جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تحقیقی

کلونینگ و بیان اریتروپویتین نوترکیب انسانی در *Leishmania tarentolae*

انورسادات کیان مهر[۱]، حمید شهباز محمدی[۱]، دکتر اسکندر امیدی نیا*[۲]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، انستیتو پاستور ایران. ۲- دانشیار گروه تحقیقات ژنتیک و متابولیسم، انستیتو پاستور ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *پروتئین اریتروپویتین انسانی هورمونی گلیکوزیله با وزن مولکولی ٤٠ کیلو دالتون است که در کلیه سنتز شده و در تکثیر و تمایز اریتروسیت‌ها نقش دارد. این پروتئین دارویی با نام تجاری «اپویتین» شناخته شده و کاربرد موثری در درمان آنمی، سرطان و عفونت‌های ناشی از HIV ایفاء می‌کند. این مطالعه به منظور ارزیابی استفاده از میزبان انگلی لیشمانیا تارانتولا (Leishmania tarentolae) به منظور تولید فرم نوترکیب اریتروپویتین انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی ژن اریتروپویتین پس از بهینه‌سازی کدون توسط پایگاه‌های بیوانفورماتیکی سنتز شد و توسط استراتژی برش با آنزیم‌های KpnI و XbaI و خالص‌سازی از روی ژل در وکتور بیانی pLEXSY کلون گردید. سازه بیانی ساخته شده با روش الکتروپوریشن به لیشمانیا تارانتولا ترانسفکت شد. شناسایی و تایید کلونی‌های انگل ترانسفکت شده با سازه ژنی با استفاده از روش PCR با پرایمرهای تشخیصی سازه بیانی و پرایمرهای مخصوص اریتروپویتین انجام گرفت. ژن اریتروپویتین کلون شده توسط تتراسایکلین القاء گردید و بیان ژن در سوش‌های القاء شده با تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ آنالیز شد. تعیین مقدار پروتئین نوترکیب تولید شده نیز با روش ELISA انجام شد. سازه بیانی اریتروپویتین برای کلونینگ و بیان در میزبان لیشمانیا تارانتولا توسط روش‌های مهندسی ژنتیک تایید شد.*

یافته‌ها : *نتایج آنالیز بیان ژن در سوش انگل ترانسفکت شده توسط الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تایید کننده ورود سازه ژنی به کروموزم انگل و بیان اریتروپویتین بودند. بهترین شرایط بیان پروتئین نوترکیب، ۱۰ میکروگرم تتراسایکلین و زمان القاء ۷۲ ساعت بود. وزن مولکولی پروتئین بیان شده ٤٠ کیلو دالتون تخمین زده شد و میزان بیان آن نیز ۱۲/٤ میلی‌گرم در لیتر معادل با یک درصد کل پروتئین سلول تعیین گردید.*

نتیجه‌گیری : *سازه بیانی برای کلونینگ و بیان ژن اریتروپویتین در لیشمانیا تارانتولا طراحی و ساخته شد و پروتئین مذکور با موفقیت القاء و شناسایی گردید. لیشمانیا تارانتولا می‌تواند به عنوان میزبان مناسب در تولید اریتروپویتین نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد و این فناوری قابلیت بومی‌سازی نیز دارد.*

کلید واژه‌ها : *اریتروپویتین ، لیشمانیا تارانتولا ، بیان ژن ، کلونینگ*

* نویسنده مسؤول : دکتر اسکندر امیدی نیا ، پست الکترونیکی eomid8@yahoo.com

نشانی : تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه ژنتیک و متابولیسم، بخش بیوشیمی، تلفن ٦٦٩٦٩٢٩٨-٠٢١، نمابر ٦٦٤٠٢٧٧٠

وصول مقاله : ۹۲/۳/۲۸ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۷/۲ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۸/۱۱

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از پروتئین‌ها و پپتیدها به‌عنوان دارو در درمان انواع بیماری‌ها، گسترش زیادی پیدا کرده است. در حال حاضر تعداد زیادی از فرآورده‌های نوترکیب دارویی نیز تولید و مورد استفاده قرار گرفته است (۱). علی‌رغم رشد سریع در توسعه فرآورده‌های پروتئینی، مصرف آنها به دلایل مختلف مانند نیمه عمر کوتاه، نیاز به مصرف مکرر، مشکلات ایمونولوژیکی و قیمت بالا محدودیت دارد (۲). از این رو روش‌ها و استراتژی‌های مختلفی برای بهبود خصوصیات و افزایش کارایی داروهای پروتئینی به‌کار گرفته شده‌اند که مهم‌ترین آنها شامل دست‌کاری در توالی اسیدهای آمینه به‌واسطه مهندسی ژنی، وارد کردن آنها در حامل‌های دارورسانی به منظور حفاظت و همچنین کندکردن روند آزادسازی دارو و اتصال آنها به پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی نظیر پلی اتیلن گلیکول یا پلی‌سیالیک اسید است (۳و۴). یکی دیگر از روش‌های مهندسی داروها، تغییر در محتوای گلیکوپروتئینی از طریق تغییر در توالی اسیدآمینه و وارد نمودن جایگاه‌های گلیکوزیلاسیون است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کربوهیدرات‌ها می‌توانند در پایداری مولکولی، فعالیت in vivo، نیمه‌عمر سرمی، حلالیت و ایمونوژنسیته پروتئین‌های دارویی نقش داشته باشند. تغییر در میزان کربوهیدرات پروتئین‌های درمانی که به‌طور جدی مورد توجه شرکت‌های داروسازی قرار گرفته؛ مهندسی گلیکوزیلاسیون نام دارد (۵و۶). پلی‌سیاله کردن پروتئین‌ها از جمله روش‌های مهندسی گلیکوزیلاسیون است که با دو روش کونژوگاسیون به پلیمر پلی‌سیالیک اسید و یا تغییر الگوی گلیکوزیلاسیون به‌واسطه بیان در میزبانی جدید صورت می‌گیرد (۷). از جمله میزبان‌هایی که در مهندسی گلیکوزیلاسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ انگل لیشمانیا تارانتولا است. لیشمانیا تارانتولا، پروتوزوآی غیرپاتوژن است که در سال‌های اخیر در نقش میزبان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد توجه قرار گرفته است. ویژگی‌های منحصر به‌فرد این میزبان، وجود الگوی گلیکوزیلاسیون مشابه با پستانداران، کشت آسان و کم‌هزینه، هموژنسیته بالای پروتئین گلیکوزیله شده و میزان بالای بیان است (۷و۸). با توجه به خصوصیات لیشمانیا تارانتولا، این سلول میزبان هم اکنون به‌عنوان جایگزین میزبان‌های یوکاریوتی مانند CHO (Chinese Hamster Ovary) در تولید پروتئین‌های دارویی مطرح شده است. از جمله پروتئین‌های تولید شده در این میزبان می‌توان به اینترفرون گاما (۹) و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (۱۰) اشاره نمود.

