

# بهینه‌سازی کدونی و مقایسه‌ی بیان فاکتور رشد عصبی بتا انسانی ( $\beta$ -NGF) بصورت نو ترکیب در میزبان‌های باکتریایی BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS

مونا سهرابی<sup>۱</sup>، زهرا حاجی حسن<sup>۲\*</sup>، معصومه رجبی بذل<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲۴

تاریخ تصویب: ۹۳/۱۱/۲۷

## چکیده

فاکتور رشد عصبی بتا ( $\beta$ -NGF) برای اولین بار بدلیل نقش حیاتی‌اش در رشد و بقای سلول‌های عصبی مورد مطالعه قرار گرفت. این پروتئین که به خانواده‌ی نوروتروفین‌ها تعلق دارد در درمان بیماری‌های تخریب عصبی نظیر آلزایمر دارای نقش قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. بدین منظور،  $\beta$ -NGF انسانی نو ترکیب برای اولین بار در ایران در دو سویه‌ی متفاوت باکتری *E. coli* بیان شد.

۱ کارشناس ارشد، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، گروه مهندسی علوم زیستی، تهران، ایران

\* ۲ استادیار، دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، گروه مهندسی علوم زیستی، تهران، ایران

(نویسنده مسئول (hajihasan@ut.ac.ir)

۳ دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه بیوشیمی بالینی، تهران، ایران

از آنجاییکه  $\beta$ -NGF در ساختار فعال و عملکردی خود دارای سه پیوند دی‌سولفیدی است، محیط احیا کننده‌ی سیتوپلاسم *E. coli* برای بیان آن مناسب نمی‌باشد. بنابراین، محیط اکسید کننده‌ی پری‌پلاسم جهت تولید  $\beta$ -NGF همراه با تا خوردگی صحیح مورد توجه قرار گرفت.

در این تحقیق،  $\beta$ -NGF cDNA انسانی بدست آمده از بانک اطلاعاتی NCBI پس از بهینه‌سازی کدونی و سواب کلونینگ در وکتور pET<sup>3+</sup>۹b (+)، حاوی ژن دی‌سولفید ایزومراز A، به روش ترنسفورماسیون (شوک حرارتی) به سویه‌های (DE<sup>3</sup>)BL<sup>21</sup> و pLysS انتقال یافت. بیان همزمان با استفاده از القای پروموتور با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG صورت گرفت. سپس، محتوای پروتئینی استخراج شده از دو سویه‌ی مذکور با استفاده از تکنیک‌های SDS-PAGE و دات بلات با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج نشان دهنده بیان، بویژه در سویه باکتریایی (DE<sup>3</sup>)BL<sup>21</sup> می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بیان پری‌پلاسمی، پروتئین نو ترکیب، فاکتور رشد عصبی، *E. coli*

## مقدمه

NGF مشاهده شده است باعث پایداری تاخوردگی و حفظ ساختار فضایی مولکول می‌گردد. شایان ذکر است که در فرم فعال از لحاظ بیولوژیکی، دو مونومر  $\beta$ -NGF همومو دایمر همسویی را تشکیل می‌دهند (Wiesmann et al., (2001); Wi-esmann et al., (1999).

نوروتروفین‌ها از جمله NGF بدلیل نقش اساسی خود در رشد و بقای سلول‌های عصبی، جهت درمان بیماری‌های تخریب عصبی نظیر آلزایمر و بیماری‌های خودایمن مانند مالتی پل اسکروزیس مورد استفاده قرار می‌گیرند (Althaus, (2006); Heese et al., (2004). این پروتئین دارای عملکردهای حائز اهمیت نیز روی سلول‌های غیر عصبی می‌باشد. به بیان دیگر، بعنوان فاکتور بقای اتوکرینی برای نفوسیت‌های B خاطره، التیام دهنده‌ی زخم‌ها در موش‌های سالم و مبتلا به دیابت و جراحات مربوط به قرنیه بکار می‌رود (Torcia et al., (1996); Muang-man et al., (2004); Kawamoto et al., (2012); Lambiase et al., (2004).

با وجود آنکه غدد بزاقی موش نر بعنوان منبع طبیعی و غنی از فاکتور رشد عصبی بشمار می‌آیند اما ایمنی‌زایی، گرانی، زمانبر بودن تخلیص و بویژه استخراج مخلوط هتروژن از دایمرهای نسبتاً تخریب شده، استفاده از این منبع را برای اهداف درمانی به گزینه‌ی نامناسبی تبدیل نموده است. لذا به

