مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۳/هفته سوم دی ماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۲

کلون و بیان مولکولی ژن رتپلاز در سلول‌های باکتری اشرشیا کلی با استفاده از پروموتر tac

صفیه آقاعبداللهیان[۱]، دکتر محمد ربانی[۲]، دکتر کامران قائدی[۳]، دکتر حمید میرمحمد صادقی[۲]

چکیده

مقدمه: این مطالعه با هدف کلون و بیان cDNA رتپلاز، داروی ترومبولیتیک مورد استفاده در درمان انفارکتوس میوکارد و سکته‌ی مغزی، و با کنترل پروموتر tac در سلول‌های E. Coli (Escherichia coli) طراحی شد.

روش‌ها: ژن رتپلاز با استفاده از پرایمرهای مناسب و طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) تکثیر شد. محصول به دست‌آمده در پلاسمید pTZ57R کلون گردید. DNA به دست آمده توسط آنزیم‌های محدودکننده برش داده شد و به درون وکتور بیانی pGEX-5x-1 وارد گردید. وجود قطعه‌ی واردشده در وکتور بیانی با کمک هضم آنزیمی و تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید شد. بیان رتپلاز موجود در سلول‌های E. Coli TOP10 با استفاده از افزودن غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میکرومول از IPTG (Isopropyl beta-D thiogalactopyranoside) القا شد و سپس تحت آنالیز با SDS-PAGE قرار گرفت.

یافته‌ها: الکتروفورز محصول PCR و همچنین هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R نوترکیب، باند ۱۰۶۸ جفت بازی رتپلاز را نشان داد. آنالیز SDS-PAGE نشان دهنده‌ی یک باند پروتئین ۶۰ کیلودالتونی بود که در اثر القای بیان با IPTG تولید شده بود.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه cDNA رتپلاز با استفاده از پروموتر tac در سلول‌های E. Coli به طور موفقیت‌آمیزی کلون و بیان شد.

واژگان کلیدی: رتپلاز، t-PA، پروموتر tac، کلون کردن، اشرشیا کلی

مقدمه

رتپلاز (Recombinant tissue plasminogen activator یا r-PA) از دسته‌ی داروهای ترومبولیتیک نسل سوم است که پلاسمینوژن متصل‌شده به فیبرین را فعال می‌کند (۲-۱). این دارو برای درمان اختلالات انسدادی به خصوص انفارکتوس میوکارد که عامل بیش از ۵۰ درصد مرگ و میرهای ناشی از حوادث قلبی عروقی است، به کار می‌رود (۶-۳). مزیت‌های بالینی t-PA (Tissue plasminogen activator) از جمله فقدان عوارض جانبی مثل خونریزی سیستمیک و همچنین صرفه‌ی اقتصادی تولید آن، باعث جذب تلاش‌های محققان در جهت تولید نوع نوترکیب آن شده است (۷، ۲-۱). رتپلاز در مقایسه با t-PA غیر گلیکوزیله است که نیمه عمر بالاتری دارد و در سیستم‌های متعدد باکتریایی، قارچی و حشرات بیان شده است (۹-۸، ۴).

تفاوت سطح بیان پروتئین نوترکیب و مشکلات ناپایداری پروتئین تولید شده و نیز فرایندهای فرودستی باعث شده است که هر سیستم بیانی با توجه

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۸۹۳۸۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] دانشجوی دکترای داروسازی، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حمید میرمحمد صادقی
Email: h_sadegh@pharm.mui.ac.ir

به قابلیت‌های بیانی ویژه‌ای که دارد، مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات قابل توجهی در زمینه‌ی بیان t-PA نوترکیب در سیستم‌های باکتریایی مثل E. Coli (Escherichia coli) وجود دارد. با این حال پلاسمیدهای کلونینگ و بیانی متعدد و نیز شرایط بیان روی بازده و ویژگی‌های رتپلاز تولید شده مؤثر هستند. یکی از قوی‌ترین پروموترها در E. Coli پروموتر tac است که هیبریدی از پروموترهای trp و lac UV5 می‌باشد (۱۱-۱۰) و کارایی آن ۲ تا ۳ برابر بیشتر از پروموتر trp و ۷ بار بیشتر از پروموتر lac UV5 است. این پروموتر توسط ریپرسور lac سرکوب می‌شود و با IPTG (Isopropyl beta-D thiogalactopyranoside) القا می‌گردد.