اریتروپویتین انسانی هورمون بسیار گلیکوزیله با وزن ۴۰ کیلودالتون بوده و با نام تجاری «اپویتین» شناخته می‌شود. این پروتئین در کلیه‌ها سنتز شده و در تکثیر و تمایز اریتروسیت‌ها دخالت دارد. از کاربردهایی دارویی اریتروپویتین می‌توان به استفاده در درمان کم‌خونی ناشی از صدمات کلیه، سرطان و عفونت‌های ناشی از HIV اشاره نمود (۱۱). ژن کدکننده اریتروپویتین در انسان بر روی کروموزوم ۷ (7q22) قرار دارد که پروتئینی با ۱۶۵ اسیدآمینه را کد می‌کند. تعیین ساختار اریتروپویتین با استفاده از روش‌های Nuclear Magnetic Resonance (NMR) و کریستالوگرافی اشعه X نشان داده است که این هورمون، دارای ساختار پروتئینی با ۴ هلیکس چیگرد است (۱۲). کربوهیدرات‌های اریتروپویتین که از نوع اسیدسیالیک هستند؛ برای فعالیت بیولوژیکی ضروری هستند (۱۳). از این رو تلاش‌هایی نیز به منظور تولید آنالوگ‌های گلیکوزیله شده از این دارو انجام شده است که می‌توان به داربوپویتین اشاره نمود (۱۴). اریتروپویتین هم‌اکنون در میزبان CHO تولید می‌شود که از معایب عمده آن بازده پایین تولید است (۱۵).

این مطالعه به منظور ارزیابی استفاده از میزبان انگلی لیشمانیا تارانتولا (*Leishmania tarentolae*) به منظور تولید فرم نوترکیب اریتروپویتین انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی در بخش بیوشیمی گروه ژنتیک و متابولیسم انستیتو پاستور ایران طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱ انجام شد.

مواد: حامل pLEXSY و سوش انگل لیشمانیا تارانتولا از شرکت JenaBioscience آلمان تهیه شدند. آگارز Ni-NTA از شرکت QIAgen خریداری گردید. آنتی‌بادی اولیه ضداریتروپویتین و آنتی‌بادی ثانویه IgG کونژوگه شده به HRP از شرکت Abcam بودند. مواد شیمیایی استفاده شده شامل ژل پلی‌آکریل آمید از شرکت Merck آلمان و محیط کشت Luria Bertani (LB) از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شدند.

طراحی و سنتز ژن: با توجه به این که اریتروپویتین، پروتئینی با منبع انسانی است و باید در انگل لیشمانیا تارانتولا بیان شود؛ بهینه‌سازی کدون شد. انجام بهینه‌سازی کدون بر روی توالی ژن اریتروپویتین به این دلیل بود که اریتروپویتین یک پروتئین انسانی است. در حالی که میزبان انتخاب شده برای تولید فرم نوترکیب آن (لیشمانیا تارانتولا) یک تک یاخته است. لذا الگوی استفاده از کدون در تک یاخته لیشمانیا تارانتولا متفاوت از میزبان طبیعی پستاندار آن است. از این رو به‌منظور تطبیق الگوی استفاده از کدون بین توالی پروتئین موردنظر و میزبان انتخاب شده و در نهایت بهبود بیان ژن، بهینه‌سازی کدون توسط پایگاه بیوانفورماتیکی http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=5689 انجام شد. ژن اریتروپویتین مهندسی شده توسط سنتز مصنوعی تهیه و آماده گردید. ساخت ژن توسط شرکت BioNeer کره انجام شد.

ساخت سازه بیانی ژن اریتروپویتین: در ابتدا ژن مهندسی شده اریتروپویتین توسط تکنیک PCR جداسازی و تکثیر شد. جفت پرایمرهای اختصاصی طراحی شده عبارت از Epo-Forward: 5/ ATTCTAGACGCGCCGCCG 3/ و Epo-Reverse: 5/ AGGTACCGCGGTCGCCC 3/ بودند.