فاکتور رشد عصبی (NGF) بیش از پنجاه سال قبل توسط ریتا مونتالسینی و همکارانش کشف شد (Levi-Montalci, (1987). این پپتید عضوی از خانواده‌ی نوروتروفین‌ها بشمار می‌آید که عملکرد بیولوژیکی آن‌ها بقا، رشد و تمایز سیستم‌های عصبی مرکزی و محیطی می‌باشد (Dechant et al., (2002); Sinder, (1994). کمپلکس فاکتور رشد عصبی دارای دو نسخه از هر یک از زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta$ -NGF و  $\gamma$ -NGF است که از میان آن‌ها دایمر  $\beta$ -NGF فعالیت بیولوژیکی این کمپلکس را بر عهده دارد (Fahnestock, (1993); Bax et al., (1991); Ibáñez, (1998). در سال ۱۹۹۱ ساختار سه بعدی این پروتئین با استفاده از کریستالوگرافی اشعه ایکس انتشار یافت که نمایانگر پیچش پروتئینی نوینی بود (McDonald et al., (1991). هر مونومر  $\beta$ -NGF در ابتدا بصورت پری-پرو-پروتئین بیان می‌شود که پس از حذف توالی‌های پری و پرو،  $\beta$ -NGF بالغ را بوجود می‌آورد (Seidah et al., (1996). مونومر  $\beta$ -NGF بالغ دارای بخش مرکزی مرکب از صفحات بتای ناهمسو می‌باشد که از یک طرف به سه لوپ L۱، L۲، L۴ و از طرف دیگر به لوپ L۳ و یک موتیف گره‌ی سیستمی متشکل از سه پیوند دی‌سولفیدی ختم می‌شود. موتیف مذکور که برای اولین بار در

و بازده بالای بیان مورد استفاده قرار گرفته است. ناقل استفاده شده، وکتور Novagene pET39b(+) ساخت شرکت آمریکا می‌باشد که از ویژگی‌های حائز اهمیت آن می‌توان به حضور پروموتور قدرتمند T7، توالی برچسب هیستیدینی، توالی پپتید نشانه جهت صدور پروتئین به فضای پری پلاسمی و ژن DsbA برای افزایش حلالیت و تا خوردگی صحیح پروتئین نو ترکیب در فضای پری پلاسمی اشاره نمود. بیان همزمان آنزیم اکسیداز DsbA 21 کیلودالتونی منجر به اکسید شدن سیستم‌تئین‌های موجود در پروتئین مورد نظر شده و متعاقباً تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی و تا خوردگی صحیح پروتئین هدف ( $\beta$ -NGF انسانی) را میسر می‌سازد (Berkmen, (2012).

#### مواد استفاده شده و روش کار

سویه‌های BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3) بعنوان میزبان‌های باکتریایی از شرکت Novagene آمریکا خریداری شدند. هر دو سویه دارای ژن RNA پلیمراز T7 قابل القاء با IPTG<sup>1</sup> می‌باشند. سویه‌ی دارای پلاسمید pLysS، لیزوزیم T7 را کد می‌کند که مهارکننده‌ی طبیعی RNA پلیمراز T7 بوده و بیان پایه‌ای ژن‌های هدف تحت کنترل پروموتور T7 را سرکوب می‌نماید.

منظور استفاده از این پروتئین بعنوان عامل درمانی، توجه دانشمندان بسوی تولید مقادیر زیادی از  $\beta$ -NGF انسانی بصورت نو ترکیب و هموژن بویژه در سیستم‌های پروکاریوتی جلب شده است (Rattenholl et al., (2001). بنابر اهمیت درمانی این پروتئین، از سال 1989 تاکنون تولید  $\beta$ -NGF انسانی بصورت نو ترکیب با استفاده از میزبان‌های مختلف ادامه یافته است. بدین منظور، میزبان‌های یوکاریوتی مختلفی از جمله CHO، COS، سلول‌های حشره، مخمر ساکارومایسز سرویزیه و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش مورد استفاده قرار گرفته اند (Bruce et al., (1989); Iwane et al., (1990); Barnett et al., (1990); Schmelzer et al., (1992); Nguyen et al., (1993); Nishizawa et al., (1993); Fan et al., (2010); بیان پروتئین مذکور در سیستم‌های پروکاریوتی نظیر باکتری *E. coli* بصورت اجسام جمعی در سیتوپلاسم و پروتئین محلول در فضای پری پلاسمی و همچنین در باکتری سرمادوست سودوآلتروموناس هالوپلانکتیس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد صورت گرفته است (Fujimori et al., (1992); Dicou, (1992); Kurokawa et al., (2001); Vigentini et al., (2006) در این تحقیق سیستم پروکاریوتی *E. coli* بدلیل سهولت شرایط کشت، تکثیر سریع و مقرون به صرفه، کنترل آسان

1 isopropyl thio- $\beta$ -D-galactoside

غربالگری شدند (Sambrook et al., 2001). محیط کشت و آنتی بیوتیک کانامایسین از شرکت Sigma آمریکا خریداری شدند. سپس جهت تأیید صحت کلونینگ توالی ۳۶۰ جفت بازی ژن مورد نظر، استخراج پلاسمید از هر یک از دو سویه‌ی مذکور صورت گرفت و به منظور دستیابی به پلاسمید خالص و عاری از آلودگی‌هایی نظیر پروتئین و RNA از کیت تجاری تخلیص پلاسمید (خریداری شده از شرکت Bioneer کره) استفاده شد. پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از پرایمر T7 terminator توسط شرکت ژن فناوران توالی‌یابی گردیدند.

