

کلونینگ و بیان داروی ضد انعقادی دسیرودین (هیرودین) با تمرکز بر روی سیستم ترشحی میزبان

سپس محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و مشاهده شد.

کلونینگ ژن هیرودین III در داخل PCR cloning vector pTG19-T با کمک آنزیم DNA Ligase T₄ ژن مورد نظر در T-vector قرار گرفت و ساختار ایجاد شده به داخل سلول های سوش Top ۱۰ باکتری اشرشیا کولی ترانسفورم شد. T-vector حامل ژن کد کننده آنزیم بتا گالاکتوزیداز است. لذا با ترانسفورم شدن آن به داخل سلول های مستعد Top ۱۰، این سلول ها آنزیم بتاگالاکتوزیداز را تولید خواهند کرد. به دلیل اینکه محل قرارگیری محصول PCR با سایت lacZ در T-vector همپوشانی دارد، قرارگرفتن ژن در T-vector مانع از بیان ژن lacZ خواهد شد. بنابراین با استفاده از تکنیک α -complementation می توان کلنی های حاوی پلاسمید و ژن مورد نظر را غربالگری کرد. این تکنیک به غربالگری کلنی های سفید و آبی نیز معروف است. در نهایت کلونی های سفید رنگ به دست آمده با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم های Sall و NcoI بررسی شد.

ساب کلونینگ ژن هیرودین III در pET-22b

برای بیان ژن هیرودین III در وکتور نو ترکیب هیرودین pTG19-T/III با استفاده از آنزیم های Sall و NcoI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در نتیجه ژن هیرودین III دارای پایانه ی چسبنده جداسازی و در وکتور بیانی pET-22b هضم یافته با دو آنزیم مذکور پس از تخلیص از روی ژل آگارز ساب کلون شد و در سلول های مستعد اشرشیا کولی سویه Origami (DE3) توسط محصول واکنش الحاق ترانسفورم و روی پلیت حاوی کلرامفنیکل کشت داده شدند.

با توجه به مزیت های دارویی هیرودین و برتری مصرف آن در مقایسه با هپارین بعنوان داروی ضد انعقاد، تولید آن در داخل کشور برای مصارف دارویی امری ضروری است. هیرودین یک پروتئین کوچک با ۶۵ تا ۶۶ اسید آمینه است، که از غدد بزاقی زالو ترشح می شود. هیرودین اختصاصی ترین و قوی ترین بازدارنده ترومبین است. بنابراین به عنوان یک داروی ضد انعقاد می تواند در بسیاری از بیماری های قلب و عروق و همچنین در عمل های جراحی به کار رود و خطرات ناشی از «آمبولی» یا لخته شدن خون را که بیشتر به مرگ می انجامد را کاهش دهد (۱، ۴). در سال ۱۸۸۴ پروفیسور فیزیولوژی 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 زالوی پزشکی جدا کند (۲). هیرودین توانایی زیادی در پیشگیری از انعقاد خون دارد (۵) (با آزمایشی که به گونه ی آزمایشی بر روی خون مکیده شده از زالو انجام شد زمان لخته شدن خون به بیش از ۶ ساعت افزایش یافته بود). پژوهشگران دپارتمان فارماکولوژی دانشگاه کنتاکی در تحقیقاتی، در مقایسه اثرات ضد انعقادی هیرودین با هپارین به نتایج زیر دست یافتند (۳): هیرودین برای فعال شدن نیاز به کوفاکتور ندارد. اثرات پایدار و یکنواخت وابسته به دوز دارد. در انسان مسمومیت نمی دهد. بی حسی موضعی می دهد. مطابق گزارش سالانه معاونت غذا و داروی وزارت بهداشت (سال ۱۳۸۷) هیچ یک از داروهای نامبرده ی بالا، چه کلی و چه به صورت تک نسخه وارد کشور نشده است. در نتیجه در داخل کشور هنوز رقیبی برای محصول احتمالی این پروژه وجود ندارد.

مواد و روش ها

پس از سفارش ژن هیرودین با استفاده از اطلاعات ژن هیرودین III در بانک ژنی، طراحی پرایمر انجام شد. پرایمرهای زیر برای تکثیر قطعه ژن هیرودین III به روش PCR استفاده شد.

توالی پرایمر بالادست دارای جایگاه برش برای آنزیم NcoI:

5'- T TCG AGC TCG CCA TGGCAT CAT CATCATCAT
CAC AGC AGC GGC GAC GACGACGAC AAAATG ATC
ACC - 3'

توالی پرایمر پایین دست دارای جایگاه برش برای آنزیم Sall:

5'- CGA CAG GTT TGT CGA CAA AAA - 3'
واکنش PCR طبق برنامه در نظر گرفته شده انجام شد.