تکثیر PCR در حجم ۲۵ ماکرولیتر حاوی ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، بافر PCR1x، ۰/۵ ماکرولیتر از dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ میلی‌مولار، ۰/۷۵ ماکرولیتر کلریدمنیزیم با غلظت نهایی ۱/۵ میلی‌مولار، ۰/۳ میکروگرم DNA الگو و ۲/۵ واحد از DNA Taq پلی‌مراز در دستگاه ترمو سایکلر (Thermal Cycler, Eppendorf, Germany) انجام شد. محصول PCR حاصله در ژل آگاروز ۱/۵ درصد افقی آنالیز شد و پس از برش توسط آنزیم‌های KpnI و XbaI از روی ژل خالص‌سازی شد. به منظور تهیه سازه بیانی، ژن اریتروپویتین در حامل بیانی pLEXSY که توسط برش با آنزیم‌های KpnI و XbaI و نیز تیمار شدن با آنزیم آلکالین قسفاتاز خطی شده بود؛ توسط واکنش اتصال وارد گردید. پلاسمید نوترکیب ساخته شده به داخل سلول‌های مستعد E. coli Top10 ترانسفورم شد و بر روی محیط

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. تایید کلونینگ ژن مورد نظر توسط آنالیز برش با آنزیم‌های محدود اثر و توالی‌یابی انجام شد.

ترانسفکشن سازه بیانی اریتروپویتین به لیشمانیا تارانتولا : برای انتقال سازه pLEXSEPO، واجد ژن اریتروپویتین به لیشمانیا تارانتولا، ابتدا حامل pLEXSY حاوی ژن کلون شده با آنزیم SwaI برش داده شد و پس از خالص‌سازی از ژل با غلظت ۸ میکروگرم برای ترانسفکتشن آماده شد. به منظور تهیه لیشمانیا تارانتولا مستعد ترانسفکشن، سوش انگلی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI (Brain Heart Infusion) کشت داده شد و در ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سلول‌های رشد کرده در ۲۵۰۰rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب حاصله در ۲ میلی‌لیتر از بافر ترانسفکشن هموژن شد. غلظت سلول‌های انگل برای ترانسفکشن 6×10^{7} cells/ml و یا OD ۲ بود که سلول‌ها باید زنده و متحرک بوده و دوکی شکل یا دارای تاژک‌های بلند نباشند. در ادامه ۳۵۰ ماکرولیتر از سلول انگل آماده شده با ۵۰ ماکرولیتر از محلول DNA سازه بیانی مخلوط گردید و پس از انتقال به کووت الکتروپوریشن ۲ میلی‌متری استریل، به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. الکتروپوریشن در دستگاه Gene pulser با پارامترهای ولتاژ ۴۵۰V، مقاومت ۵۰۰µF و دو پالس انجام گرفت. انگل‌های الکتروپوریت شده به ۲ میلی‌لیتر از محیط BHI انتقال داده شد و برای بازیافت سلول‌ها و بیان ژن‌های کلون شده به مدت ۲۴ ساعت در ۲۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس برای جدا کردن سلول‌های ترانسفکت شده در محیط جامد انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی بلئومایسین کشت داده شد و تا ظهور کلونی‌ها به مدت ۱۴-۱۰ روز در ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. لازم به ذکر است از سلول انگل بدون محلول DNA به عنوان کنترل منفی و از سازه واجد ژن GFP (Green Fluorescent Protein) به‌عنوان کنترل مثبت در ترانسفکشن استفاده شد (۱۶).

تایید ترانسفکشن اریتروپویتین در لیشمانیا تارانتولا : شناسایی و آنالیز کلونی‌های مثبت حاوی سازه ژنی با استفاده از دو روش PCR با پرایمرهای تشخیصی و PCR با پرایمرهای ژن مورد نظر انجام شد. جفت پرایمرهای طراحی شده عبارت بودند از:

A1304-Forward:5/TCCGCCATTCATGGCTGGTG3/
A1715-Reverse:5/ TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC 3/

طول محصول حاصله توسط این پرایمرها ۱۱۰۰ جفت بود. برای اطمینان از وارد شدن ژن مورد نظر به داخل DNA کروموزومی سوش انگل ترانسفکت شده، PCR تشخیصی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن اریتروپوئتین (اشاره شده در بالا) نیز انجام شد. طول محصول PCR توسط این جفت پرایمر، ۵۰۰ جفت باز است. از DNA کروموزومی سوش انگلی ترانسفکت نشده به‌عنوان کنترل منفی در این آزمایش استفاده شد (۱۶).