**بیان پروتئین نو ترکیب  $\beta$ -NGF انسانی در دو سویه‌ی BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3)**

میزان ۱٪ از کشت شبانه‌ی هر یک از سویه‌های BL21(DE3)pLysS و pET39b::hNGF در محیط LB دارای آنتی بیوتیک کانامایسین و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به  $OD_{600}$  ۰/۵-۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر کشت داده شد. بیان در شرایط بهینه با استفاده از غلظت ۱ میلی مولار IPTG (خریداری شده از شرکت Sigma آمریکا) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در هر دو سویه انجام شد. پس از

وکتور pET39b(+) بعنوان وکتور بیانی از شرکت Novogene آمریکا خریداری شد. این وکتور حاوی پرموتر قدرتمند T7، توالی برچسب هیستیدینی، توالی پپتید نشانه و ژن DsbA جهت تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی صحیح در محیط پری‌پلاسم باکتری می‌باشد.

**بهینه‌سازی کدون‌های توالی cDNA ژن  $\beta$ -NGF انسانی، انجام کلونینگ و ترنسفورماسیون به منظور بیان در *E. coli***

توالی cDNA ژن  $\beta$ -NGF بالغ از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج شد. پس از جایگزینی کدون‌های نادر موجود در آن با کدون‌های ترجیحی و مورد استفاده در *E. coli*، بهینه‌سازی توزیع درصد کدون‌ها و محتوای GC انجام شد. سپس توالی  $\beta$ -NGF انسانی توسط شرکت شاین جین (کشور چین) سنتز و با استفاده از آنزیم‌های محدودالایر XhoI و BamHI در وکتور مذکور ساب کلون گردید (Sambrook et al., 2001).

وکتور pET39b-hNGF با استفاده از روش ترنسفورماسیون شوک حرارتی در حضور کلرید کلسیم بصورت جداگانه به دو سویه‌ی مذکور انتقال یافت و سلول‌ها در محیط LB<sup>۱</sup> دارای آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۷۰ mg/ml کشت و

کاغذ توسط بافر بلوکه کننده‌ی TBS-T (Tris-HCl, NaCl, Tween20) حاوی w/v 3% ژلاتین بلوکه گردیدند. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر TBS-T، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد His-tag متصل به آنزیم HRP (خریداری شده از شرکت Sigma آمریکا) با رقت ۱:۱۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، کاغذ با سوبسترای رنگی DAB (خریداری شده از شرکت Biobasic کانادا) در حضور پراکسید هیدروژن بعنوان سوبسترای آنزیم در محیط تاریک انکوبه شد.

### نتایج

بهینه‌سازی کدون‌های توالی cDNA ژن  $\beta$ -NGF انسانی

ژن‌های هترولوگ از جمله ژن  $\beta$ -NGF انسانی دارای کدون‌هایی هستند که کمتر توسط باکتری‌ها استفاده می‌شوند لذا جهت جلوگیری از کاهش کارایی فرایند ترجمه، کدون‌های نادر با کدون‌هایی که برای باکتری *E. coli* بیشترین تمایل استفاده را دارند، جایگزین شدند زیرا در این میزبان، tRNAهای شارژ شده با آمینو اسید، برای آن کدون‌ها فراوان‌تر می‌باشند. در نتیجه، شاخص انطباق کدونی<sup>۲</sup> (CAI) بین ژن مورد نظر و میزبان مذکور از ۰/۶۵ به ۰/۸۸ ارتقاء یافت (نمودار ۱ و ۲).

همچنین جهت افزودن نیمه عمر mRNA،

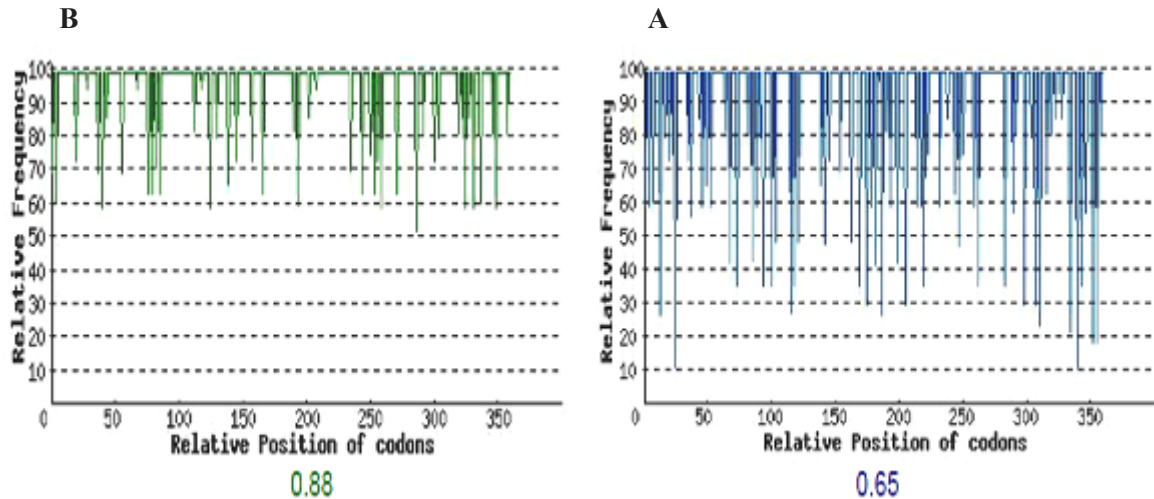
اتمام مدت زمان بیان، سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۵۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و جمع‌آوری شدند. در نهایت، کل محتوای پروتئینی تولید شده در این دو سویه توسط افزودن اوره ۸ مولار (خریداری شده از شرکت Merck آلمان) استخراج گردید. بدین منظور پس از افزودن اوره به رسوب سلولی، سلول‌ها توسط حمام اولتراسونیک شکسته شده و سوسپانسیون سلولی حاصله در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بصورت شبانه انکوبه گردید. پس از سپری شدن مدت زمان انکوباسیون، سوسپانسیون حاصله در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول رویی حاوی کل محتوای پروتئینی باکتری است که برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد.