از ویژگی‌های پروتئین بیان شده‌ی تحت کنترل این پروموتر، حالت هم‌جوش بودن محصول با پروتئین gst (Glutathione S-transferase) است. این مسأله سبب تسهیل در فرایند خالص‌سازی می‌گردد (۱۲، ۱۰). با توجه به معایبی همچون گلیکوزیله شدن محصول و کلیرانس سریع آن از خون، آلودگی محصول با ویروس‌ها و بالا بودن هزینه‌های خالص‌سازی محصول که هر کدام از سیستم‌های مورد استفاده در مطالعات قبل داشته‌اند (۸، ۴، ۱) و نیز با در نظر گرفتن مزایای بیان در سیستم‌های باکتریایی مانند عدم گلیکوزیلاسیون محصول، کشت سریع، هزینه‌ی کمتر فرایندهای پایین دستی و در نتیجه‌ی آن صرفه‌ی اقتصادی تولید (۴)، در این مطالعه ژن r-PA با استفاده از پروموتر tac در سلول‌های E. Coli کلون و بیان شد (۱۳).

روش‌ها

گونه‌های باکتریایی E. Coli XL1-blue، BL21 (DE3) و TOP10 از شرکت سیناژن ایران خریداری شدند. آنزیم‌های باکتریایی، پرایمرها، مواد شیمیایی و پلاسمیدها، آنزیم‌های محدودکننده، مواد مورد استفاده در SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) و دیگر آنزیم‌ها و مواد مورد استفاده نیز از شرکت Fermentase خریداری شدند. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) از فناوری کوثر ایران خریداری شدند.

تکثیر و کلونینگ r-PA cDNA

pETret، پلاسمید نوترکیب حاوی cDNA رتپلاز، به عنوان الگو در واکنش تکثیر ژن توسط PCR استفاده شد. واکنش PCR با کمک پرایمرهای طراحی شده با توالی نوکلئوتیدی:

Forward primer:
5′CGGCGCGGATCCCCATGTCTTACCAAG GAAACAGTGACTGCTAC3′
Reverse primer:
5′GAACCGCTCGAGTCACGGTCGCATGTT GTCACGAATCCAG3′

در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر و طبق سیکل دمایی شامل مرحله‌ی دناتوراسیون در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR استخراج شد و با استفاده از کیت Ins T/A clone (Fermentas, Poland) به درون پلاسمید pTZ57R وارد شد.

پس از آن به روش شوک حرارتی (۱۴) در سلول‌های باکتری E. Coli XL1-blue ترانسفورم گردید. سپس پلاسمیدهای حاصل از کلونی‌های به دست آمده،

بر طبق دستورالعمل کیت Aurum plasmid min (Roche, Germany) استخراج شدند.

ساخت وکتور بیانی نوترکیب

پلاسمید نوترکیب PTZ57R/r-PA و وکتور بیانی pGEX-5x-1، به طور جداگانه با آنزیم‌های محدودکننده‌ی BamHI و XhoI هضم آنزیمی شدند. وکتور بیانی pGEX-5x-1 برش داده شده استخراج گردید و پس از آن، انتهای '۵ آن با استفاده از آلکالین فسفاتاز دفسفریله شد. cDNA رتپلاز حاصل از هضم آنزیمی PTZ57R/r-PA نیز استخراج گردید و تعیین مقدار شد و به درون وکتور بیانی pGEX-5x-1 برش داده شده، وارد گردید. محصول به دست‌آمده در سلول‌های E. Coli BL21 (DE3) ترانسفورم شد. پلاسمید نوترکیب حاصل با روش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی BamHI و XhoI، و تعیین توالی DNA تأیید گردید.

بیان رتپلاز در E. Coli

پلاسمید نوترکیب حاصل، rpGEX (pGEX-5x-1/r-PA)، در سلول‌های E. Coli TOP10 به روش کلسیم کلراید ترانسفورم شد. پلاسمید pGEX-5x-1 برای ترانسفورم کردن سلول‌های TOP10 به عنوان شاهد منفی به کار رفت. سلول‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB agar حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین (Roche, Germany) و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد داده شدند. یکی از کلونی‌های حاصل در ۵ میلی‌لیتر محیط LB تلقیح گردید. پس از کشت شبانه، ۲۰۰ میکرولیتر از آن به فلاسک حاوی ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت LB تازه و حاوی آمپی‌سیلین منتقل گردید.