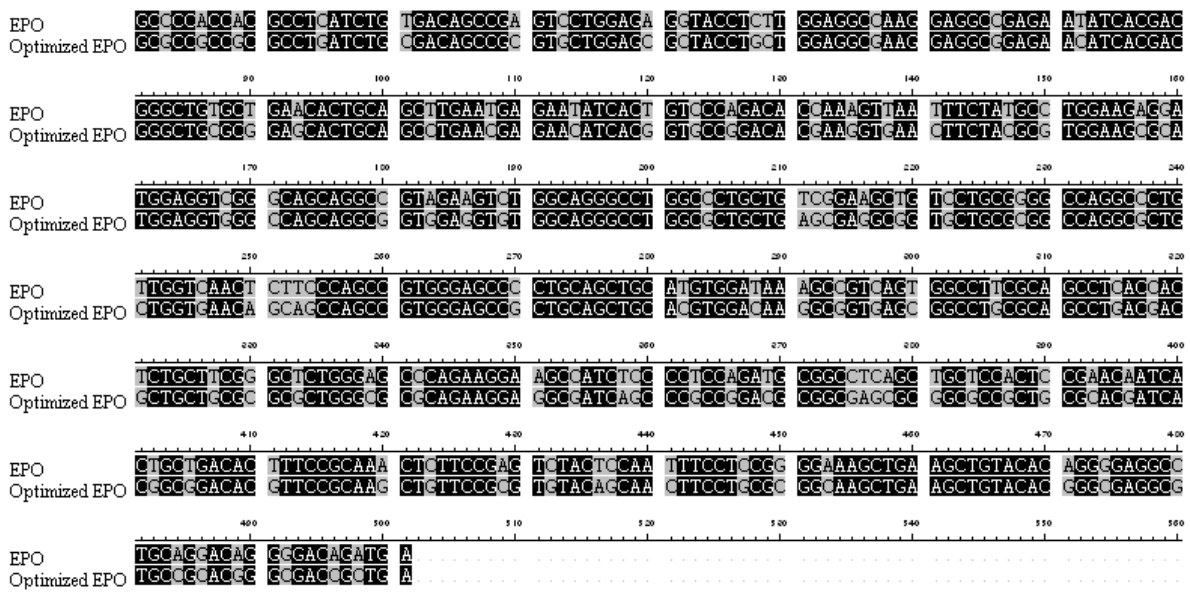
بیان و تخلیص اریتروپویتین نوترکیب: القاء و بیان ژن کلون شده در انگل ترانسفکت شده توسط افزودن تتراسایکلین با غلظت ۱۰ میکروگرم انجام شد. برای این منظور سلول‌ها با محیط BHI حاوی ۱۰ میکروگرم تتراسایکلین پاساژ و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از آنجایی که در سمت N-ترمینال پروتئین کلون شده توالی هگزا هیستیدین قرار داده شده بود؛ در تخلیص آن از ستون تمایلی Ni2+ NTA استفاده شد. با توجه ترشحی بودن اریتروپوئتین نوترکیب تولید شده و بر اساس دستورالعمل استفاده از رزین‌های آماده آگارز Ni-NTA که از شرکت QIAgen تهیه شد؛ ابتدا محیط کشت حاوی اریتروپوئتین بیان شده سانتریفوژ گردید و محلول رویی جدا شد. سپس به هر یک میلی‌لیتر از محیط کشت تغلیظ شده، مقدار ۱۵ ماکرولیتر از رزین آگارز Ni-NTA افزوده شده و لوله میکروفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه به آرامی سروته (همزده) شد. پس از سانتریفوژ مجدد در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه ودمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مایع رویی دور ریخته شد و رزین ته‌نشین شده مجدداً با بافر شستشو داده شد. پس از مرحله شستشو، پروتئین متصل به رزین توسط بافر جدا گردید. در انتها از مایع رویی حاوی پروتئین تخلیص برای آنالیزهای بعدی استفاده شد.

آنالیز بیان پروتئین نوترکیب : بیان ژن در سوش‌های القاء شده توسط دو تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ آنالیز گردید. SDS-PAGE در ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد انجام شد و نمونه‌ها با روش رنگ‌آمیزی نقره، رنگ‌آمیزی شدند. وسترن بلاتینگ مطابق با پروتکل استاندارد و با استفاده از آنتی‌بادی اولیه ضداریتروپویتین و آنتی‌بادی ثانویه IgG کونژوگه شده به HRP انجام شد (۱۷).

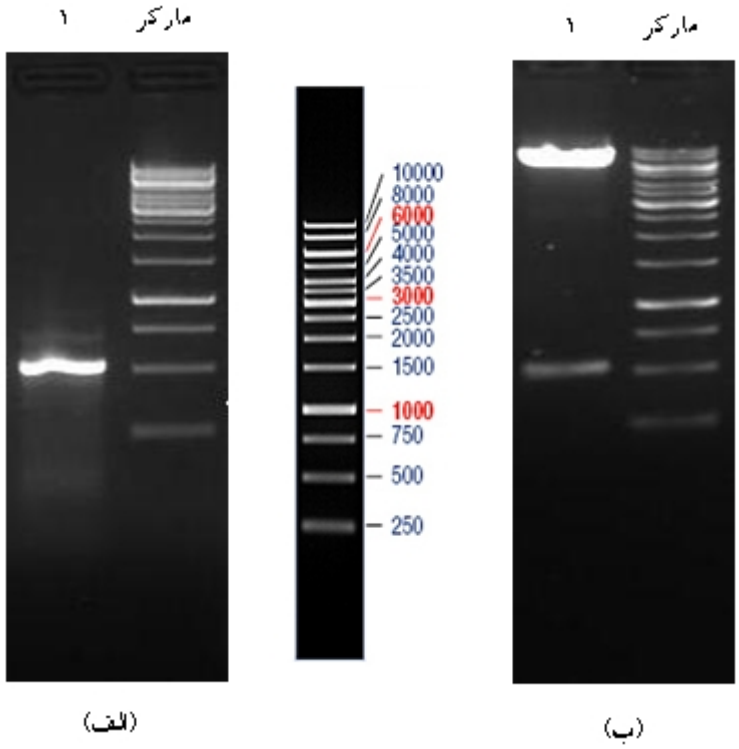
تعیین مقدار اریتروپویتین تولید شده : به منظور تعیین مقدار پروتئین نوترکیب بیان شده از روش ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) استفاده شد. ابتدا از اریتروپویتین استاندارد و مایع رویی محیط کشت حاوی سلول‌های ترانسفورم شده، سریال رقت تهیه گردید و به چاهک‌های متصل شده با آنتی‌بادی اولیه ضداریتروپویتین اضافه گردید. پس از شستشوی چاهک‌ها، آنتی‌بادی ثانویه IgG کونژوگه شده به HRP افزوده شد و بعد از اضافه کردن سوبسترای تترا متیل بنزیدین (TMB) و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه، واکنش با اسیدسولفوریک ۲ نرمال متوقف گردید و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