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از ژل SDS-PAGE و روش دات بلات به منظور الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از روش لاملی و ژل-SDS PAGE ۱۲ درصد استفاده شد. رنگ آمیزی با کوماسی بلو R۲۵۰ (خریداری شده از شرکت Merck آلمان) انجام شد (Laemmli, 1970).

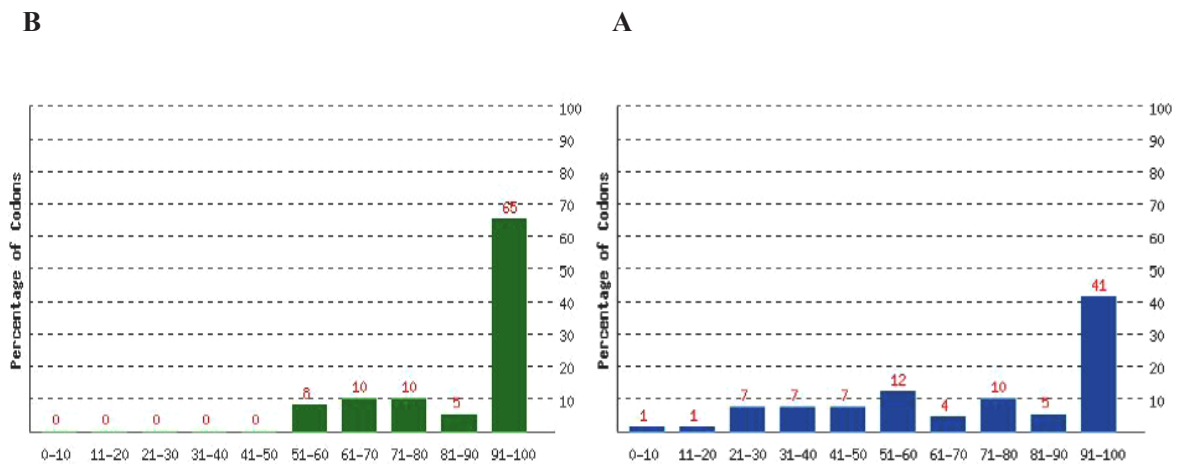
همچنین نمونه‌های پروتئینی استخراج شده روی کاغذ نیتروسولوز (خریداری شده از شرکت Millipore آمریکا) لکه‌گذاری شدند. سپس نقاط غیر اختصاصی موجود بر روی

1 Horse Radish Peroxidase

2 Codon Adaptation Index

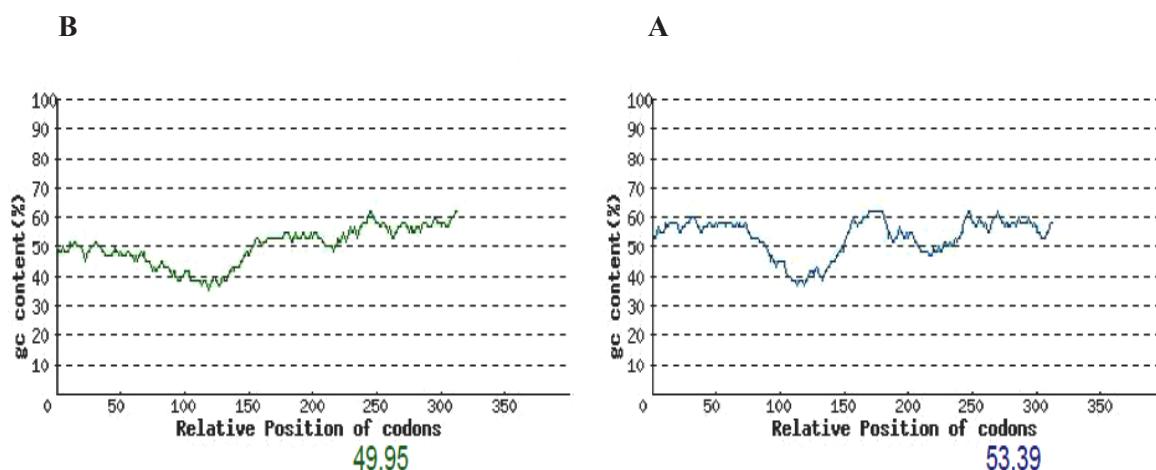


نمودار ۱: توزیع فراوانی ترجیح کدونی در طول توالی ژن  $\beta$ -NGF انسانی. شاخص انطباق کدونی کامل در آرگانیزم بیانی مورد نظر عدد ۱ در نظر گرفته شده است، بنابراین عدد بزرگتر از ۸/۰ مطلوب بوده و نشان دهنده سطح بالای بیان ژن می‌باشد. قسمت A و B به ترتیب، قبل و بعد از بهینه‌سازی را نشان می‌دهند.