علاوه بر آن، ۲۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه‌ی BL21 (DE3)/pGEX-5x-1 و TOP10 فاقد ژن نوترکیب به فلاسک حاوی ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB تازه و حاوی آنتی‌بیوتیک منتقل شد.

سلول‌ها تا زمانی که به OD_{600} ۰/۴–۰/۵ برسند با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه Shake شدند. سپس جهت بیان بالای پروتئین نوترکیب با افزودن IPTG با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میکرومول بیان ژن القا گردید. محیط‌های کشت دوباره در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند و OD_{600} آن‌ها طی فواصل ۱ تا ۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

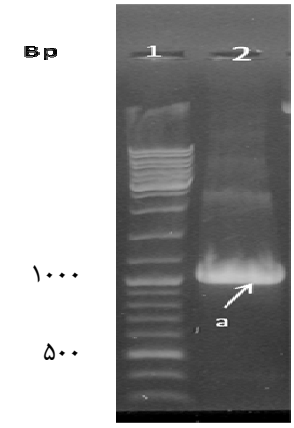
به دنبال هر مرحله، ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط مربوط به عنوان نمونه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و پلت‌های حاصل بار دیگر در ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS (Phosphate buffered saline) (۰/۷۵ میلی‌مول Na_2HPO_4، ۰/۱ میلی‌مول NaCl، ۱/۷ میلی‌مول KH_2PO_4 و pH = ۷/۲)، و ۳۰۰ میکرولیتر از بافر SDS (Sodium dodecyl sulfate) (۶/۸ مول Tris-HCl، ۲/۹ میلی‌مول β-mercaptoethanol و Bromophenol blue ۰/۵ درصد با pH = ۰/۵) سوسپانسیون و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد. پس ار آن ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-polyacrylamide الکتروفورز گردید.

یافته‌ها

اندازه‌ی محصول PCR به دست آمده ۱۰۶۸جفت باز و مطابق با طول cDNA رتپلاز بود (شکل ۱).

cDNA رتپلاز در وکتور pTZ57R وارد شد و جهت ترانسفورماسیون سلول‌های E. Coli XL1 blue مورد استفاده قرار گرفت. جهت تأیید حضور cDNA رتپلاز در پلاسمیدهای نوترکیب به دست آمده از

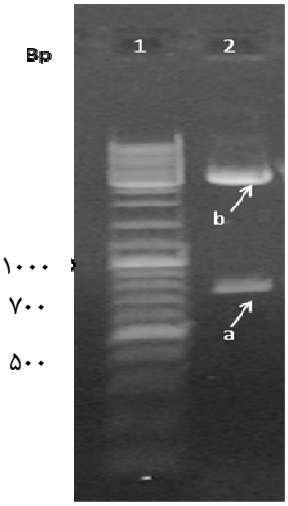
هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده‌ی SacI استفاده شد. باندهای ۷۵۰ و ۲۸۵۰ جفت بازی مشاهده شده نشان‌دهنده‌ی حضور cDNA رتپلاز در جهت مناسب در پلاسمیدها بود (شکل ۲).



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگاروز cDNA رتپلاز حاصل از واکنش PCR (Polymerase chain reaction).

ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲: فلش باند مورد نظر محصول PCR را نشان می‌دهد (a: ۱۰۶۸ جفت باز)



شکل ۲. هضم آنزیمی cDNA رتپلاز توسط آنزیم SacI.

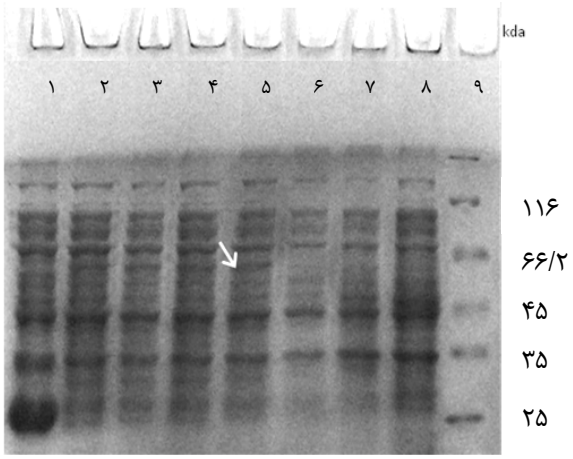
ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