یافته‌ها

با توجه به بیان اریتروپویتین انسانی در انگل لیشمانیا تارانتولا و



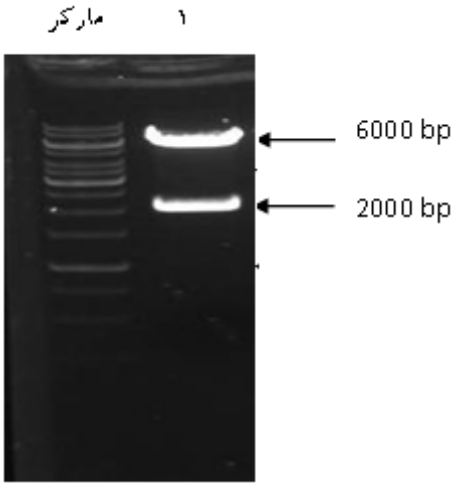
شکل ۱ : همپوشانی توالی DNA اصلی اریتروپویتین و توالی کدون بهینه شده برای بیان در لیشمانیا تارانتولا نواحی مشکی نشان‌دهنده شباهت ۱۰۰ درصد و نواحی خاکستری بیانگر عدم شباهت بین دو توالی است. درصد شباهت توالی بهینه شده با توالی ژن اصلی، ۹۲ درصد بود.



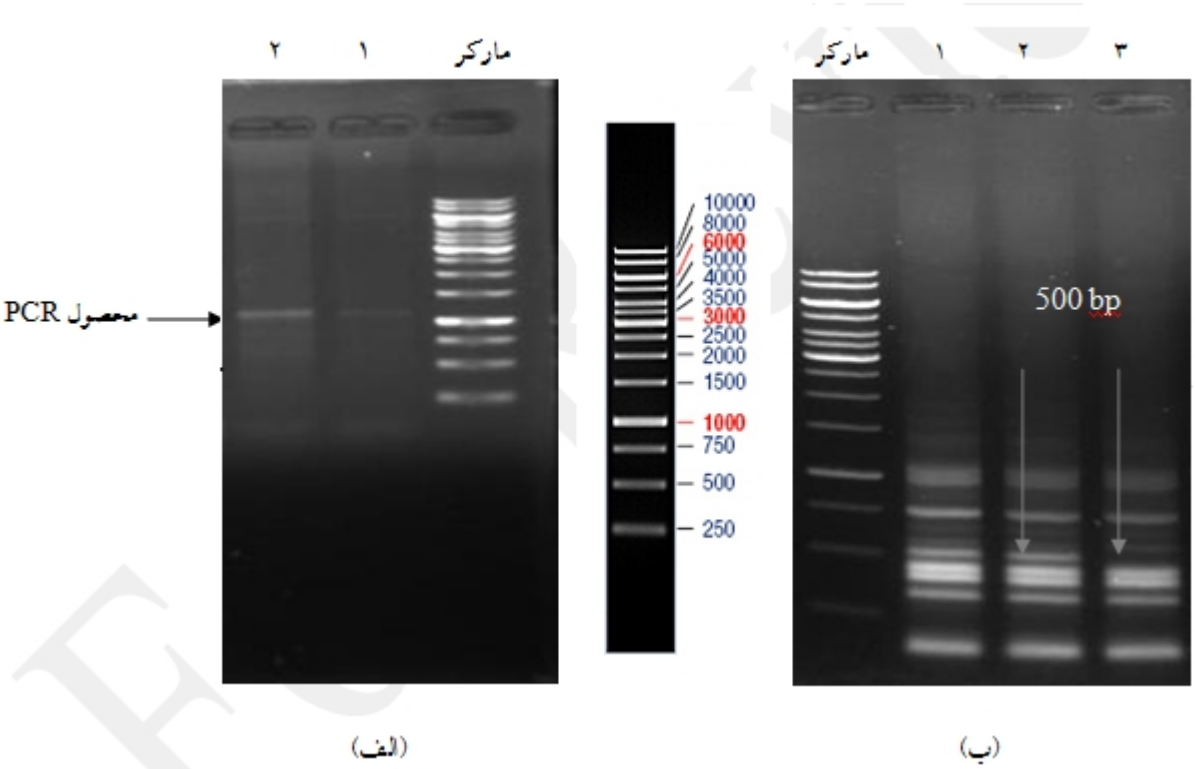
شکل ۲ : الف) تصویر الکتروفورز ژل آگاروز از PCR انجام شده بر روی ژن اریتروپویتین. مارکر DNA (1 kb Ladder).
۱: محصول PCR ژن اریتروپوئتین. ب) الگوی برش پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های محدوداثر KpnI و XbaI. مارکر DNA (1 kb Ladder).
۱) سازه بیانی حاوی ژن اریتروپوئتین

بهینه‌سازی کدون ژن اریتروپویتین، هم‌پوشانی توالی بهینه شده با توالی ژن اصلی در شکل یک قابل مشاهده است. درصد شباهت توالی بهینه شده با توالی ژن اصلی، ۹۲ درصد بود. اغلب بازهای تغییریافته در قسمت انتهای کدون‌ها قرار گرفتند؛ به‌طوری که رمز تمام اسیدهای آمینه تغییر نکرد.

تصویری از PCR، جداسازی و تایید ژن اریتروپویتین در شکل ۲-الف نشان داده شده است. ژن موردنظر با استفاده از استراتژی کلونینگ KpnI و XbaI در حامل pLEXSY کلون گردید.