نمودار ۲: توزیع درصد کدون‌ها. برای کدونی که در مورد یک آمینو اسید بیشترین فراوانی استفاده را در آرگانیزم بیانی مورد نظر دارد، مقدار ۱۰۰ در نظر گرفته شده است. قسمت A و B به ترتیب، قبل و بعد از بهینه‌سازی را نشان می‌دهند.

محتوای GC و پیک‌های نامطلوب بهینه‌سازی شدند و ساختارهای ساقه-حلقه که کارایی اتصال ریبوزوم و پایداری mRNA را تحت تاثیر قرار می‌دهند، شکسته شدند (نمودار ۳).  
 (شکل ۱) مقایسه ای از توالی بهینه شده را با قبل از بهینه سازی نشان می دهد. همانطور که ملاحظه میشود بازهای تغییر داده شده به رنگ قرمز در شکل نشان داده شده اند.  
 ترنسفورماسیون وکتور حامل ژن NGF



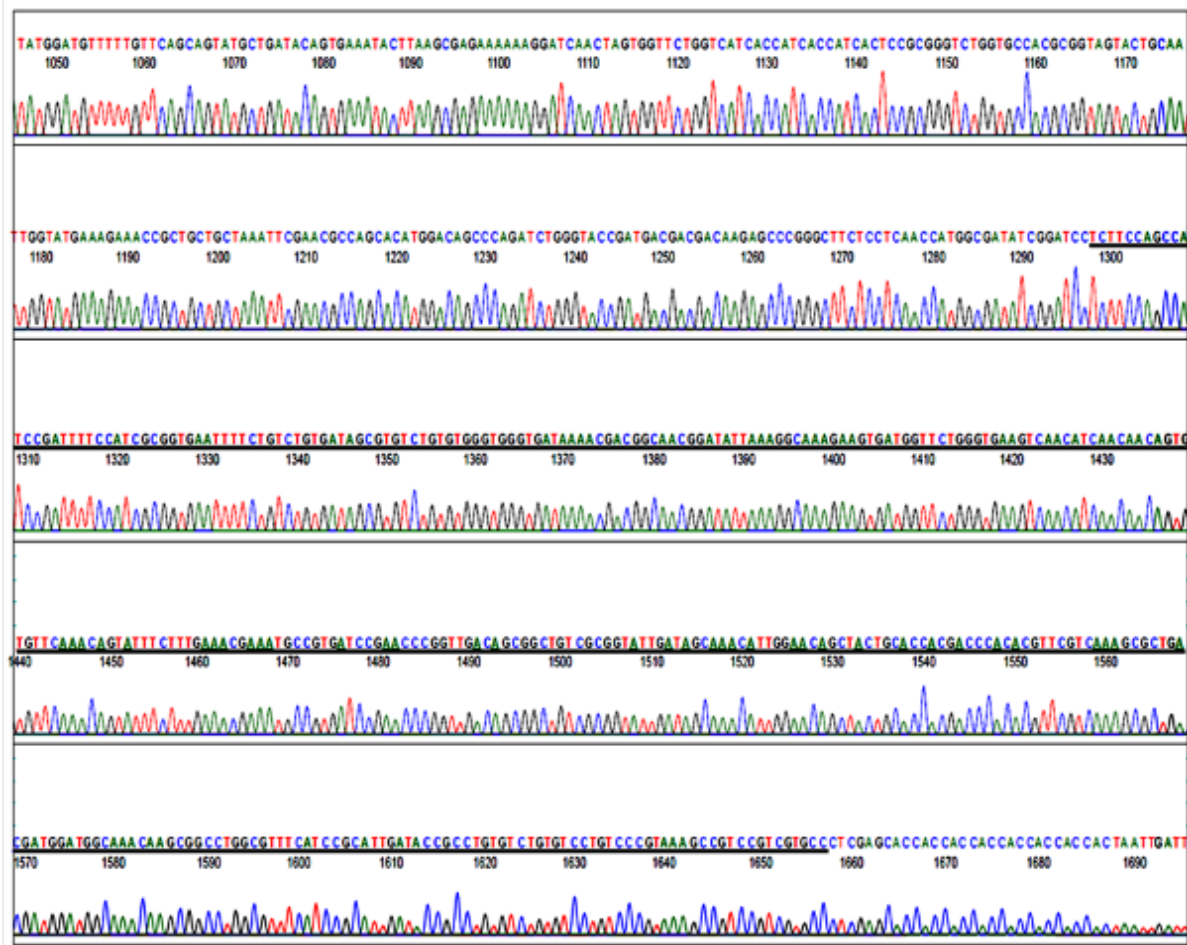
نمودار ۳: محدوده‌ی درصد ایده‌آل برای GC بین ۳۰ تا ۷۰ درصد می‌باشد. پیک‌های درصد GC در هر ۶۰ جفت باز حذف شد. قسمت A و B به ترتیب، قبل و بعد از بهینه سازی را نشان می‌دهند.