بیان ژن هیرو دین III و تایید آن

پس از تلقیح ۱۰۰ میکرولیتر کشت شبانه به محیط کشت تازه دارای ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آنتی بیوتیک آمپی سیلین و $A_{600} = 0.6$ بیان وکتور نوترکیب هیرو دین pTG19-T/III در باکتری اشرشیا کولی سویه Origami (DE3) با غلظت یک میلی مولار IPTG در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان های متفاوت ۳ ساعت، ۵ ساعت و یک شبانه روز القا شد و بهترین نتیجه در زمان ۵ ساعت مشاهده شد. بیان ژن با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلائینگ مورد تایید قرار گرفت.

الکتروفورز SDS-PAGE

نمونه های پروتئینی تحت شرایط دناتوره به همراه نشانگر پروتئینی روی ژل پلی آکریل آمید با غلظت ۱۸٪ و جریان ۲۵ میلی آمپر به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند. مکان یابی پروتئین هیرو دین در فراکشن های مختلف سلولی: برای شناسایی پروتئین های هیرو دین، جداسازی فراکشن های مختلف سلولی شامل فراکشن پروتئین های محلول، پروتئین های نامحلول، پروتئین های پری پلاسمی و محیط کشت انجام شد. این فراکشن ها جهت آزمایش های SDS-PAGE و وسترن بلائینگ به کار رفتند.

وسترن بلائینگ

پروتئین هایی که در مرحله قبل در داخل ژل SDS-PAGE به لحاظ اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی بر روی کاغذ نیترو سلولز که قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین را دارند انتقال داده شدند. همچنین برای تشخیص اختصاصی پروتئین ها از آنتی بادی استفاده شد.

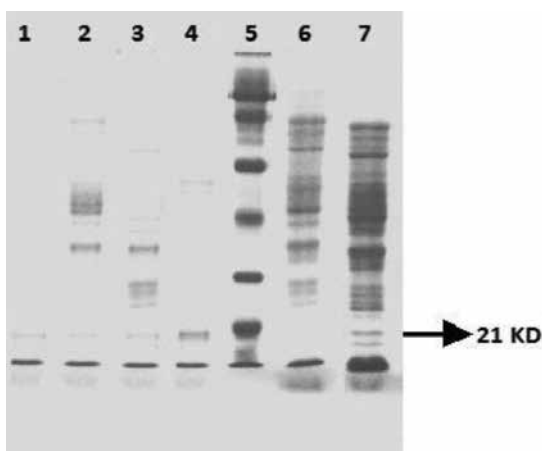
نتایج

واکنش PCR: تحت شرایط ایجاد شده برای انجام واکنش PCR با توجه به اندازه قطعه ژن هیرو دین یک باند حدوداً ۵۲۲ جفت بازی روی ژل الکتروفورز مشاهده شد و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشد.

تایید صحت کلونینگ و ساب کلونینگ:

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.

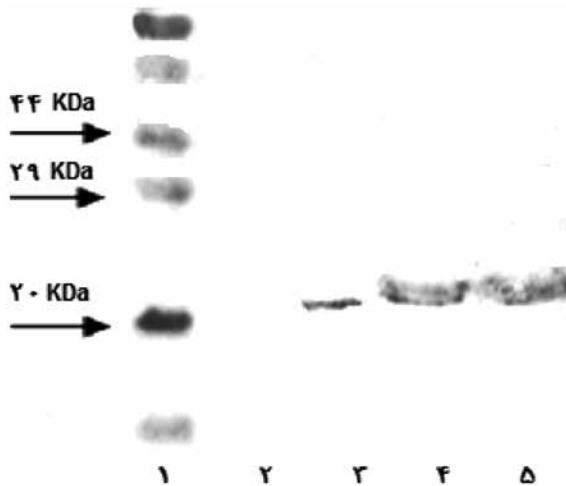
برای مشخص کردن کلونی های واجد محصول PCR، شماری از کلونی های مشکوک، توسط آنزیم BamHI (تعبیه شده بر روی نقشه T vector) برش خوردند. بعد از الکتروفورز نمونه های هضم شده، باند مورد نظر که حاوی محصول PCR است - حدود ۵۳۰ جفت باز - مورد شناسایی قرار گرفت. سپس محصول PCR (ژن هیرو دین) از داخل T-vector توسط آنزیم های NcoI, Sall خارج شد. محصول هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪ به همراه مارکر وزن مولکولی DNA، لود شد. قطعه ۵۰۱ جفت باز که همان محصول PCR حاوی ژن هیرو دین است، از روی ژل آگارز تخلیص شد. این قطعه به داخل پلاسمید بیانی (+) pET-22b منتقل شد. واکنش اتصال، توسط آنزیم DNA Ligase T4 برقرار و ساختار حاصل، جهت بررسی کلونینگ و بیان، به داخل سویه Origami (DE3) از باکتری اشرشیا کولی 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 و باند مورد نظر (۷۶۹ جفت باز) مشاهده شد.