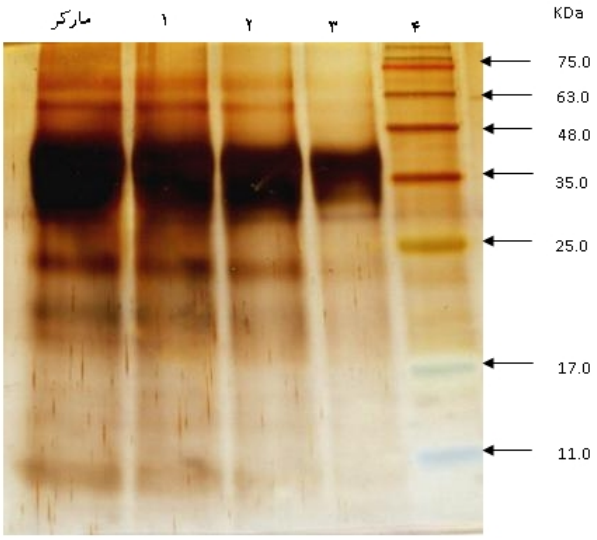


شکل ۳ : تصویری از حامل pLEXSEPO برش یافته با آنزیم SwaI. ۱: حامل برش یافته با آنزیم SwaI. مارکر DNA

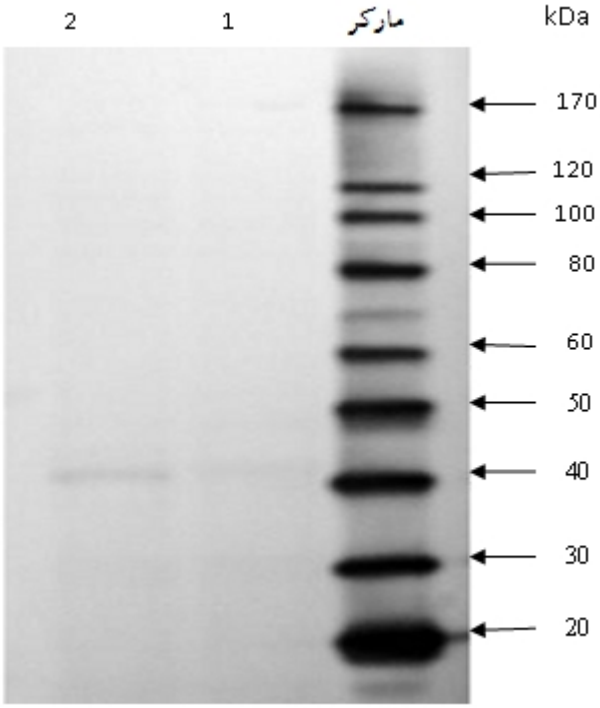


شکل ٤ : الف) تصویر الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد از PCR انجام شده با پرایمرهای تشخیصی (A1304 و A1715) اریتروپویتین. مارکر DNA (1 kb Ladder). ۱و ۲: دو سوش انگل ترانسفکت شده با ژن اریتروپویتین. ب) تصویر الکتروفورز ژل آگاروز از PCR انجام شده با پرایمرهای مخصوص اریتروپویتین. مارکر DNA (1 kb Ladder). ۱و ۲: دو سوش انگل ترانسفکت شده. ۳: انگل ترانسفکت نشده

شکل ۲-ب تایید کلونیک ژن در حامل اشاره شده را توسط برش یا آنزیم‌های محدود اثر نشان می‌دهد. در نتیجه برش، دو قطعه ۸۰۰۰ و ۵۰۰ جفت بازی که به ترتیب مربوط به وکتور و ژن کلون است؛ دیده شد که با الگوی قطعات پیش‌بینی شده مطابقت داشت. تایید بیشتر توسط توالی‌یابی و چک کردن توالی صورت گرفت. سازه ساخته شده پس از تایید pLEXSEPO نام گرفت. برای آماده‌سازی سازه ساخته شده به منظور انجام ترانسفکشن، سازه بیانی ساخته شده با آنزیم SwaI برش داده شد. در برش با آنزیم SwaI دو قطعه ۶۰۰۰ جفت بازی و ۲۰۰۰ جفت بازی حاصل گردید که سازه بیانی مورد نظر قطعه ۶۰۰۰ جفت بازی بود. قطعه ۲۰۰۰ جفت بازی منطقه‌ای است که از حامل جدا شده و جزء سازه بیانی نیست (شکل ۳). تایید ترانسفکشن توسط دو روش مختلف PCR با پرایمرهای



شکل ۵ : طرح الکتروفورزی القاء و خالص‌سازی اریتروپویتین نوترکیب تولید شده در لیشمانیا تارانتولا. نمونه‌ها توسط تکنیک نقره رنگ‌آمیزی شدند. چاهک‌ها به ترتیب عبارتند از: ۱) نمونه تخلیص شده. ۲) ۲٤ ساعت القاء. ۳) ٤۸ ساعت القاء. ٤) ۷۲ ساعت القاء



شکل ٦ : وسترن بلاتنیگ انجام شده بر روی اریتروپویتین نوترکیب تولید شده در لیشمانیا تارانتولا. چاهک‌ها به ترتیب عبارتند از : ۱) لیشمانیا تارانتولا فاقد سازه ژنی. ۲) اریتروپویتین نوترکیب خالص شده

تشخیصی و پرایمرهای ژن موردنظر انجام شد (شکل ۴). طول محصول حاصله توسط پرایمرهای تشخیصی (A1304 و A1715) و پرایمرهای مخصوص اریتروپویتین به ترتیب ۱۱۰۰ و ۵۰۰ جفت باز است که در کلونی انگل ترانسفکت شده نیز این دو محصول مشاهده می‌شود. پس از تایید کلونینگ ژن در لیشمانیا تارانتولا ترانسفکت شده، بیان پروتئین نوترکیب صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است؛ باندی با وزن ۴۰ کیلودالتون دیده می‌شود که بیانگر بیان اریتروپویتین نوترکیب است. نتیجه وسترن بلاتینگ نیز در شکل ۶ آمده است که نشان‌دهنده تایید درست پروتئین بیان شده بود. میزان بیان اریتروپویتین نوترکیب تولید شده در لیشمانیا تارانتولا ۱۲/۴ میلی‌گرم در لیتر معادل با یک درصد کل پروتئین سلول تعیین گردید.