Optimized	7	TCTTCCAGCCATCCGATTTTCCATCGCGGTGAAATTTTCTGTCTGTGATAGCGTGTCTGTG
Original	7	TCATCATCCCATCCCATCTTCCACAGGGCGAATTCTCGGTGTGTGACAGTGTGACGCGTG
Optimized	67	TGGGTGGGTGATAAAACGACGGCAACGGATATTTAAAGGCAAAGAAAGTGTGTTCTGGGT
Original	67	TGGGTTGGGGATAAGACCACCGCCACAGACATCAAGGGCAAGGAGGTGTGTTGTTGGGA
Optimized	127	GAAGTCAACATCAACAACAGTGTGTTCAAACAGTATTTCTTTGAAACGAAATGCCGTGAT
Original	127	GAGGTGAACATTAACAACAGTGTATTCAAACAGTACTTTTTTGAGACCAAGTGCCGGGAC
Optimized	187	CCGAACCCGGTTGACAGCGGTGTCGCGGTATTGATAGCAAACATTGGAACAGCTACTGC
Original	187	CCAAATCCCGTTGACAGCGGTGCCGGGCATTGACTCAAAGCACTGGAACACTCATATTGT
Optimized	247	ACCACGACCCACACGTTTCGTCAAAGCGCTGACGATGGATGGCAAACAAGCGGCCTGGCGT
Original	247	ACCACGACTCACACCTTTGTCAAAGCGCTGACCATGGATGGCAAAGCAGGCTGCCTGGCGG
Optimized	307	TTCATCCGATTGATACCGCCTGTGTCTGTGTCTCTCCCGTAAAGCCGTCCGTCTGTGCC
Original	307	TTTATCCGGATAGATACCGCCTGTGTGTGTGTCTCAGCAGGAAGCTGTGAGAAGAGCC

شکل ۱: توالی بخش بالغ ژن  $\beta$ -NGF انسانی پس از انجام تغییرات در مقایسه با حالت اولیه. بازهای تغییر داده شده به رنگ قرمز نشان داده شده اند.

به درون باکتری های BL۲۱(DE۳)pLysS وکتور، از روش توالی یابی استفاده شد. و BL۲۱(DE۳) و تأیید صحت کلونینگ (شکل ۲) نتیجه توالی یابی را نشان می دهد. همانطور که ملاحظه میشود قطعه در قسمت روش ها انجام شد. به منظور تأیید حضور قطعه ژنی NGF در داخل مورد نظر بطور کامل و با جهت گیری صحیح به درون وکتور وارد شده است.





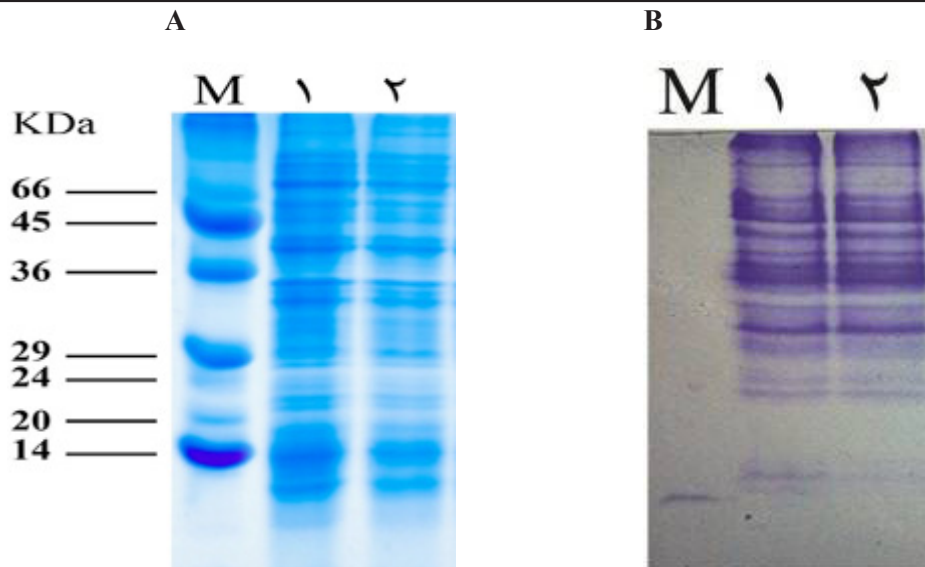
شکل ۲: تعیین توالی پلاسمید pET39b(+):hβNGF با استفاده از پرایمر TV terminator. ژن مورد نظر با خط مشکی مشخص شده است.

β-NGF انسانی و آنزیم اکسیداز DsbA می‌باشد. بنابراین باند مورد نظر می‌بایست در محدوده‌ی ۴۲-۴۴ kDa (وزن مولکولی آنزیم DsbA ۲۱ کیلودالتون می‌باشد) مشاهده شود.