ستون ۲: محصول برش داده شده با آنزیم SacI را نشان می‌دهد (a: ۷۵۰ و b ۲۸۵۰ جفت باز)

پلاسمید نوترکیب pTZ57R و همچنین وکتور بیانی pGEX-5x-1 با آنزیم‌های محدود کننده‌ی XhoI و BamHI برش داده شدند. پس از آن cDNA رتپلاز حاصل از برش به دو سر وکتور بیانی برش داده شده متصل گردید. حاصل هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pGEX-5x-1 حاصل از ترانسفورماسیون با آنزیم EcoRI، نمونه‌هایی با باند ۴۷۲ جفت بازی بود که صحیح قرار گرفتن ژن وارد شده را تأیید کرد.

رتپلاز یک پروتئین با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون است که به علت بیان همزمان پروتئین gst به صورت یک باند ۶۰ کیلودالتونی بیان شد.

آنالیز SDS-PAGE نمونه‌ها نشان داد که بیان پروتئین هدف با همه‌ی غلظت‌های IPTG القا شده است (شکل ۳).



شکل ۳. آنالیز SDS-PAGE محصول القا. بیان رتپلاز با ۱ میلی‌مول IPTG (Isopropyl beta-D thiogalactopyranoside) به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد. ستون ۱: pGEX- 5x-1 القا شده به مدت ۲ ساعت، ستون ۶-۲: rpGEX- 5x-1- TOP10 انکوبه‌شده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۵-۰ ساعت (فلش باند پروتئین هم‌جوش رتپلاز- gst را نشان می‌دهد)، ستون ۷: rpGEX- 5x-1- TOP10 القا نشده، ستون ۸: باکتری TOP10 در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ستون ۹: مارکر پروتئینی

بحث

هدف از انجام این مطالعه، کلون و بیان رتپلاز در E. Coli تحت کنترل پروموتر tac بود. رتپلاز پروتئینی تک زنجیره‌ای و حاصل موتاسیون حذفی t-PA است (۴، ۲). این پروتئین شامل ۳۵۵ اسید آمینه با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون می‌باشد. دمین‌های پروتئاز و Kringle II موجود در t-PA در رتپلاز حفظ شده‌اند؛ بنابراین رتپلاز دارای خاصیت آنزیمی مشابهی با t-PA می‌باشد (۱۵). در مقایسه با t-PA رتپلاز نیمه عمر بالاتر، عوارض جانبی کمتر و روش تجویز آسان‌تری دارد (۷، ۲) و برای درمان اختلالات انسدادی ریه‌ها، قلب و مغز به کار می‌رود (۶-۳).

پروتئین t-PA در سیستم‌های مختلفی مثل سیستم‌های باکتریایی، قارچی، حشره، مخمر، سلول تخمدان همستر چینی و رده‌ی سلولی پستانداران بیان شده است (۱۷-۱۶، ۹-۸، ۴). بیان پروتئین در رده‌ی سلولی پستانداران با گلیکوزیلاسیون همراه است که منجر به حذف سریع دارو می‌شود (۱). همچنین به علت تاخوردگی اشتباه، ترشح پایین به محیط کشت و میزان بالای گلیکوزیلاسیون، سلول‌های مخمر مثل Saccharomyces cervisiae و سلول‌های حشره میزبان مناسبی برای آن نیستند (۱۹-۱۸).

بیان رتپلاز در سلول‌های CHO با مشکلاتی چون پیچیدگی مراحل استخراج و خطر آلودگی ویروسی همراه است (۲۰). ولی بیان در سیستم‌های باکتریایی دارای مزیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به عدم گلیکوزیلاسیون محصول، کشت سریع، هزینه‌ی کمتر فرایندهای پایین دستی و در نتیجه‌ی آن صرفه‌ی اقتصادی تولید را ذکر کرد (۴).

