لازم بود که هم پلاسمید pET-32 و هم قطعه‌ی ژنی در جایگاه‌های اختصاصی با آنزیم‌های محدود کننده برش داده شوند. برش با آنزیم‌های محدودکننده‌ی Nco1 و Xho1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) انجام شد.

قطعات برش خورده‌ی پلاسمید طی فرآیند استخراج از ژل به وسیله کیت استخراج از ژل (Qiagen, Germany) تخلیص شد و محصول PCR ژن ترومبوپوییتین با استفاده از کیت DNA clean up (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) پاکسازی شد. به‌منظور واکنش اتصال از آنزیم T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) استفاده شد. محصول PCR و پلاسمید خطی با نسبت مولی ٤:١ مطابق با کاردستور شرکت سازنده ترکیب شدند. واکنش اتصال طی ١٦ ساعت و در دمای ٤ $^{\circ}C$ انجام شد.

مستعدسازی باکتری‌های DH5α جهت پذیرش پلاسمید نوترکیب با استفاده از روش شیمیایی معروف به روش کلسیم کلراید سرد (Merck, Germany) انجام گرفت و با استفاده از شوک دمایی تلقیح پلاسمید انجام گرفت. در مراحل مختلف فرآیند جهت سانتریفوژ از دستگاه ساخت شرکت آلمانی Sigma استفاده شد. پس از تلقیح، باکتری‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محیط کشت LB بدون آنتی‌بیوتیک قرار داده شدند و سپس به پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (Sigma, USA) منتقل شدند تا کلونی‌های پذیرنده پلازمید نوترکیب جداسازی شوند.

بررسی همسانه‌سازی به روش آزمون زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الگوی کلون‌ها انجام گرفت. از مجموع ١١ کلونی به‌دست آمده، ٦ کلونی انتخاب شدند و با استفاده از آنس به محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتقال داده شده و به‌صورت خطی کشت داده شدند و بخشی از کلون‌های انتخاب شده به‌عنوان الگوی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شدند. در مرحله بعد پلاسمید نوترکیب استفاده از کیت استخراج پلاسمید (Yekta Tajhiz Azma, Iran) و به روش Mini prep استخراج شدند. پس از استخراج پلاسمید، کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از دستگاه Epoch™ Microplate Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) مورد بررسی قرار گرفتند و پلاسمید استخراج شده با الکتروفورز در ژل ١٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده به منظور بررسی صحت همسانه‌سازی، مورد بررسی الگوی هضم آنزیمی قرار گرفتند. حامل پلاسمیدی pET32 نوترکیب حامل توالی ترومبوپویتین، با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده‌ی Xho1 و Nco1 و بر اساس کاردستور شرکت سازنده در دمای ٣٧ $^{\circ}C$، به مدت شش ساعت هضم شدند. محصول برش یافته‌ی آنزیم، در ژل آگارز ١٪ الکتروفورز شد تا صحت وجود قطعه در پلاسمید تایید گردد.

به منظور بررسی صحت همسانه‌سازی توالی نوکلئوتیدی ترومبوپویتین در وکتور pET32 (Novagen, USA)، پلازمید نوترکیب برای تعیین توالی انتخاب شد. به منظور تعیین توالی، نمونه به شرکت Bioneer, Daejeon, Korea ارسال شد و تعیین توالی با روش ختم زنجیره با استفاده از پرایمر عمومی T7 terminator انجام گرفت.[19] با استفاده از نرم‌افزار Multalin software, Version 5.4.1 (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) هم‌ردیفی با واریانت‌های مختلف ترومبوپویتین انجام شد.

پس از بررسی صحت نوترکیبی، لازم بود پلاسمید نوترکیب به باکتری رزتاگامی مستعد تلقیح شود. باکتری رزتاگامی دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (Sigma, USA)، کلرامفنیکل (Sigma, USA) و تتراسایکلین (Sigma, USA) است، پس به منظور کشت این باکتری باید این آنتی‌بیوتیک‌ها به محیط کشت LB (Luria-Bertani) اضافه شوند. مستعدسازی به‌روش شیمیایی کلسیم کلراید و تلقیح پلازمید با استفاده از شوک دمایی انجام شد.