همانطور که در (شکل ۳) قسمت A و B مشاهده می‌شود در محدوده‌ی ذکر شده بین نمونه‌های بیان و کنترل (پروتئین‌های استخراج شده از باکتری حاوی وکتور و بدون القاگر) در هر یک باکتری‌های

بررسی بیان پروتئین نوترکیب β-NGF انسانی در میزبان‌های BL21(DE3) pLysS و BL21(DE3) پس از القا با غلظت ۱ میلی مولار IPTG با استفاده از SDS-PAGE

پس از بیان پروتئین تحت شرایط ذکر شده در قسمت روش‌ها و استخراج کل محتوای پروتئینی، نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد الکتروفورز شدند. پروتئین بیان شده، فیوژن پروتئینی از



شکل ۳: قسمت A - طرح الکتروفورزی کل محتوای پروتئینی استخراج شده روی ژل ۱۲ SDS-PAGE درصد رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو مربوط به باکتری BL21(DE3)pLysS.

(۱) بیان پس از القا با غلظت ۱ میلی مولار IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت  
(۲) کنترل بدون القاگر

(M) مارکر وزن مولکولی پروتئین

قسمت B - طرح الکتروفورزی کل محتوای پروتئینی استخراج شده روی ژل ۱۲ SDS-PAGE درصد رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو مربوط به باکتری BL21(DE3).

(۱) بیان در حضور غلظت ۱ میلی مولار IPTG در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ ساعت  
(۲) کنترل بدون القاگر

(M) کنترل مثبت ( $\beta$ -NGF تجاری)

BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3) تفاوت خاصی بنظر نمی‌رسد.

pLysS و BL21(DE3) فاقد پلاسمید pET-39b::hNGF (کنترل منفی) روی کاغذ

نیتروسلولز لکه گذاری شدند. شکل ۴ نتیجه

تست فوق را نشان می دهد. همانطور که

ملاحظه میشود محتوای پروتئینی استخراج

شده از باکتری BL21(DE3)pLysS القا

شده با IPTG بصورت لکه ای کم رنگ

ظاهر شده است که نشان دهنده اتصال و

واکنش اختصاصی آنتی بادی مونوکلونال

ضد his-tag با پروتئین hNGF بیان شده

می باشد. در حالیکه پروتئین‌های استخراج

شده از کنترل منفی بدون القاگر و کنترل

BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS تفاوت

خاصی بنظر نمی‌رسد.

بررسی اختصاصی بیان با استفاده از

روش دات بلات

بدلیل عدم مشاهدهی تفاوت بر روی ژل

الکتروفورز، از روش اختصاصی تر دات بلات

استفاده شد. بدین منظور ۸ میکرولیتر از

پروتئین‌های استخراج شده از هر دو سویه

باکتری بدون القا با القاگر و پس از القا با

القاگر IPTG به همراه کل محتوای پروتئینی

استخراج شده از باکتری‌های BL21(DE3)



شکل ۴: طرح دات بلات پروتئین های استخراج شده از سویه های باکتریایی (DE<sub>3</sub>pLysS و DE<sub>3</sub> با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد his-tag.  
 ۱- وکتور منفی (DE<sub>3</sub>)pLysS  
 ۲- IPTG منفی (DE<sub>3</sub>)pLysS  
 ۳- بیان (DE<sub>3</sub>)pLysS  
 ۴- وکتور منفی DE<sub>3</sub>  
 ۵- IPTG منفی DE<sub>3</sub>  
 ۶ و ۷- دو کلنی متفاوت از بیان DE<sub>3</sub>

ژن  $\beta$ -NGF انسانی تحت کنترل پروموتور T7 جلوگیری می نماید. با در نظر گرفتن این دو مسئله و طبق داده های بدست آمده در این تحقیق، سویه ی BL21(DE3)pLysS برای بیان نوترکیب  $\beta$ -NGF انسانی میزبان مناسبی نمی باشد. به همین دلیل، در نمونه دات بلات القا شده ی آن، رنگ قابل ملاحظه ای مشاهده نشد و نمونه ی القا نشده (IPTG منفی) نیز بی رنگ باقی ماند. در مقابل، سویه ی BL21(DE3) بعنوان سویه ی مطلوب جهت تولید پری پلاسمی معرفی می گردد.

#### سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه تهران از دکتر زهرا حاجی حسن تحت شماره گرنت ۰۲/۰۶/۲۸۶۶۹ انجام شده است. همچنین نویسندگان از ستاد سلولهای بنیادی ریاست جمهوری به دلیل حمایت مالی به منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می نمایند.

منفی بدون پلاسمید، بی رنگ بودند. محتوای پروتئینی استخراج شده از دو کلنی متفاوت BL21(DE3) القا شده، بسیار پر رنگ بودند. همچنین پروتئین های استخراج شده از کنترل منفی بدون القاگر نیز تا حدودی رنگ گرفته بودند. درحالیکه کنترل منفی بدون پلاسمید، فاقد رنگ بود. مقایسه این نتایج نشان دهنده میزان بالای بیان در باکتری BL21(DE3) در مقایسه با باکتری BL21(DE3)pLysS می باشد.