بر خلاف سایر مطالعات انجام شده، در این مطالعه و نیز مطالعه‌ی Liao و همکاران جهت انجام فرایند کلون کردن از وکتورهای نوع T استفاده شد (پلاسمیدهای pTZ57R و PMD18) (۲۱). این پلاسمیدها یک نوکلئوتید تیمیدین اضافی در انتهای ۳' خود دارند و در نتیجه می‌توانند با روش T/A cloning کلون شوند (۲۳-۲۲). این روش به خصوص زمانی که با هضم آنزیمی مستقیم محصول PCR نمی‌توان قطعه‌ی مناسب را برای عمل Ligation به دست آورد روش انتخابی کلون کردن است (۲۳).

در این مطالعه ما از وکتور بیانی pGEX-5x-1 که دارای پروموتر tac بود، استفاده کردیم. پروموتر tac هیبریدی از پروموترهای trp و lac UV5 می‌باشد. در این پروموتر قطعه‌ی DNA بالادست ناحیه‌ی ۲۰- که مربوط به محل شروع ترجمه است، از پروموتر trp و قطعه‌ی DNA فرودست ناحیه‌ی ۲۰- از پروموتر lac UV5 گرفته شده است. همچنین این پروموتر علاوه بر توالی ۳۵، دارای جعبه‌ی Pribnow نیز می‌باشد (۱۲، ۱۰).

پروموتر tac یکی از قوی‌ترین پروموترهایی است که تاکنون در سلول‌های باکتری E. Coli شناخته شده است (۱۱) و کارایی آن ۲ تا ۳ برابر بیشتر از پروموتر trp و ۷ بار بیشتر از پروموتر lac UV5 می‌باشد. بیان ژن تحت کنترل این پروموتر، با ریپرسور lac سرکوب می‌شود و توسط IPTG القا می‌گردد. بنابراین پروموتر tac برای بیان بالا و کنترل شده‌ی ژن‌های خارجی در E. Coli مناسب است (۲۴).

همچنین وکتور بیانی pGEX- 5x- 1 دارای توالی gst در ابتدای محل اتصال قطعه‌ی ورودی است. این سیستم پروتئینی هم‌جوش به طور گسترده جهت بیان در سطح بالا و خالص‌سازی سریع و مؤثر پروتئین‌های

هم‌جوشی که در سلول‌های باکتریایی بیان می‌شوند، به کار می‌رود (۲۷-۲۵).

این سیستم بیانی دارای محل‌های شکست خاصی است که تحت اثر آنزیم پروتئاز قرار می‌گیرند و در نتیجه پروتئولیز پروتئین‌های هم‌جوش باکتریایی را تسهیل می‌کنند (۲۵).

نتایج مطالعه‌ی ما بیانگر بیان یک پروتئین ۶۰ کیلودالتونی بود، در صورتی که در مطالعات دیگر یک باند ۳۹ کیلودالتونی گزارش شده است (۲۳، ۲۱، ۱۳). این تضاد به دلیل بیان هم‌زمان پروتئین GST می‌باشد که توالی مربوط به آن به طور دقیق قبل از محل اتصال قطعه‌ی DNA است که ما وارد کردیم.

در مطالعه‌ی Gao و همکاران یک باند پروتئینی ۴۰ کیلودالتونی مشاهده شد (۱۵)، که به علت بیان یک پروتئین هم‌جوش رتپلاز- هیرودین بود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه cDNA رتپلاز با استفاده از پروموتر tac با موفقیت کلون و بیان شد. وکتور القاشده را می‌توان برای بررسی‌های آتی بیان رتپلاز در E. Coli به کار برد.

تشکر و قدردانی

این پروژه تحت حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفت. بدین‌وسیله از خانم مؤذن به علت کمک و همکاری ایشان در انجام این طرح سپاسگزاری می‌نماییم.

