

همسانه‌سازی ژن و بیان دُمین عملکردی ترومبوپویتین به صورت محلول با به کارگیری میزبان بیانی رزتاگامی

چکیده

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

زمینه و هدف: پروتئین ترومبوپویتین یک سایتوکین مهم است که در تنظیم تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز و تمایز مگاکاریوسیت‌ها دخیل است. به دلیل مقدار اندک این پروتئین در خون، در بسیاری از مراکز بیوتکنولوژی این پروتئین به صورت نوترکیب تولید می‌شود. هدف از این مطالعه همسانه‌سازی و بیان ژن این پروتئین 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 به عنوان الگوی واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قرار گرفت و توالی رمزکننده 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 پروتئین 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 پروتئین کل سلول حاکی از بیان پروتئین هدف به صورت 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 پروتئین هدف بود.

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

کلمات کلیدی: سایتوکین‌ها، سلول‌های بنیادی خون‌ساز، ترومبوپویتین.

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: ۰۲۱-۸۲۰۵۲۱۶۰

E-mail: mkmousavi@yahoo.com

مقدمه

شده و برای حفظ سطح نرمال ترومبوپوئیزیس ضروری می‌باشد. ترومبوپویتین همچنین سبب اتصال پلاکت‌ها به ماتریکس خارج سلولی و تجمع و فعال‌سازی آن‌ها نیز می‌شود.^۲ صرف‌نظر از تأثیر این سایتوکین بر مگاکاریوسیت‌ها، حذف این پروتئین باعث حذف عملکرد سلول‌های پروژنیاتور و سلول‌های بنیادی خون‌ساز در تبدیل به رده‌های میلویدی و اریتروییدی

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

تحریک بیان Tie2 (گیرنده‌ی آنژیوپوئین-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 پروتئین می‌توان به استفاده از ترومبوپوئین در کشت Ex vivo سلول‌های هماتوپوئیتیک اشاره نمود.^{۱۶} ژن این پروتئین تاکنون از منابع گوناگونی کلون شده و در میزبان‌های مختلفی همسانه‌سازی و بیان شده است.^۲ در سال ۱۹۹۴ برای اولین بار این ژن توسط پنج گروه مستقل همسانه‌سازی شد.^{۱۷}

هدف از این مطالعه همسانه‌سازی، بیان و تعیین شرایط بهینه برای تولید ترومبوپوئین 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 ۱۳۹۶ 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 (Gibco, DMEM-F12 USA) کشت داده شد. پس با استفاده از محلول (YTzol Isolation of RNA (Yekta Tajhiz Azma, Tehran, Iran) و مطابق با کار دستور شرکت استخراج RNA استخراج شد. در مراحل استخراج جهت سانتریفیوژ از Sigma centrifuge (Model 3K30, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, USA) استفاده شد. از RNA استخراج شده مطابق با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرزای 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 و کتور را داشتند، استفاده گردید. پرایمر پیشرو با جایگاه برش Nco1 CATGCCATGGTGAGCCCGGCTCCTCTGCG-3' پرایمر پسرو با جایگاه برش Xho1

می‌شود.^۳ ترومبوپوئین در حفظ تعداد سلول‌های بنیادی خون‌ساز و توانایی بسط آن‌ها پس از پیوند نیز تأثیر دارد.^۲ این پروتئین همچنین دارای اثر تقویتی با اریتروپوئین، اینترلوکین-۳، SCF و FLT-3 بوده و سبب گسترش کلون‌های اریترویدی شده و بر رده‌ی مگاکاریوسیت‌ها نیز اثر تقویتی دارد.^۴

منابع اصلی تولید ترومبوپوئین در بدن کبد (هپاتوسیت‌ها)، کلیه (سلول‌های توبولار)، مغز استخوان و طحال می‌باشد. البته بیان ژن این پروتئین همچنین در ماهیچه‌های اسکلتی، تخمدان، بیضه و ریه‌ی جنین نیز دیده شده است.^۵ مشاهده شده است که میزان ترومبوپوئین خون وابسته به تعداد پلاکت می‌باشد یعنی یک بازخورد منفی وجود دارد و با کاهش تعداد پلاکت‌ها میزان ترومبوپوئین خون افزایش می‌یابد.^۴ بر خلاف دیگر پروتئین‌های خونی که بوسیله پلازما قابل استحصال است، به‌علت میزان بسیار ناچیز این پروتئین در خون باید آن را به روش نوترکیب تهیه نمود.^{۶-۱۱} در مطالعات پیشین نشان داده شده است که با حذف امکان گلیکوزیلاسیون در سایت عملکردی این پروتئین 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 پروتئین حضور باندهای دی سولفیدی لازم می‌باشند.^۵

