DOI: 10.22122/jims.v36i468.8870 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۶۸/هفته‌ی چهارم فروردین ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۶ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱/۲۲

تولید پپتید $YY_{(3-36)}$ در سیستم بیانی Escherichia Coli با استفاده از پروموتر خود القایی

امیرحسین مومن[۱]، بیژن بمبئی[۲]، ناصر هرزندی[۳]، اعظم حدادی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: استفاده از القاگرهای سمی، مانند Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)، در تولید زیست‌داروها بر اساس رهنمودهای سازمان‌های نظارتی ممنوع می‌باشد. از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی و بررسی امکان استفاده از سیستم‌های بیانی خود القایی برای تولید پپتید $YY_{(3-36)}$ به عنوان یک ماده‌ی اولیه‌ی دارویی (Active pharmaceutical ingredient یا API) در سیستم بیانی Escherichia coli انجام شد.

روش‌ها: توالی پروموتر خود القایی با استفاده بانک‌های اطلاعاتی به دست آمد. سپس، توالی مورد نظر در وکتور pUC18 سنتز شد. ژن کد کننده‌ی $YY_{(3-36)}$ نیز با سنتز پرایمر در انتهای ۳' پروموتر قرار داده شد. البته، جهت بیان خارج سلولی، یک توالی ۲۲ اسید آمینه‌ای سیگنال ترشحی آنزیم آسپاراژیناز در قسمت بالادستی ژن پپتید مورد نظر قرار داده شد. پس از آماده‌سازی باکتری Escherichia coli از وکتور pUC18 برای انتقال ژن به باکتری استفاده شد. سپس، با مقایسه‌ی بیان ژن پپتید در سیستم بیانی pET22 به عنوان شاهد مثبت، بیان پپتید در دو حالت خودالقایی و استفاده از IPTG با استفاده از ژل الکتروفورز بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان بیان با پروموتر خود القاگر در مقایسه با شاهد مثبت (IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار) مناسب بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه‌ی حاضر حاکی از سهولت و اقتصادی بودن کاربرد پروموتر انتخابی در تولید زیست‌داروهای با ارزش افزوده‌ی بالا می‌باشد.

واژگان کلیدی: باکتری Escherichia coli، پپتید YY، پروموتر

ارجاع: مومن امیرحسین، بمبئی بیژن، هرزندی ناصر، حدادی اعظم. **تولید پپتید $YY_{(3-36)}$ در سیستم بیانی Escherichia Coli با استفاده از پروموتر خود القایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۶۸): ۱۲۳-۱۱۸

مقدمه

تولید محصولات دارویی مهم از منابع طبیعی آن‌ها، اغلب به میزان بسیار اندک و با صرف هزینه‌ی بالایی صورت می‌گیرد. تولید این پروتئین‌ها توسط سلول‌های سالم بسیار کم انجام می‌شود. بنابراین، راه آسان‌تر برای نیل به این هدف، استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک است. در سال‌های اخیر نیز پژوهش‌های گسترده‌ای برای تولید داروهای نوترکیب از طریق میکروارگانیسم‌ها، حیوانات ترانس‌ژنیک، گیاهان و جانداران دریایی مورد توجه قرار گرفته است (۱).

به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب، سیستم‌های بیانی مختلفی توسط دانشمندان استفاده و به طور تجاری بهره‌برداری شده‌اند (۲). مزیت‌های بسیاری برای استفاده از سیستم بیانی Escherichia coli به اثبات رسیده و آن را یک میکروارگانیسم ارزشمند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سطوح بالا باقی گذارده است. ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی بسیار شناخته شده‌ی این باکتری، تکثیر در زمان کوتاه، آسان بودن دست‌ورزی آن، دانش اثبات شده‌ی فرمانتاسیون و در نهایت، ظرفیت بالا برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب (تا بیش از ۲۰ درصد از محتوای پروتئین کل سلولی)، Escherichia coli را یکی از پرکاربردترین میزبان‌ها جهت تولید پروتئین نوترکیب ساخته است (۳-۲). بسیاری از پروتئین‌های یوکاریوتی، فعالیت زیستی کامل خود را در شکل غیر گلیکوزیله حفظ می‌کنند و بنابراین، در Escherichia coli می‌توانند تولید شوند. به علاوه، برخی از پیشرفت‌ها نظیر بیان پریپلاسمی، افزایش میزان پروتئین به شکل محلول و تولید پروتئین با تشکیل باندهای دی‌سولفیدی صحیح را امکان‌پذیر ساخته است (۵-۴).