در وکتور pET32 به دلیل وجود اپرون lac، این امکان وجود دارد که با استفاده از گالاکتوز یا آنالوگ آن Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)، القای بیان صورت پذیرد. به‌منظور القای بیان یک کشت مایع از باکتری‌های رزتاگامی تراریخته انجام

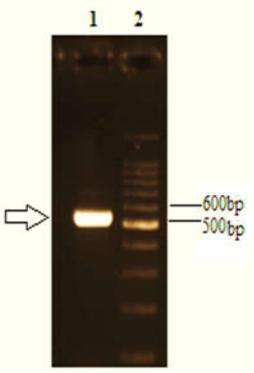
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

شد. پس از رسیدن OD به ٤/٠ در طول موج ٦٠٠ nm در خوانش با دستگاه (Shimadzu, Japan) از IPTG (Biobasic, Canada) با غلظت ۱ mmol برای القای بیان به مدت چهار ساعت استفاده شد. پس از چهار ساعت نمونه‌های باکتریایی لیز شده و از عصاره سلولی آن‌ها برای ارزیابی بیان پروتیین استفاده شد. به‌منظور لیز کردن رسوب باکتری، ابتدا به نمونه‌ها ۱۰۰ µl از بافر Tris-Hcl (Sigma, USA) افزوده شد و سپس نمونه‌ها در دستگاه Ultrasound device (UP400S, Hielscher, Germany) مورد سونیکاسیون قرار گرفتند. از عصاره‌ی باکتریایی تهیه شده به‌منظور آزمایش SDS-PAGE جهت بررسی پروتیین کل سلول استفاده شد. در این آزمایش از ژل SDS-PAGE ۱۲٪ به‌مدت زمان شش ساعت و با ولتاژ ۱۲۰ استفاده گردید.

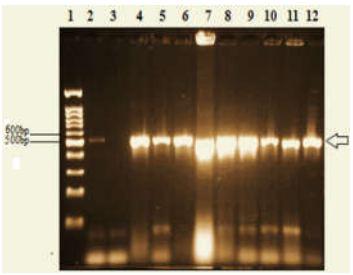
به منظور صحت وجود ترومبوپویتین نوترکیب، باندها از ژل پلی‌آکریل آمید به غشای PVDF (Roche, Germany) منتقل شده و با آنتی‌بادی مونوکلونال آنتی‌هیستگ (Sigma, USA) مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از DAB (Sigma, USA) به‌عنوان سوبسترای آنزیم Horse raddish peroxidase استفاده شد.

یافته‌ها

نتیجه آزمون الکتروفورز PCR با استفاده الگوی cDNA و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، تشکیل باندی اختصاصی در مجاورت باند ۵۰۰ جفت بازی اندازه سنج بود که با باند مورد انتظار که ۵۲۲ است، تناسب داشت (شکل ۱). پس از جداسازی و وارد نمودن باند اختصاصی به پلاسمید pET-32، محصول واکنش اتصال به باکتری DH5α به منظور تکثیر انتقال داده شد. کلونی‌های تشکیل شده مورد کشت خطی قرار گرفته شده و از کلونی‌ها به‌عنوان الگوی واکنش PCR استفاده شد. نتایج الکتروفورز (شکل ۲) نشان داد که کلونی‌های انتخاب شده قطعه ورودی را پذیرفته‌اند. به‌منظور پردازش‌های بعدی، کلونی شماره ۱ انتخاب شد. پس از تأیید پذیرش قطعه نوترکیب، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شدند و مجددا با آنزیم‌های محدودکننده Xho1 و Nco1 طی چهار ساعت برش خورده و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪، مطابق شکل ۳ الکتروفرز گردید. نتایج حاکی از وجود قطعه نوترکیب وارد شده در داخل پلاسمید بود. پس از تصدیق پذیرش قطعه نوترکیب، پلاسمید نوترکیب تعیین توالی شد و نتیجه تعیین توالی با واریانت های مختلف ترومبوپویتین مورد هم ردیفی قرار گرفت. نتیجه آزمایش نشان دهنده همسانی کامل با واریانت ۱ ترومبوپویتین بود (شکل ٤). پس از تلقیح پلاسمید نوترکیب به باکتری رزتاگامی، از باکتری‌های تراریخته کشت تازه در محیط مایع LB broth انجام گرفت. پس از القای بیان نمونه‌گیری در زمان چهار ساعت انجام شد. نمونه‌ها در دور ۱۰۰۰۰ g رسوب داده شدند و رسوب آن‌ها سونیکه شد. نمونه‌های سونیکه شده مورد آزمون SDS-PAGE قرار گرفتند. در