ژن کدکننده‌ی این پروتئین بر روی کرموزوم ۳ ناحیه q27 قرار دارد. این ژن از پنج اگزون تشکیل شده که بین ژن هایکوادرین و RNA پلیمرز II واقع شده است. این پروتئین 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} ترومبوپوئین عملکرد خود را از طریق واکنش خود با رسپتور c-MPL که یک پروتئین غشایی با همولوژی مشابه با رسپتور سایتوکین تیب ۱ است، انجام می‌دهد.^{۱۴} این پروتئین 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.^{۱۵} از مهمترین نقش‌های ترومبوپوئین می‌توان به عملکرد آن در تکثیر سلول‌های بنیادی خون‌ساز، تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز به رده‌ی میلویدی، تنظیم مثبت آبشارهای پیام‌رسانی ERK1 و ERK2، تنظیم مثبت تمایز به مگاکاریوسیت‌ها و تنظیم مثبت پیام‌رسانی پروتئین کیناز B اشاره نمود.^۳ ترومبوپوئین همچنین می‌تواند با

زنجیره‌ای پلیمرز 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 ۱٪ 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 ترومبوپوتین، با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده Xho1 و Nco1 و بر اساس کاردستور شرکت سازنده در دمای ۳۷ °C، به مدت شش ساعت هضم شدند. محصول برش یافته‌ی آنزیم، در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد تا صحت وجود قطعه در پلاسمید تایید گردد.

به منظور بررسی صحت همسانه‌سازی توالی نوکلئوتیدی ترومبوپوتین 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. ۱۹ با استفاده از نرم‌افزار Multalin software, Version 5.4.1 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) هم‌ردیفی با واریانت‌های مختلف ترومبوپوتین 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 dac این امکان وجود دارد که با استفاده از گالاتوز یا آنالوگ آن Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) القای بیان صورت پذیرد. به‌منظور القای بیان یک کشت مابعد از باکتری‌های رزتاگامی تراریخته انجام

۵'-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 ترومبوپوتین استفاده شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شده و باند سنتز شده از ژل استخراج شد. به منظور تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 Xho1 و Nco1 (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 ترومبوپوتین 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 ۱:۴ مطابق با کاردستور شرکت سازنده ترکیب شدند. واکنش اتصال طی ۱۶ ساعت و در دمای ۴ °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.

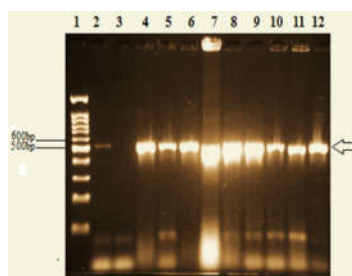
بررسی همسانه‌سازی به روش آزمون زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از الگوی کلون‌ها انجام گرفت. از مجموع ۱۱ کلونی به‌دست آمده، ۶ کلونی انتخاب شدند و با استفاده از آنس به محیط LB Agar حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتقال داده شده و به‌صورت خطی کشت داده شدند و بخشی از کلون‌های انتخاب شده به‌عنوان الگوی واکنش

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 مجدداً با آنزیم‌های محدودکننده Nco1 و Xho1 طی چهار ساعت برش خورده و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٪ مطابق شکل ۳ الکتروفورز 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 واریانت‌های مختلف ترومبوپویتین مورد هم‌ردیفی قرار گرفت. نتیجه آزمایش نشان دهنده همسانی کامل با واریانت ۱ ترومبوپویتین بود (شکل ۴). 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

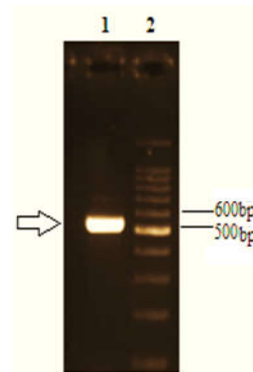
شد. پس از رسیدن OD به ۴/۰ در طول موج ۶۰۰ nm در خوانش با دستگاه Shimadzu, Japan) از IPTG (Biobasic, Canada) با غلظت ۱ mmol برای القای بیان به مدت چهار ساعت استفاده شد. پس از چهار ساعت نمونه‌های باکتریایی لیز شده و از عصاره سلولی آن‌ها برای ارزیابی بیان پروتئین استفاده شد. به‌منظور لیز کردن رسوب باکتری، 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 عصاره باکتریایی تهیه شده به‌منظور آزمایش SDS-PAGE جهت بررسی پروتئین 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 سوپسترای آنزیم Horse raddish peroxidase استفاده شد.