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

۲- استادیار، گروه زیست‌فن‌آوری سامانه‌ای، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فن‌آوری، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: بیژن بمبئی

Email: bambai@nigeb.ac.ir

در فن‌آوری DNA نوترکیب، ژن هدف به پروموتری قابل کنترل متصل می‌شود. این پروموتر، با افزودن القاگر فعال می‌شود و فرایند نسخه‌برداری آغاز می‌گردد. در بیشتر موارد، القاگر نظیر IPTG، مالتوز و یا تتراسایکلین توسط سلول جذب می‌شود یا از طریق غشای سیتوپلاسمی به درون سلول نفوذ می‌نماید (۷-۶). القاگرها، همچنین می‌توانند از دسته‌ی تنش‌ها مانند کاهش ناگهانی دمای کشت باشند. در هر سامانه‌ی بیانی، پروموتر باید به شدت تحت کنترل باشد. به عبارت دیگر، لازم است در نبود القاگر میزان بیان بسیار پایین و با افزودن القاگر میزان بیان بسیار بالا باشد تا حدود ۳۰-۱۰ درصد کل پروتئین سلولی حاصل شود (۹-۸).

به طور کلی، سه نوع پروموتر شامل پروموتر با القاگر ویژه، پروموترهای وابسته به مرحله‌ی رشد و تحت تنش خاص و پروموترهایی با توانایی خود القایی وجود دارند (۱۱-۱۰).

در این تحقیق، با توجه به اهمیت ژن YY، سعی بر تولید پپتید $YY_{(3-36)}$ از طریق سیستم بیانی باکتریایی شد. این پپتید، توسط سلول‌های L و ایلئوم تولید می‌شود که با همکاری پروتئین گرلین (Gerlin)، سبب ایجاد احساس سیری در انسان می‌شود که خود با تأثیر بر بخش هیپوتالاموس مغز، سبب ترشح این پروتئین‌ها می‌شود. طراحی وکتور به نحوی صورت گرفت که با استفاده از پروموتر خود القاگر، نیازی به پروموتر IPTG نباشد.

یکی از مشکلات عمده که در سیستم‌های بیانی نظیر سیستم بیانی Escherichia coli وجود دارد، استفاد از القاگرهایی همچون Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) می‌باشد. این القا کننده، سمی است و از آن جایی که در تولید پپتیدهای دارویی این مسأله اهمیت ویژه‌ای دارد، مطالعه‌ی حاضر با هدف ارزیابی و بررسی امکان استفاده از سیستم‌های بیانی خود القایی برای تولید پپتید $YY_{(3-36)}$ به عنوان یک ماده‌ی اولیه‌ی دارویی (Active pharmaceutical ingredient یا API) انجام شد.

روش‌ها

الف) طراحی و ساخت سازواره‌ی pUC18 و بررسی بیان آن در Escherichia coli: ژن کد کننده‌ی آنزیم YY-36 کلون شده در سامانه‌ی بیانی PUC18 پس از بیان در باکتری Escherichia coli سویه‌ی BL21 به صورت اجسام توده‌ای بیان شد. بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر تصمیم بر این شد که ژن کد کننده‌ی سیگنال پپتید پروتئین ANSB II به ناحیه‌ی N– ترمینال ژن کد کننده‌ی آنزیم محدود کننده‌ی YY-36 متصل شود و این سازه‌ی ژنی (S-YY-36) پس از ساخت در حامل pUC18 همسان‌سازی شود تا در نهایت سازواره‌ی pUC18-S-YY-36 ساخته شود و سیگنال پپتید ANSB II با استفاده از سیستم انتقال SEC پپتید را به محیط کشت باکتری ترشح کند. انتقال پروتئین‌های بیان شده به فضای خارج از سیتوپلاسم، مانع از تجمع پروتئین‌ها در سیتوپلاسم و گیر افتادن پروتئین‌های بیان شده در اجسام توده‌ای می‌شود. سیگنال ANSB II در مطالعات گذشته نیز استفاده شده است و چند پروتئین با استفاده از این سیگنال به محیط ترشح شده‌اند (۱۳-۱۲).