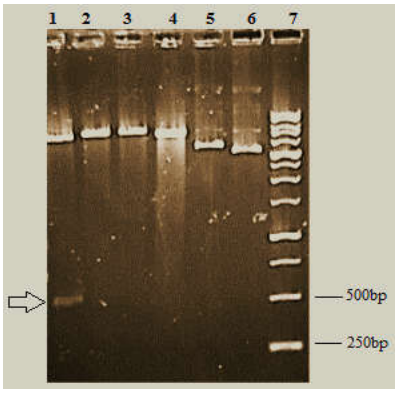


شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توالی رمزکننده‌ی ترومبوپویتین با آنزیم Pfu بر روی ژل آگارز ۲٪. به‌ترتیب ستون‌ها: ۱- محصول واکنش PCR ۲-اندازه سنج ۱۰۰ جفت بازی (پیکان محل باند ۵۲۲ جفت بازی را نمایش می‌دهد).

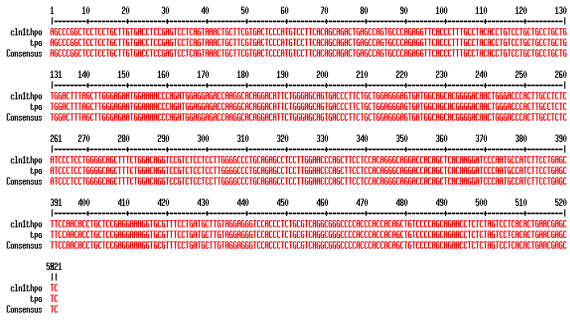


شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR ارزیابی کلونی‌های باکتری DH5α پذیرنده پلاسمید نوترکیب بر روی ژل آگارز ۲٪. در این آزمون از کلونی‌های باکتری‌های دارای پلاسمید نوترکیب حاوی ژن ترومبوپویتین به‌عنوان الگو استفاده شده است. ۱- اندازه سنج DNA، ۲-کنترل مثبت با الگوی cDNA، ۳-کنترل منفی، ٤-کلونی ۱، ٥-کلونی ۲، ٦-کلونی ۳، ۷-کلونی ٤، ۸-کلونی ٥، ۹-کلونی ٦، ۱۰-کلونی ۷، ۱۱-کلونی ۸، ۱۲-کلونی ۹ (پیکان محل باند ۵۲۲ جفت بازی را نمایش می‌دهد).

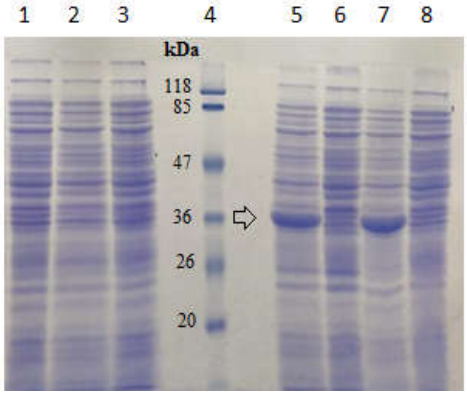
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]



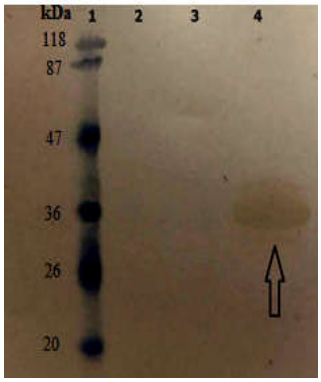
شکل ۳: آزمون برش منفرد و دوگانه‌ی پلاسمید نوترکیب. ۱- پلاسمید نوترکیب، برش دوگانه ۲-پلاسمید نوترکیب، بریده شده با Xho1، ۳- پلاسمید نوترکیب، بریده شده با Nco1، ٤- پلاسمید بدون قطعه ورودی، برش منفرد با Xho1، ٥-پلاسمید pET32، ٦-پلاسمید نوترکیب، ۷-اندازه سنج 1kb (پیکان محل باند ٥٢٢ جفت بازی را نمایش می‌دهد).