یافته‌ها

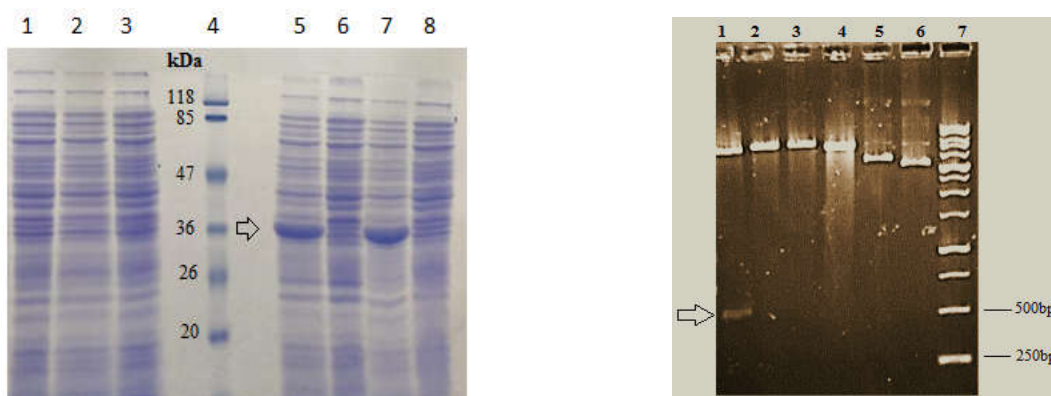
نتیجه آزمون الکتروفورز PCR با استفاده الگوی cDNA و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، تشکیل باندهای اختصاصی در



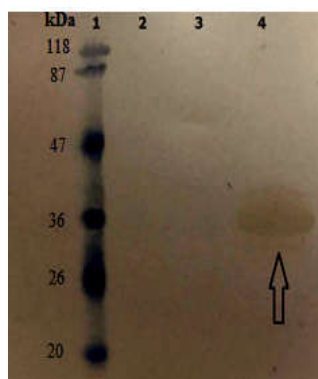
شکل ۲: الکتروفورز محصولات PCR ارزیابی کلونی‌های باکتری DH5α پذیرنده پلاسمید نوترکیب بر روی ژل آگارز ۲٪. در این آزمون از کلونی‌های باکتری‌های دارای پلاسمید نوترکیب حاوی ژن ترومبوپویتین به‌عنوان الگو استفاده شده است. ۱- اندازه سنج DNA. ۲- کنترل مثبت با الگوی cDNA. ۳- کنترل منفی. ۴- کلونی ۱، ۵- کلونی ۲، ۶- کلونی ۳، ۷- کلونی ۴، ۸- کلونی ۵، ۹- کلونی ۶، ۱۰- کلونی ۷، ۱۱- کلونی ۸، ۱۲- کلونی ۹ (پیکان محل باند ۵۲۲ جفت بازی را نمایش می‌دهد).



شکل ۱: الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توالی رمزکننده 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).

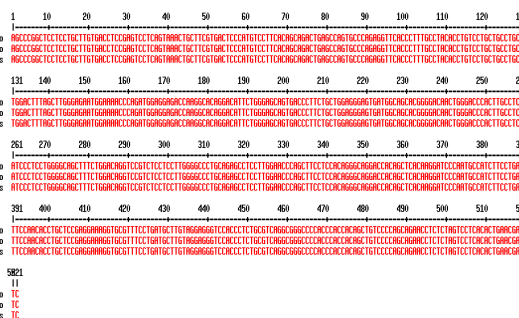


شکل ۵: الکتروفورز عصاره باکتری رزتاگامی و بررسی بیان پروتئین ترومبوپویتین. ستون ۱- عصاره رزتاگامی بدون پلاسمید نوترکیب، ۲- کلونی ۱ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پیش از القا، ۳- کلونی ۲ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پیش از القا، ۴- اندازه سنج پروتئینی، ۵- کلونی ۱ رزتاگامی دارای پلاسمید نوترکیب پس از چهار ساعت القای بیان با IPTG ۶-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 ۴ ساعت بدون القای بیان با IPTG



شکل ۶: وسترن بلات با استفاده از سوبسترای DAB. ستون شماره ۱- اندازه سنج پروتئینی ۲- رزتاگامی بدون پلاسمید نوترکیب ۳- کلونی ۱ پیش از القا ۴- کلونی ۱ القا شده