ب) تهیه‌ی باکتری‌های مستعد برای پذیرش DNA پلاسمیدی خارجی: برای انتقال DNA به داخل سلول‌های میزبان، به روش زیر که روش فیزیکی مبتنی بر نمک $CaCl_2$ و سرما است، سلول‌های مستعد تهیه شدند (۱۴). به طور خلاصه، یک کلنی از کشت باکتری Escherichia coli سویه‌ی BL21 در ۳ میلی‌لیتر محیط Luria-Bertani (LB) مایع بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و این کشت به صورت شبانه در انکوباتور دارای Shaker با دور هم‌زن ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور کنترل تغییر شکل و انتقال DNA به داخل سلول و همچنین، بررسی عدم آلودگی سلول‌های مستعد دو واکنش تراریختی شامل انجام مراحل تغییر شکل بدون افزودن پلاسمید به عنوان شاهد منفی و انجام مراحل تغییر شکل با DNA حامل فاقد ژن YY-36 به عنوان شاهد مثبت انجام شد.

القای بیان ژن آنزیم محدود کننده‌ی YY-36 با IPTG و تأیید بیان با تکنیک Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE):

کشت باکتری Escherichia coli و القای بیان در آن با IPTG: کشت باکتری *Escherichia coli* سویه‌ی بیانی DE3 دارای سازه‌ی pUC18-YY-36 (پلاسمید pUC18 که در آن ژن YY-36 کلون شده است)، یک کلونی منفرد از کلونی‌های حاصل از تغییر شکل در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB و در صورت لزوم آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میکرولیتر کشت داده شد و برای رشد به صورت شبانه (۱۶ ساعت) در انکوباتور دارای Shaker با شتاب ۲۰۰-۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۴، ۱).

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR): در این مطالعه، ابتدا در مرحله‌ی اول PCR در دو واکنش PCR مجزا، ژن کد کننده‌ی YY-36و ژن سیگنال پپتید AnsB II به کمک پرایمرهای اختصاصی YY-36F2 (GGGGGAATTCTGAAACTGCCGGAAACCG) و YY-36R5 (GGGGCTCGAGCTTACACGCGCCAGCACA) تکثیر شد و در PCR مرحله‌ی دوم (جدول ۱ و ۲) این دو ژن به هم متصل شدند؛ بدین نحو که با شروع مرحله دوم و سوم قطعات

کوچکتر تشکیل شده در مرحله اول به یکدیگر متصل می شوند و یک قطعه بزرگتر را تشکیل می دهند . مراحل در شکل ۱ آمده است.

جدول ۱. اجزای مورد استفاده در واکنش Polymerase chain reaction (PCR) در حضور آنزیم Pyrococcus furiosus (Pfu)

ترکیبات	مقادیر (ماکرولیتر)
Pfu master mix	–
پرایمر Forward (با غلظت ۱۰ ng/µl)	۱
پرایمر Reverse (با غلظت ۱۰ ng/µl)	۱
الگو (pUC18-YY-36) (با غلظت	۱
H_2O	بیشتر از ۲۰

بررسی بیان سازه‌ی pCU18-YY-36 در باکتری Escherichia coli: یک کلونی صحیح تراریخت در حضور آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مناسب در محیط LB کشت داده شد و سپس میزان ۵ میلی‌لیتر از آن به ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب تلقیح شد. وقتی که OD_{600nm} محیط کشت به حدود ۰/۴ رسید، با IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار القا شد. از کشت باکتری، نمونه‌های قبل و بعد از القا تهیه شد و پس از سونیکیت کردن محیط کشت و لیز باکتری، سانتریفیوژ با شتاب ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد و از رسوب و سربارهٔ آن نمونه تهیه گردید. به نمونه‌های تهیه شده به میزان مناسب Sample buffer اضافه شد و پس از قرار گرفتن به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش، نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید آماده شد.