شکل ۱) تصویر ژل SDS_PAGE مربوط به فراکشن های مختلف سلولی در Origami B (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 Origami B (DE3) دارای پلاسمید نوترکیب (+) pET-22b که توسط IPTG القا نشده است). ستون ۷: نمونه کنترل مثبت (باکتری Origami B (DE3) حاوی پلاسمید نوترکیب pET1008).

بیان پروتیین هیرودین III:

پس از القای نمونه ها و الکتروفورز روی ژل SDS-PAGE در مقایسه با نشانگر پروتیینی در ناحیه ۲۱ کیلو دالتون باند پروتیین نوترکیب موردنظر مشاهده شد (شکل ۱) و با استفاده از تکنیک وسترن بلاتینگ تایید شد (شکل ۲). نتیجه نشان داد که در فراکشن پری پلاسما میک و فراکشن محیط کشت، پروتیین هیرودین، به میزان بیشتری مشاهده شد.



شکل ۲) تصویر کاغذ وسترن بلاتینگ مربوط به فراکشن های مختلف سلولی در Origami (DE3). ستون ۱: مارکر وزن پروتیینی. ستون ۲: فراکشن محیط کشت. ستون ۳: فراکشن پری پلاسما میک. ستون ۴: فراکشن پروتیین های محلول سیتوپلاسمی. ستون ۵: فراکشن پروتیین های نامحلول سیتوپلاسمی.

شدن پروتیین هیرودین، به دلیل شکل گیری باندهای دی سولفیدی داخل مولکولی نمی تواند باشد زیرا، وزن مولکولی هیرودین توسط آنالیز Mass، ۷ کیلودالتون تشخیص داده شده است که نشاندهنده مونومر شدن دایمر مربوطه است (۶). اگر باندهای دی سولفیدی داخل مولکولی به طرز نادرستی شکل گیرند، پس دایمر مربوطه نمی تواند مونومر شود، به عبارت دیگر، این پدیده باعث می شود 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 بیولوژیکی آن می گردد. این مسئله می تواند به علت برهم کنش هیدروفوبیک بین دو مولکول هیرودین رخ دهد (۶). البته سنگین تر بودن وزن پروتیین، می تواند به علت عدم جدا شدن Signal sequence باشد. در مجموع می توان گفت نتایج بدست آمده در این پژوهش با سایر تجربیات و تحقیقات در زمینه ترشح پروتیین های نوترکیب در اشرشیا کوکی همخوانی دارد، و ما نشان دادیم برای استفاده از مزایای ترشح پروتیین نوترکیب به خارج از سیتوپلاسم، می توان پروتیین هیرودین را به فضای پری پلاسما و حتی محیط کشت منتقل کرد.

منابع:

1. Bagdy, D., et al., 1976, Hirudin Methods Enzymol., 45: p. 669-78.
2. Eriksson, B.I. and O.E. Dahl, Drugs, 2004. Prevention of venous thromboembolism following orthopaedic surgery: clinical potential of direct thrombin inhibitors. 64(6): p. 577-95.
3. F.J.M. Mergulha~oa, D.K. Summersb, G.A. Monteiro. 2005, Recombinant protein secretion in Escherichia coli. Biotechnology Advances, 23: p. 177-202.
4. Georgiou G. and Segatori L., 2005, Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. Current Opinion in Biotechnology, 16: p.538-545.
5. Markwardt, F., 1985, Pharmacology of hirudin: one hundred years after the first report of the anticoagulant agent in medicinal leeches. Biomed Biochim Acta., 44(7-8): p. 1007-13.
6. Shuhua T., Wutong W., Xiangyu L., et al., 2007, Enhanced secretion of adhesive recognition sequence containing hirudin III mutein in E.coli. Mil Biotechnol 36: p. 1-8.

بحث

در این پروژه، برنامه این بود که برای افزایش میزان بیان هیرودین، ژن آن به داخل پلاسما مید بیانی (+) pET-۲۲b وارد شود و از آنجایی که این پلاسما مید حاوی سیگنال پپتید pelB می باشد، ترشح پروتیین هدف به فضای پری پلاسما میک را تسهیل می کند. بدین منظور، پرایمرهای Forward , Reverse طراحی شدند به گونه ای که سایت های برشی NcoI, Sall برای تسهیل در ساب کلون ژن هیرودین به داخل پلاسما مید بیانی (+) pET-۲۲b، روی آن ها منظور گردیده است. نتیجه نشان از بیان موفقیت آمیز پروتیین هیرودین ساختار (+) pET-۲۲b داد. هر چند وزن پروتیین سنگین تر از اندازه ی معمول است که بر اساس نظرات یافت شده در مقالات، این پدیده به این علت می باشد که محصول ترشحاتی پس از ترشح به محیط خارج سلولی، دایمر می شود. این دایمری