شکل ۳: آزمون برش منفرد و دوگانه‌ی پلاسمید نوترکیب. ۱- پلاسمید نوترکیب، برش دوگانه ۲- پلاسمید نوترکیب، بریده شده با XhoI ۳- پلاسمید نوترکیب، بریده شده با NcoI، ۴- پلاسمید بدون قطعه ورودی، برش منفرد با XhoI ۵- پلاسمید pET32، ۶- پلاسمید نوترکیب، ۷- اندازه سنج ۱kb (پیکان محل باند ۵۲۲ جفت بازی را نمایش می‌دهد).



شکل ۴: هم ردیفی توالی خوانده شده ترومبوپویتین در پلاسمید نوترکیب با واریانت ۱ ترومبوپویتین در بانک ژن. ClnI1thpo ژن کلون شده در این مطالعه و tpo توالی مربوط به واریانت ۱ ژن ترومبوپویتین در پایگاه بانک ژن است.

بحث

از دیگر محاسن این مطالعه استفاده از وکتور pET32 بود. وکتورهای pET یکی از قویترین سیستم‌ها جهت همسانه‌سازی و بیان پروتئین 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

نتیجه باند نوترکیب ۳۶ کیلودالتون (۱۹ کیلودالتون مربوط به قطعه نوترکیب و ۱۷ کیلودالتون برای برجسب‌ها) مشاهده شد. نتایج آزمون الکتروفورز مطابق شکل ۵ می‌باشد. به‌منظور بررسی صحت وجود پروتئین نوترکیب، از آزمون وسترن بلات استفاده شد (شکل ۶). روش انتقال باندها به‌صورت نیمه خشک بود. نتایج آزمون حاکی از وجود باند مربوط با پروتئین فیوزن در ۳۶ کیلودالتون بود که صحت بیان پروتئین نوترکیب را مورد تأیید قرار داد.

تولید به روش 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 به صورت محلول می‌باشد و از نیاز به بازپردازی انکلوژیون‌بادی‌ها جلوگیری گردید. وجود برچسب‌ها نیز به تشخیص و تخلیص پروتئین نوترکیب تولید شده کمک می‌کند که استفاده از روش‌های پرهزینه و کم بازده مانند استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی را رفع می‌کند.^{۳۰،۳۱}

این مطالعه به کمک استفاده از میزبان بیانی رزتاگامی صورت پذیرفت. این میزبان بیانی یکی از سویه‌های مهندسی شده‌ی مشتق از باکتری اشیریشیاکولی 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 اشیریشیاکولی" 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.

تکثیری و انتقال آن به وکتور بیانی حذف شده است.^{۳۱} 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 پروتئین نوترکیب سوق می‌دهد و پروتئین محصول تا چند ساعت پس از القای بیان در حدود نیمی از پروتئین‌های تولید شده در باکتری را به خود اختصاص می‌دهد.^{۳۲} به دلیل وجود توالی هیستدین در این وکتورها می‌توان به راحتی پروتئین بیان شده را با ستون‌های کروماتوگرافی حاوی نیکل جداسازی نمود.^{۳۳} 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 پروتئین 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 به صورت فیوژن تولید شده و پس از تخلیص، قطعات برچسب بریده شدند.^{۳۳} اگرچه امکان تهیه پروتئین‌های مختلف خونی با پالایش پلاسما میسر می‌باشد، ولیکن به دلیل مقدار بسیار اندک پروتئین ترومبوپویتین در خون تخلیص آن با پالایش خون امکان‌پذیر نمی‌باشد و از این رو

References

- de Graaf CA, Metcalf D. Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 2011;10(10):1582-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mousavi Hosseini K, Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production. *Iran J Biotechnol* 2016;14(4):213-20.
- Mousavi Hosseini K, Nikougoftar Zarif M. Preparation of plasminogen by affinity chromatography. *Iran J Blood Cancer* 2014;6(4):163-67.
- 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.
- Mousavi Hosseini K, Dinarvand R, Pourmokhtar M, Rezvan H, Jalili MA. Pasteurization of IgM-enriched immunoglobulin. *DARU* 2004;12(1):40-3.
- Mahmoodian Shoostari M, Mousavi Hosseini K. Evaluation of the plasma quality after filtration. *DARU* 2010;18(2):114-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

15. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuka 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 filtration. *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 Zanzan 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.

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 scarce 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 DH5 α 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.