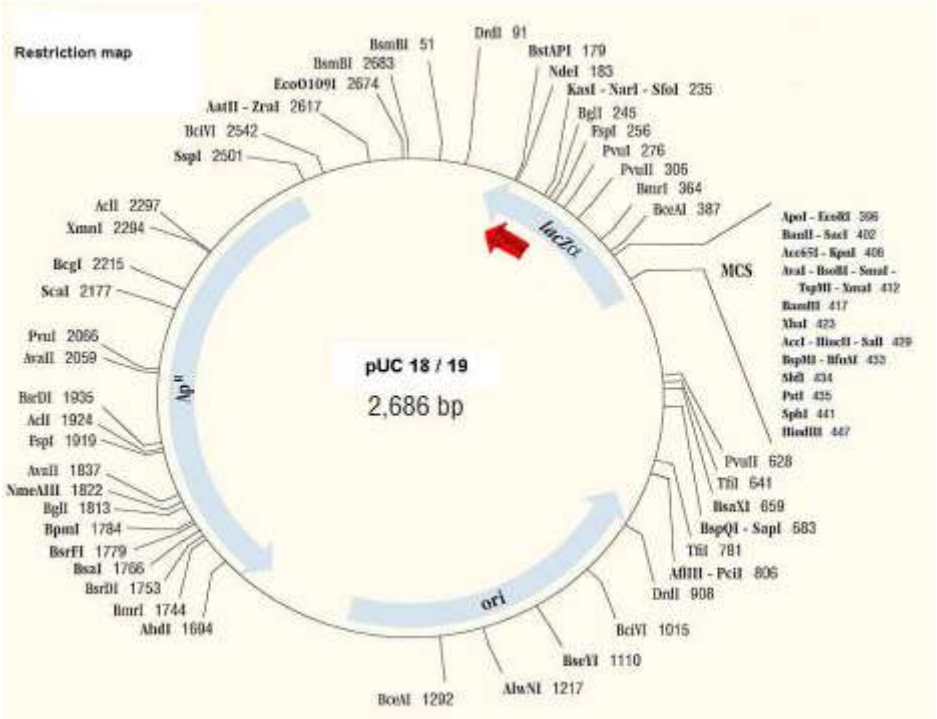
جدول ۲. برنامه‌ی استفاده شده جهت تکثیر ژن YY-36

تعداد چرخه	زمان	دما	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد	واسرشت‌سازی اولیه
۳۰	۱ دقیقه	۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد	واسرشت‌سازی
	۹۰ ثانیه	۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد	اتصال
	۱ دقیقه	۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد	طویل شدن
۱	۵ دقیقه	۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد	طویل شدن نهایی

ج) ترشح خارج سلولی پروتئین با استفاده از توالی ترشحی

آنزیم آسپاراژیناز: محصولات ترشحی پروتئین‌های نوترکیبی، مزایایی را نسبت به محصولات سیتولیتیک فراهم می‌کنند. به عنوان مثال، انتهای آمینی باقی مانده‌ی پروتئین مترشحه بعد از جدایی توالی نشانه به وسیله‌ی سیگنال پپتیدهای خاص، با محصول طبیعی ژن یکسان باشد. همچنین، فعالیت پروتئازی در فضای پری‌پلاسمی نسبت به فضای سیتوپلاسمی کمتر رخ می‌دهد.

در آخر، بیان پروتئین به روش SDS-PAGE مشخص گردید و میزان بیان در مقایسه با القاگر IPTG مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱. نقشه‌ی ژنی پلاسمید همراه با پپتید متصل شده؛ فلش کوچک، پپتید YY را متصل به پلاسمید نشان می‌دهد.