شکل ٤: هم ردیفی توالی خوانده شده ترومبوپویتین در پلاسمید نوترکیب با واریانت ۱ ترومبوپویتین در بانک ژن. Cln1thpo ژن کلون شده در این مطالعه و tpo توالی مربوط به واریانت ۱ ژن ترمبوپویتین در پایگاه بانک ژن است.



شکل ٥: الکتروفورز عصاره باکتری رزتاگامی و بررسی بیان پروتیین ترومبوپویتین. ستون ۱- عصاره رزتاگامی بدون پلاسمید نوترکیب، ۲- کلونی ۱ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پیش از القا، ۳- کلونی ۲ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پیش از القا، ٤- اندازه سنج پروتیینی، ٥- کلونی ۱ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پس از چهار ساعت القای بیان با IPTG، ٦-کلونی ۱ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پس از چهار ساعت بدون القای بیان با IPTG، ۷- کلونی ۲ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پس از چهار ساعت القای بیان با IPTG، ۸- کلونی ۱ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پس از ٤ ساعت بدون القای بیان با IPTG



شکل ٦: وسترن بلات با استفاده از سوبسترای DAB: ستون شماره ۱- اندازه سنج پروتیینی ۲- رزتاگامی بدون پلاسمید نوترکیب ۳- کلونی ۱ پیش از القا ٤-کلونی ۱ القا شده

بحث

نتیجه باند نوترکیب ۳٦ کیلودالتون (۱۹ کیلودالتون مربوط به قطعه نوترکیب و ۱۷ کیلودالتون برای برچسب‌ها) مشاهده شد. نتایج آزمون الکتروفورز مطابق شکل ٥ می‌باشد. به‌منظور بررسی صحت وجود پروتیین نوترکیب، از آزمون وسترن بلات استفاده شد (شکل ٦). روش انتقال باندها به‌صورت نیمه خشک بود. نتایج آزمون حاکی از وجود باند مربوط با پروتیین فیوژن در ۳٦ کیلودالتون بود که صحت بیان پروتیین نوترکیب را مورد تأیید قرار داد.

از دیگر محاسن این مطالعه استفاده از وکتور pET32 بود. وکتورهای pET یکی از قویترین سیستم‌ها جهت همسانه‌سازی و بیان پروتیین نوترکیب در میزبان اشریشیاکولی می‌باشند.[۲۰] محاسن استفاده از این وکتورها به این شرح است: امکان همسانه‌سازی و بیان در یک وکتور فراهم شده است و نیاز به جداسازی ژن از وکتور

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

تکثیری و انتقال آن به وکتور بیانی حذف شده است.[۲۱] بیان ژن‌های هدف در این سیستم تحت پروموتور بسیار قوی باکتریوفاژ T7 قرار دارد. T7 RNA پروموتور تا حدی انتخابی است که وقتی که فعال می‌شود، کمابیش تمام منابع سلول را به سمت تولید پروتیین نوترکیب سوق می‌دهد و پروتیین محصول تا چند ساعت پس از القای بیان در حدود نیمی از پروتیین‌های تولید شده در باکتری را به خود اختصاص می‌دهد.[۲۲] به‌دلیل وجود توالی هیستدین در این وکتورها می‌توان به راحتی پروتیین بیان شده را با ستون‌های کروماتوگرافی حاوی نیکل جداسازی نمود.[۲۲] وجود برچسب Trx•Tag نه تنها سبب می‌شود که شرایط داخل باکتری احیا شود و ایجاد باندهای دی‌سولفیدی تسهیل گردد، بلکه از بیگانه شناخته شدن توسط میزبان باکتریایی که منجر به تجزیه پروتیین نوترکیب می‌شود نیز جلوگیری می‌کند. حذف تمامی برچسب پس از تخلیص با آنزیم انتروکیناز میسر می‌باشد. در تولید ترومبوپویتین نوترکیب در میزبان باکتری نیز محصول ابتدا به‌صورت فیوژن تولید شده و پس از تخلیص، قطعات برچسب بریده شدند.[۲۳] اگرچه امکان تهیه پروتیین‌های مختلف خونی با پالایش پلاسما میسر می‌باشد، ولیکن به‌دلیل مقدار بسیار اندک پروتیین ترومبوپویتین در خون تخلیص آن با پالایش خون امکان‌پذیر نمی‌باشد و از این‌رو تولید به‌روش نوترکیب مدنظر می‌باشد.[۲۹-۲۴] تولید نوترکیب ترومبوپویتین با روش گفته شده می‌تواند بسیار مقرون به صرفه باشد، زیرا بازده سیستم باکتریایی در این روش بسیار بالا نشان داده شد و همچنین محصول تولید شده نیز به‌صورت محلول می‌باشد و از نیاز به بازپردازی انکلوزیون‌بادی‌ها جلوگیری گردید. وجود برچسب‌ها نیز به تشخیص و تخلیص پروتیین نوترکیب تولید شده کمک می‌کند که استفاده از روش‌های پرهزینه و کم بازده مانند استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی را رفع می‌کند.[۳۰و۳۱]