#### بحث و نتیجه گیری

همانطور که اشاره شد پروتئین  $\beta$ -NGF انسانی نیازمند تشکیل صحیح سه پیوند دی سولفیدی در ساختار عملکردی خود می باشد که این مسئله منجر به دشواری بیان پروتئین مذکور می گردد. بعلاوه، پلاسمید pLysS موجود در سویه ی میزبانی BL21(DE3)pLysS با تولید لیزوزیم T7 باعث مهار RNA پلیمراز T7 شده و در نهایت از بیان پایه ای و نشستی

- Althaus, H.H. (2004). Remyelination in multiple sclerosis: a new role for neurotrophins?. *Progress in brain research*. 146: 415-432.
- Barnett, J., Baecker, P., Routledge-Ward, C., Bursztyn-Pettegrew, H., Chow, J., Nguyen, B., Bach, C., Chan, H., Tuszynski, M.H., Yoshida, K., et al. (1990). Human  $\beta$  nerve growth factor obtained from a baculovirus expression system has potent *in vitro* and *in vivo* neurotrophic activity. *Experimental Neurology*. 110: 11-24.
- Bax, B., Ferguson, G., Blaber, M., Sternberg, M.J. Walls, P.H. (1993). Prediction of the three-dimensional structures of the nerve growth factor and epidermal growth factor binding proteins (kallikreins) and an hypothetical structure of the high molecular weight complex of epidermal growth factor with its binding protein. *Protein Science*. 2: 1229-1241.
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 82: 240-251.
- Bruce, G., Heinrich, G. (1989). Production and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Neurobiology of Aging*. 10: 89-94.
- Dechant, G., Neumann, H. (2002). Neurotrophins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 513: 303-334.
- Dicou, E. (1992). Expression of recombinant human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Neurochemistry International*. 20: 129-134.
- Fahnestock, M. (1991). Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 165: 1-26.
- Fan, B.S., Lou, J.Y. (2010). Recombinant expression of human nerve growth factor beta in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular Biology Reports*. 37: 4083-4090.
- Fujimori, K., Fukuzono, S., Kotomura, N., Kuno, N., Shimizu, N. (1992). Overproduction of biologically-active human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56: 1985-1990.

- Heese, K., Low, J.W., Inoue, N. (2006). Nerve growth factor, neural stem cells and Alzheimer's Disease. *Neurosignals*. 15: 1-12.
- Ibáñez, C.F. (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends in Neurosciences*. 21: 438-444.
- Iwane, M., Kitamura, Y., Kaisho, Y., Yoshimura, K., Shintani, A., Sasada, R., Nakagawa, S., Kawahara, K., Nakahama, K., Kakinuma, A. (1990). Production, purification and characterization of biologically active recombinant human nerve growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 171: 116-122.
- Kawamoto, K., Matsuda, H. (2004). Nerve growth factor and wound healing. *Progress in Brain Research*. 146: 369-384.
- Kurokawa, Y., Yanagi, H., Yura, T. (2001). Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 14393-14399.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lambiase, A., Sacchetti, M., Bonini, S. (2012). Nerve growth factor therapy for corneal disease. *Current Opinion In Ophthalmology*. 23: 296-302.
- Levi-Montalcini, R. (1987). The nerve growth factor 35 years later. *Science*. 237: 1154-1162.
- McDonald, N.Q., Lapatto, R., Murray-Rust, J., Gunning, J., Wlodawer, A., Blundell, T.L. (1991). New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature*. 354: 411-414.
- Muangman, P., Muffley, L.A., Anthony, J.P., Spenny, M.L., Underwood, R.A., Olerud, J.E., Gibran, N.S. (2004). Nerve growth factor accelerates wound healing in diabetic mice. *Wound Repair and Regeneration*. 12: 44-52.
- Nguyen, B., Jarnagin, K., Williams, S., Chan, H., Barnett, J. (1993). Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human

- nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *Journal of Biotechnology*. 31: 205-217.
- Nishizawa, M., Ozawa, F., Higashizaki, T., Hirai, K., Hishinuma, F. (1993). Biologically active human and mouse nerve growth factors secreted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38: 624-630.
- Rattenholl, A., Lilie, H., Grossmann, A., Stern, A., Schwarz, E., Rudolph, R. (2001). The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *European Journal of Biochemistry*. 268: 3296-3303.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- Schmelzer, C.H., Burton, L.E., Chan, W.P., Martin, E., Gorman, C., Canova-Davis, E., Ling, V.T., Sliwkowski, M.B., McCray, G., Briggs, J.A., et al. (1992). Biochemical characterization of recombinant human nerve growth factor. *Journal of Neurochemistry*. 59: 1675-1683.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Savaria, D., Hamelin, J., Goulet, B., Laliberte, J., Lazure, C., ChreÂtien, M., Murphy, R.A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochemical Journal*. 314: 951-960.
- Snider, W.D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: What the knockouts are teaching us. *Cell*. 77: 627-638.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., et al. (1996). Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell*. 85: 345-356.
- Vigentini, I., Merico, A., Tutino, M.L., Compagno, C., Marino, G. (2006). Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Journal of Biotechnology*. 127: 141-150.
- Wiesmann, C., Ultsch, M.H., Bass, S.H., Vos A.M. de. (1999). Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature*. 401: 184-188.

---

Wiesmann, C., Vos A.M. de. (2001). Nerve growth factor: structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences. 58: 748-759.