AGCGGGGCTGGCGTCAGCCAGCTTCCACTTAAGCGAGATCTATATCGGCATCGGTTAGCCATAACCATTTTACCTGTCCG
GCGGCCTTAATACCTTGATCAGATGGTTCGTGGTGTTGTTACCTTGCCGAAGGGCACCGGTAAAAATGTTCGCGTCGGTG
TTTTCGCCCGTGGCCCGAAAGCTGAAGAAGCTAAAGCTGCTGGTGCAGAAGTTGTCGGCGCAGAAGACCTGATGGAAGCC
ATTCAGGGCGGCAGCATTGATTTCGATCGTGATGCCCTTTATACTGAAATTGCCTTGCGCTGCCATAATGAAGCAGCCTC
CGGTGTTTTGGCAGATTTAAAATACTTGACATATCACTGTGATTCACATATAATATGCGGAGGTACCCACCATATGGAG

M E

NheI

TTT TTC AAA AAG ACG GCA CTT GCC GCA CTG GTT ATG GGT TTT AGT GGT GCA GCG CTA GCC GCC

F F K K T A L A A L V M G F S G A A L A A

AAA CCG GAG GCT CCA GGC GAG GAC GCG AGT CCG GAG GAA CTG TCG CGC TAC TAT GCC AGT CTC

K P E A P G E D A S P E E L S R Y Y A S L

XhoI

CGT CAC TAT CTG AAT CTG GTG ACG CGT CAA CGC TAC TGA TAG TAG CTCGAG

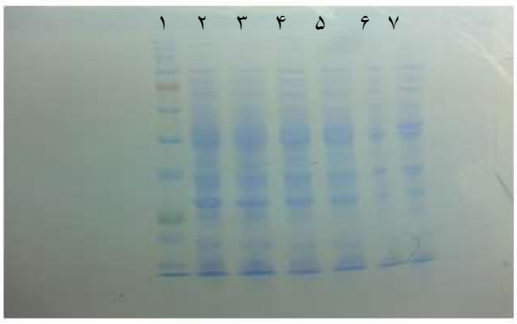
R H Y L N L V T R Q R Y * * *

شکل ۲. توالی نوکلئوتیدی و ترجمه‌ی اسیدهای آمینه‌ی پروموتر و پپتید $YY_{(3-36)}$ به همراه جایگاه‌های برش طراحی شده در سازه‌ی ژنی

یافته‌ها

۱- طراحی ژن پپتید *$YY_{(3-36)}$*: سازه‌ی ژنی طراحی شده مطابق شکل در وکتور *pUC18* جای‌گذاری شد. مطابق شکل ۲، با تغییر توالی پروموتر که با رنگ آبی در ابتدای جایگاه برش مشخص شده است، پروموتر خود القایی مورد آزمایش قرار گرفت و با پروموتر IPTG به عنوان شاهد مقایسه شد.

۲- بیان پپتید: با تغییر توالی پیش‌گفته در پروموتر، پپتید در سطح مناسبی بیان شد که نتیجه‌ی بیان پپتید در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳. تصویر الکتروفورز بیان پپتید؛ مقایسه‌ی بیان پپتید در زمان‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت توسط وکتور خود القایی (خطوط ۲، ۴ و ۶) با بیان استاندارد تحت القای Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (خطوط ۳، ۵ و ۷)، خط یک نیز استاندارد وزن مولکولی می‌باشد.

بحث

پروموترها به عنوان توالی از DNA که رونویسی ژن‌ها را کنترل می‌کنند، نقش به‌سزایی در تعیین میزان بیان پروتئین‌ها و حفظ تعادل سلولی و فیزیولوژی سلول از نظر رشد، تقسیم سلولی و تولید متابولیت‌های ثانویه بر عهده دارند. نقش پروموتر در تعیین میزان رونویسی توالی پایین‌دستی آن، بارز می‌گردد. پروموتر lac یکی از قدیمی‌ترین و پر مصرف‌ترین پروموترهای موجود در بیولوژی مولکولی و زیست‌فن‌آوری می‌باشد. در این مطالعه، توالی‌های جدید پروموتری جهت جایگزینی توالی lac بررسی گردید. توالی پروموتر استاندارد lac شامل دو منطقه‌ی اصلی ۱۰- و ۳۵- است. acccaggctttacactttatgcttccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcgg که رنگ سبز منطقه‌ی ۱۰- و رنگ آبی روشن منطقه‌ی ۳۵- را نشان می‌دهد.