بحث

در این مطالعه لیشمانیا تارانتولا به عنوان میزبان مناسب برای کلونینگ و بیان ژن اریتروپویتین در نظر و پروتئین مناسب تولید گردید.

اریتروپویتین که یک پروتئین دارویی پرمصرف و اثرگذار بوده و از بازار اقتصادی مناسبی برخوردار است. به طوری که در سال ۱۳۸۷ میزان فروش اریتروپویتین در ایران به میزان ۱۸۲/۳۱۱/۹۳۵/۰۰۰ ریال برآورد شد. در مسیر متداول تولید اریتروپویتین از میزبان‌هایی نظیر CHO استفاده می‌شود که میزان بیان پروتئین تقریباً پایین است. از این رو پیدا کردن جایگزینی برای بیان و تولید اریتروپویتین نوترکیب همواره مورد توجه بوده است (۱۸و۱۹). با این هدف، در سال ۲۰۰۲ میلادی، تولید اریتروپویتین نوترکیب در میزبان انگلی لیشمانیا تارانتولا توسط Breitling و همکاران انجام شد (۲۰)؛ ولیکن بازده تولید پروتئین در این تحقیق پایین گزارش شد که از دلایل آن می‌توان به وکتور استفاده شده (وکتور pcDNA3.1/GSepo) و عدم بهینه‌سازی کدون اشاره نمود. در مطالعه حاضر که با هدف بهبود و ارتقاء بیان اریتروپویتین نوترکیب در میزبان لیشمانیا انجام شد؛ از وکتور بیانی جدید pLEXSY و بهینه‌سازی کدون استفاده گردید. نتایج آزمایش تایید کننده بیان صحیح این پروتئین دارویی در میزبان انگلی بود. میزان پروتئین تولید شده در حدود ۱۲/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر معادل با یک درصد کل پروتئین سلول تخمین زده شد. در حالی که مقدار گزارش شده برای اریتروپویتین تولید شده در CHO بین ۵/۶ تا ۸/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در لیشمانیا تارانتولا ۹/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است (۲۰). این نتایج که بیانگر افزایش بازده تولید اریتروپویتین است؛ با یافته‌های حاصله برای پروتئین فعال کننده پلاسمینوژن بافتی نیز همخوانی دارد (۲۱). علاوه بر این که باید مزایایی نظیر هزینه پایین‌تر تولید و سادگی انجام کار را نیز به آن اضافه کرد.

از جمله مباحث مهم در تولید پروتئین‌های دارویی، چگونگی و میزان بیان آنها است. به‌طوری که اولاً میزبان انتخاب شده بتواند فرم صحیح و فعال پروتئین موردنظر را تولید کند که این ویژگی در مورد پروتئین‌هایی دارای تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون از اهیمت بالایی برخوردار است و از این رو برای

این دسته از پروتئین‌ها که عموماً یوکاریوتی هستند؛ نمی‌توان از هر میزبانی استفاده کرد. نکته دوم میزان بیان و تولید محصول نوترکیب است. به طوری که بایستی محصول تولید شده از بازده مناسب برای تولید در مقیاس بالا برخوردار باشد و بتواند پاسخگوی نیاز صنعت باشد (۱۸و۲۲). از میزبان‌های جایگزین برای سلول‌های یوکاریوتی که در سال‌های اخیر مطرح شده؛ می‌توان به انگل لیشمانیا تارانتولا اشاره کرد که چندین پروتئین دارویی نظیر اینترفرون گاما و فعال کننده پلاسمینوژن بافتی در آن تولید شده است (۸). از مهم‌ترین مزایا و خصوصیات جالب توجه لیشمانیا تارانتولا، الگوی گلیکوزیلاسیون مشابه با پستانداران، کشت آسان و کم‌هزینه، هموژنسیته بالای پروتئین گلیکوزیله شده و میزان بالای بیان است (۸و۹).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه سازه بیانی برای کلونینگ و بیان ژن اریتروپویتین در لیشمانیا تارانتولا طراحی و ساخته شد و پروتئین مذکور با موفقیت القاء و شناسایی گردید. لیشمانیا تارانتولا می‌تواند به عنوان میزبان مناسب در تولید اریتروپویتین نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد و این فناوری قابلیت بومی‌سازی نیز دارد

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای انورسادات کیان مهر برای اخذ درجه دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی از انستیتو پاستور ایران بود و با حمایت مالی انستیتو پاستور ایران انجام شد.

References

1. Walsh G. Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. Eur J Pharm Biopharm. 2003 Jan; 55(1):3-10.

2. Gregoriadis G, Jain S, Papaioannou I, Laing P. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. Int J Pharm. 2005 Aug;300(1-2):125-30.

3. Jain S, Hreczuk-Hirst D, Laing P, Gregoriadis G. Polysialylation: The natural way to improve the stability and pharmacokinetics of protein and peptide drugs. Drug Delivery Systems and Sciences. 2004; 4(1): 3-9.