این مطالعه به‌کمک استفاده از میزبان بیانی رزتاگامی صورت پذیرفت. این میزبان بیانی یکی از سویه‌های مهندسی شده‌ی مشتق از باکتری اشریشیاکولی است که می‌توان گفت آمیزه‌ای از دو سویه رزتا و اریگامی به حساب می‌آید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "همسانه‌سازی و بیان ژن دُمین عملکردی ترومبوپویتین با استفاده از سیستم باکتریایی اشریشیاکولی" در مقطع کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی در سال ۱۳۹۶ و کد ۱۹۲۸ می‌باشد که با حمایت مرکز تحقیقات انتقال خون، موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون اجرا شده است.

References

1. de Graaf CA, Metcalf D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 2011;10(10):1582-9.
2. Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Månsson R, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2007;1(6):671-84.
3. de Laval B, Pawlikowska P, Barbieri D, Besnard-Guerin C, Cico A, Kumar R, et al. Thrombopoietin promotes NHEJ DNA repair in hematopoietic stem cells through specific activation of Erk and NF-κB pathways and their target, IEX-1. *Blood* 2014;123(4):509-19.
4. Ninos JM, Jefferies LC, Cogle CR, Kerr WG. The thrombopoietin receptor, c-Mpl, is a selective surface marker for human hematopoietic stem cells. *J Transl Med* 2006;4:9.
5. Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997;89(1):101-7.
6. Mousavi Hosseini K, Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production. *Iran J Biotechnol* 2016;14(4):213-20.
7. Mousavi Hosseini K, Nikougoftar Zarif M. Preparation of plasminogen by affinity chromatography. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(4):163-67.
8. Mousavi Hosseini K, Rezvan H, Motallebi Z, Chabokpey S, Mirbod V. Study of the heat treated human albumin stabilization by caprylate and acetyltryptophanate. *Iran Biomed J* 2002;6(4):135-40.
9. Mousavi Hosseini K, Dinarvand R, Pourmokhtar M, Rezvan H, Jalili MA. Pasteurization of IgM-enriched immunoglobulin. *DARU* 2004;12(1):40-3.
10. Mahmoodian Shooshtari M, Mousavi Hosseini K. Evaluation of the plasma quality after filtration. *DARU* 2010;18(2):114-7.
11. Mousavi Hosseini K, Pourmokhtar M, Jalili MA, Nasiri S. Immunoglobulin A preparation from human pooled plasma using plasma fractionation and ion exchange chromatography. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(2):75-9.
12. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, et al. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77(7):1117-24.
13. Chang MS, McNinch J, Basu R, Shutter J, Hsu RY, Perkins C, et al. Cloning and characterization of the human megakaryocyte growth and development factor (MGDF) gene. *J Biol Chem* 1995;270(2):511-4.
14. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369(6481):533-8.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

15. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118(2):149-61.
16. Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest* 2002;110(3):389-94.
17. Gurney AL, Kuang WJ, Xie MH, Malloy BE, Eaton DL, de Sauvage FJ. Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 1995;85(4):981-8.
18. Shibata S, Tanizaki R, Watanabe K, Makabe K, Shoda N, Kutsuna S, et al. Escherichia coli Vertebral Osteomyelitis Diagnosed According to Broad-range 16S rRNA Gene Polymerase Chain Reaction (PCR). *Intern Med* 2015;54(24):3237-40.
19. Graham CA, Hill AJM, editors. DNA Sequencing Protocols. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2001.
20. Chen BP, Hai T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using Escherichia coli as host. *Gene* 1994;139(1):73-5.
21. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1977;2(2):95-113.
22. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990;185:60-89.
23. Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(8):1103-9.
24. Mousavi Hosseini K, Pourmokhtar M, Habibi Roudkenar M, Shahabi M. Human plasma derived drugs separation by fractionation of plasma with polyethylene glycol. *Iran J Biotechnol* 2014; 12(3):82-85.
25. Yari F, Mousavi Hosseini K. Simultaneous purification and polymerization method for bovine serum albumin preparation. *Ital J Biochem* 2007;56(2):163-5.
26. Nasiri S, Mousavi Hosseini K. Infusible platelet Membrane versus conventional platelet Concentrate: Benefits and disadvantage. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(2):8793.
27. Mousavi Hosseini K, Heidari M, Yari F. The preparation of albumin as a biological drug from human plasma by fiber filteration. Tehran Univ Med J 2011;69(5):283-8.
28. Pourmokhtar M, Dinarvand R, Mousavi Hosseini K, Rezvan H, Jalili MA. Solvent-detergent treatment of IgM-enriched immunoglobulin. *DARU* 2003;11(2):47-51.
29. Mousavi Hosseini K, Nasiri S, Heidari M. Separation of albumin from the human plasma by ethanol and low temperature. J Zanjan Univ Med Sci 2013;21(85):74-84.
30. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 1999;17(10):1030-2.
31. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif* 2005;41(1):98-105.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]

TUMJ Tehran University Medical Journal, September 2018; Vol. 76, No. 6: 388-395 Original Article

Gene cloning and expression of soluble thrombopoietin functional domain by harnessing Rosetta-gami expression system

Mohammad Moradi M.Sc.[1]
Kamran Atarodi Ph.D.[2]
Mahshid Mohammadipour Ph.D.[1]
Kamran Mousavi Hosseini Ph.D.[1*]

1- Department of Biotechnology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.
2- Department of Haematology, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 82052160
E-mail: mkmousavi@yahoo.com

Abstract

Received: 15 Feb. 2018 Revised: 22 Feb. 2018 Accepted: 08 Sep. 2018 Available online: 18 Sep. 2018

Background: Thrombopoietin (TPO) is an important cytokine that has a critical role in regulating hematopoietic stem cells (HSCs) proliferation and megakaryocyte differentiation. Because of scares amount of this protein in human plasma, in many biotechnological centers around the world, recombinant production of this protein has been carried out. This study was aiming to gene cloning and expression of recombinant thrombopoietin.

Methods: This research is an experimental laboratory study carried out in Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran, from July 2016 to August 2017. At the beginning HepG2 cell line was cultured and RNA extraction was performed. Extracted RNA was used as template for cDNA synthesis and subsequently the synthesized cDNA was adopted to isolate TPO gene through polymerase chain reaction (PCR) reaction using designed primers. After isolating the TPO sequence from HepG2 cell line, the designated sequence was inserted into pET32 vectors. Recombinant plasmid was amplified by meriting from DH5α replicating system. The amplified plasmids were sequenced via chain termination method. Next step was transforming the recombinant plasmid into Rosetta-gami bacteria to express the recombinant protein. In order to induce protein expression, an appropriate amount of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to growth media, then bacterial lysate of expression host was prepared and assayed via polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting test.

Results: After sequencing of recombinant plasmid, it was confirmed that TPO sequence has been successfully colonized in adopted vector. Subsequent to induction of recombinant protein, total cell protein analysis affirmed that recombinant protein has been expressed in its soluble form at cytoplasmic condition. Location of expected recombinant protein band on polyacrylamide gel and reaction of recombinant protein with His-tag monoclonal antibody at western blotting was asserting that expressed protein is the one of interest.

Conclusion: Rosetta-gami bacteria has capability of expressing recombinant thrombopoietin in its soluble form. By harnessing this method of recombinant protein expression, it would be possible to take advantage of high throughout bacterial expression system which would not produce inclusion body and its product doesn't need further processing and refolding.

Keywords: cytokines, hematopoietic stem cells, thrombopoietin.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-22]