البته، مطالعات دیگری نیز در گذشته به بررسی توالی‌های احتمالی دیگری از پروموترها اقدام کرده بودند. به عنوان مثال، Heiss و همکاران، پروموترهای القاگر متفاوتی را در باکتری Lactobacillus plantarum مورد بررسی قرار دادند و با توجه به نتایج به دست آمده، پیشنهاد دادند که در مقیاس صنعتی، این تحقیقات انجام شود (۱۵).

در همین راستا، پروموترهای متعددی معرفی شدند که در سیستم بیانی Escherichia coli پروموتر T7IPTG که ماده‌ی القاگر این پروموتر است. البته، هنوز برای تولید پروتئین‌های با مصرف انسانی، نیاز به پروموترهای جدید که نیاز به القاگر نداشته باشند، احساس می‌شود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی این است که می‌توان با تغییرات نوکلئوتیدی در پروموترهای نه چندان قوی، بیان ژن‌ها توسط این پروموترها برای پپتیدهای دارویی را القا نمود.

نتیجه‌گیری نهایی این که نتایج به دست آمده از ژل SDS-PAGE بیان به نسبت خوبی از پلاسمید را نشان می دهد که نیاز به IPGT را برطرف می‌کند. با توجه به میزان بیان توسط پروموتر T7 که خود القاگر می‌باشد، توالی پروموتر استفاده شده در این مطالعه attcacatataatatgcggaggtaccc بود که با توجه به شکل

۲ محل جای‌گذاری این توالی به نحوی بوده است که بهترین بازدهی را داشته باشد.

پیشنهاد می‌شود که با تغییراتی در توالی خود القاگرها، امکان تهیه‌ی پروموترهای قوی‌تر و کاراتر بررسی شود. مقایسه‌ی این توالی با توالی استاندارد T7 نشان می‌دهد که بازهای موقعیت ۸- تا ۱۱- را می‌توان تغییر داد و در عین آن که نیاز به IPTG به عنوان القاگر برطرف می‌شود، می‌توان به یک بیان پایه‌ای دست یافت که این امر، می‌تواند در مورد مواد اولیه‌ی دارویی مفید باشد. البته، در تحقیقات بعدی می‌توان به نقش بازهای منطقه‌ی ۳۵- پرداخت که هنوز امکان بهینه‌سازی در آن به شدت احساس می‌شود.

در سیستم القایی T7، این منطقه شامل tttaca می‌باشد که البته در سیستم بیانی حاضر، از توالی atactt استفاده شده است. در تحقیقات بعدی، می‌توان از توالی استاندارد یا از سایر توالی‌های دیگر استفاده نمود. امروزه، با تکنیک‌های تعیین توالی RNA که در آن کلیه‌ی RNAهای سلولی تعیین توالی می‌شوند، به شناسایی پروموترهای جدید کمک شایانی شده است که می‌توان با کنکاش در بانک‌های اطلاعاتی حاوی اطلاعات خام این دسته از توالی‌ها، اقدام به شناسایی و آزمایش میزان بیان پروموترهای کمتر شناخته شده نمود. برای مثال، Conway و همکاران، توانستند با استفاده از این تکنیک، ساختار اپرون‌های میکربی را با دقت بالای غیر قابل انتظاری نمایش دهند (۱۶).

تشکر و قدردانی

از تمامی اعضای هیأت علمی و کارکنان محترم پژوهشگاه ژنتیک و زیست‌فن‌آوری و همچنین، از آقای دکتر لطف‌اله کریمی که ویرایش چکیده‌ی انگلیسی را قبول زحمت نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. این مطالعه در راستای دفاع از پایان‌نامه‌ی دکتری تخصصی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج صورت پذیرفته است.