4. Fernandes AI, Gregoriadis G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. Int J Pharm. 2001 Apr;217(1-2):215-24.

5. Solá RJ, Griebenow K. Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. Bio Drugs. 2010 Feb; 24(1):9-21.

6. Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. J Pharm Sci. 2005 Aug;94(8):1626-35.

7. Epenetos A, Hreczuk-Hirst D, McCormack B, Gregoriadis G. Polysialylated proteins: A potential role in cancer therapy. Clin Pharm. 2002; 21: 2186-90.

8. Basile G, Peticca M. Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae. Mol Biotechnol. 2009 Nov;43(3):273-8.

9. Davoudi N, Hemmati A, Khodayari Z, Adeli A, Hemayatkar M. Cloning, and expression of human IFN-γ in Leishmania tarentolae. World J Micobol Biotechnol. 2011; 27(8): 1893-9.

10. Hemayatkar M, Mahboudi F, Majidzadeh-A K, Davami F, Vaziri B, Barkhordari F, et al. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in Leishmania tarentolae. Biotechnol J. 2010 Nov;5(11):1198-206.

11. Elliott S, Chang D, Delorme E, Eris T, Lorenzini T. Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin. J Biol Chem. 2004 Apr;279(16):16854-62.

12. Elliott S, Pham E, Macdougall IC. Erythropoietins: a common mechanism of action. Exp Hematol. 2008 Dec;36(12):1573-84.

13. Su D, Zhao H, Xia H. Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity. Int J Hematol. 2010 Mar; 91(2):238-44.

14. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. Exp Hematol. 2003 Apr;31(4):290-9.

15. Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, Ponting I. Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. Exp Hematol. 2004 Dec;32(12):1146-55.

16. Lang T, Goyard S, Lebastard M, Milon G. Bioluminescent Leishmania expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harbouring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. Cell Microbiol. 2005 Mar;7(3):383-92.

17. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994; pp: 1847-57.

18. Lukes J, Paris Z, Regmi S, Breitling R, Mureev S, Kushnir S, et al. Translational initiation in Leishmania tarentolae and Phytomonas serpens (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. Mol Biochem Parasitol. 2006 Aug;148(2):125-32.

19. Diepenbruck C, Klinger M, Urbig T, Baeuerle P, Neef R. Productivity and quality of recombinant proteins produced by stable CHO cell clones can be predicted by transient expression in HEK cells. Mol Biotechnol. 2013 Jun;54(2):497-503.

20. Breitling R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. Protein Expr Purif. 2002 Jul;25(2):209-18.

21. Soleimani M, Mahboudi F, Davoudi N, Amanzadeh A, Azizi M, Adeli A, et al. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan Leishmania tarentolae. Biotechnol Appl Biochem. 2007 Sep;48(Pt 1):55-61.

22. Basak A, Shervani NJ, Mbikay M, Kolajova M. Recombinant proprotein convertase 4 (PC4) from Leishmania tarentolae expression system: purification, biochemical study and inhibitor design. Protein Expr Purif. 2008 Aug;60(2):117-26.

Original Paper

Cloning and expression of human recombinant erythropoietin in *Leishmania tarentolae*

Kianmehr A (M.Sc)[1], Shahbaz Mohammadi H (M.Sc)[1], Omidinia E (Ph.D)*[2]

[1]Ph.D Candidate in Medical Biotechnology, Pasteur Institute of Iran. [2]Associate Professor of Medical Biotechnology, Genetics and Metabolism Research Group, Pasteur Institute of Iran.

Abstract

Background and Objective: Human erythropoietin (EPO) is a glycosylated hormone with molecular weight of about 40 KDa which is synthesized in kidneys and plays an important role in proliferation and differentiation of erythrocytes.This study was done to assess and analyze the expression of recombinant EPO in *Leishmania tarentolae* host.

Method: In this descriptive study, the EPO gene was codoned , optimized with bioinformatics database prior to be synthesized. It was cleaved by KpnIandXbaI enzymes and cloned into pLEXSY expression vector. The constructed expression cassette was transfected into *Leishmania tarentolae* through electroporaton method. Identification and confirmation of transfected colonies was performed using PCR expression diagnostic primers and EPO specific primers. Induction of the cloned gene was done with tetracycline. The expression in induced strains was analyzed by SDS-PAGE and western blotting techniques. The amount of recombinant protein was quantified by ELISA method. Confirmation of cloning and EPO expression cassette was carried out through genetic engineering procedures.

Results: Expression analysis of transfected parasitic strain with SDS-PAGE and western blotting confirmed gene integration into chromosomal of host as well as expression. The optimal conditions for expression were found to be 10µg of tetracycline and 72h induction time. Molecular weight of expressed protein estimated to be 40 KDa and expression level was determined to be 12.4 mg/l which was equal to 1% of total protein mass.

Conclusion: EPO expression cassette for cloning and expression in *Leishmania tarentolae* was designed and protein of interest was successfully induced and identified *Leishmania tarentolae* can be used as a suitable host for production of recombinant EPO and this technology has a potential for localization.

Keywords: Erythropoietin, *Leishmania tarentolae*, Gene expression, Cloning

*** Corresponding Author: Omidinia E (Ph.D), E-mail: eomid8@yahoo.com**

Received 18 Jun 2013 **Revised** 24 Sep 2013 **Accepted** 2 Nov 2013

This paper should be cited as: Kianmehr A, Shahbaz Mohammadi H, Omidinia E. [Cloning and expression of human recombinant erythropoietin in *Leishmania tarentolae*]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 16(3): 86-93. [Article in Persian]