References

1. Bashyam MD, Tyagi AK. Identification and analysis of "extended -10" promoters from mycobacteria. J Bacteriol 1998; 180(9): 2568-73.
2. Ojala V, Laitalainen J, Jalasvuori M. Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance. Evol Appl 2013; 6(6): 925-32.
3. Campbell JL, Richardson CC, Studier FW. Genetic recombination and complementation between bacteriophage T7 and cloned fragments of T7 DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75(5): 2276-80.
4. Adham SA, Rodriguez S, Ramos A, Santamaria RI, Gil JA. Improved vectors for transcriptional/translational signal screening in corynebacteria using the melC operon from Streptomyces glaucescens as reporter. Arch Microbiol 2003; 180(1): 53-9.
5. Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FW. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81(7): 2035-9.
6. Backman K, Ptashne M, Gilbert W. Construction of plasmids carrying the cI gene of bacteriophage lambda. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73(11): 4174-8.
7. 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.
8. Carter AD, Morris CE, McAllister WT. Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7 DNA. J Virol 1981; 37(2): 636-42.
9. Fazen CH, Kahkoska AR, Doyle RP. Expression and purification of human PYY(3-36) in Escherichia coli using a His-tagged small ubiquitin-like modifier fusion. Protein Expr Purif 2012; 85(1): 51-9.
10. Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli. Appl Microbiol Biotechnol 2004; 64(5): 625-35.
11. Ehira S, Teramoto H, Inui M, Yukawa H. Regulation of Corynebacterium glutamicum heat shock response by the extracytoplasmic-function sigma factor SigH and transcriptional regulators HspR and HrcA. J Bacteriol 2009; 191(9): 2964-72.
12. Mahboobi M, Sedighian H, Hedayati CH M, Bambai B, Esmaeil Soofian S, et al. Applying bioinformatic tools for modeling and modifying type II E. coli l-asparginase to present a better therapeutic agent/drug for acute lymphoblastic leukemia. Int J Cancer Manag. 2017; 10(3): e5785.
13. Maxam AM, Gilbert W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol 1980; 65(1): 499-560.
14. McAllister WT, Morris C, Rosenberg AH, Studier FW. Utilization of bacteriophage T7 late promoters in recombinant plasmids during infection. J Mol Biol 1981; 153(3): 527-44.
15. Heiss S, Hormann A, Tauer C, Sonnleitner M, Egger E, Grabherr R, et al. Evaluation of novel inducible promoter/repressor systems for recombinant protein expression in Lactobacillus plantarum. Microb Cell Fact 2016; 15: 50.
16. Conway T, Creecy JP, Maddox SM, Grissom JE, Conkle TL, Shadid TM, et al. Unprecedented high-resolution view of bacterial operon architecture revealed by RNA sequencing. MBio 2014; 5(4): e01442-14.

DOI: 10.22122/jims.v36i468.8870 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 468, 4th Week, April 2018**

Received: 26.09.2017 Accepted: 17.12.2017 Published: 11.04.2018

Production of YY Peptides in the Escherichia Coli Expression System Using Self-Induction Promoter

Amirhossein Momen[1], Bijan Bambai[2], Naser Harzandi[3], Azam Hadadi[3]

Original Article

Abstract

Background: Application of toxic inducers, i.e. isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), for production of biopharmaceuticals has been prohibited by regulatory agencies. Here, we sought to evaluate the feasibility of a self-induced expression system for production of $YY_{(3-36)}$ peptide as an active pharmaceutical ingredient (API) in the Escherichia coli expression system.

Methods: The sequence of self-induced promoter was obtained from Data banks, and synthetized in pUC18 vector. The nucleotide sequence of $YY_{(3-36)}$ was inserted downstream of the promoter, after the 22 residue of asparaginase II signal sequence. The expression of the peptide was compared with pET21 harboring the same construct under isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside induction in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Findings: The expression of target peptide was comparable with isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (1 mM) expressed peptide.

Conclusion: Our results demonstrate the ease and economical application of used self-induced promoter as an alternative system in production of high value added biopharmaceuticals.

Keywords: Escherichia coli, Peptide YY, Promoter

Citation: Momen A, Bambai B, Harzandi N, Hadadi A. **Production of YY Peptides in the Escherichia Coli Expression System Using Self-Induction Promoter.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(468): 118-23.

1- PhD Student, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Assistant Professor, Department of System Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Corresponding Author: Bijan Bambai, Email: bambai@nigeb.ac.ir