References

1. Mattes R. The production of improved tissue-type plasminogen activator in Escherichia coli. Semin Thromb Hemost 2001; 27(4): 325-36.
2. Ellis K, Brener S. New fibrinolytic agents for MI: as effective as current agents, but easier to administer. Cleve Clin J Med 2004; 71(1): 23-5, 29-30.
3. Davami F, Sardari S, Majidzadeh A, Hemayatkar M, Barkhordari F, Enayati S, et al. A novel variant of t-PA resistant to plasminogen activator inhibitor-1; expression in CHO cells based on in silico experiments. BMB Rep 2011; 44(1): 34-9.
4. Mandi N, Sundaram KR, Tandra SK, Bandyopadhyay S, Padmanabhan S. Asn and asn: critical residues for in vitro biological activity of reteplase. Adv Hematol 2010; 2010: 172484.
5. Simpson D, Siddiqui MA, Scott LJ, Hilleman DE. Spotlight on reteplase in thrombotic occlusive disorders. BioDrugs 2007; 21(1): 65-8.
6. Simpson D, Siddiqui MA, Scott LJ, Hilleman DE. Reteplase: a review of its use in the management of thrombotic occlusive disorders. Am J Cardiovasc Drugs 2006; 6(4): 265-85.
7. Manosroi J, Tayapiwatana C, Gotz F, Werner RG, Manosroi A. Secretion of active recombinant human tissue plasminogen activator derivatives in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 2001; 67(6): 2657-64.
8. Bass SH, Yansura DG. Application of the E. coli trp promoter. Mol Biotechnol 2000; 16(3): 253-60.
9. Khan SR, Gaines J, Roop RM, Farrand SK. Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. Appl Environ Microbiol 2008; 74(16): 5053-62.
10. de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 1983; 80(1): 21-5.
11. Mulligan ME, Brosius J, McClure WR. Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of Escherichia coli RNA polymerase at the TAC promoter. J Biol Chem 1985; 260(6): 3529-38.
12. Bagdasarian MM, Amann E, Lurz R, Ruckert B, Bagdasarian M. Activity of the hybrid trp-lac (tac) promoter of Escherichia coli in Pseudomonas putida. Construction of broad-host-range, controlled-expression vectors. Gene 1983; 26(2-3): 273-82.
13. Sadeghi HM, Rabbani M, Rismani E, Moazen F, Khodabakhsh F, Dormiani K, et al. Optimization of the expression of reteplase in Escherichia coli. Res Pharm Sci 2011; 6(2): 87-92.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

15. Gao L, Zhang C, Li L, Liang L, Deng X, Wu W, et al. Construction, expression and refolding of a bifunctional fusion protein consisting of C-terminal 12-residue of hirudin-PA and reteplase. Protein J 2012; 31(4): 328-36.

16. Baruah DB, Dash RN, Chaudhari MR, Kadam SS. Plasminogen activators: a comparison. Vascul Pharmacol 2006; 44(1): 1-9.

17. Rouf SA, Moo-Young M, Chisti Y. Tissue-type plasminogen activator: characteristics, applications and production technology. Biotechnol Adv 1996; 14(3): 239-66.

18. Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. Crit Rev Biotechnol 1993; 13(1): 1-55.

19. Furlong AM, Thomsen DR, Marotti KR, Post LE, Sharma SK. Active human tissue plasminogen activator secreted from insect cells using a baculovirus vector. Biotechnol Appl Biochem 1988; 10(5): 454-64.

20. Griffiths JB, Electricwala A. Production of tissue plasminogen activators from animal cells. Adv Biochem Eng Biotechnol 1987; 34: 147-66.

21. Liao JM, Zhang J, Shen ZL. Cloning and expression of tissue-type plasminogen activator mutant reteplase(r-PA) in E. coli. Pharmaceutical Biotechnology 2002; 9(2): 94-8.

22. Holton TA, Graham MW. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. Nucleic Acids Res 1991; 19(5): 1156.

23. Sadeghi HM, Ahmadi R, Aghaabdollahian S, Mofid MR, Ghaemi Y, Abedi D. Molecular cloning of gluconobacter oxydans DSM 2003 xylitol dehydrogenase gene. Res Pharm Sci 2011; 6(1): 51-5.

24. Amann E, Brosius J, Ptashne M. Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in Escherichia coli. Gene 1983; 25(2-3): 167-78.

25. Guan KL, Dixon JE. Eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. Anal Biochem 1991; 192(2): 262-7.

26. Frangioni JV, Neel BG. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. Anal Biochem 1993; 210(1): 179-87.

27. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene 1988; 67(1): 31-40.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 213, 3rd week, January 2013 Received: 1.10.2012 Accepted: 2.12.2012

Molecular Cloning and Expression of Reteplase in Escherichia Coli Using tac Promoter

Safieh Aghabdollahian[1], Mohammad Rabbani PhD[2], Kamran Ghaedi PhD[3], Hamid Mir Mohammad Sadeghi PhD[2]

Abstract

Background: This study was aimed to clone and express the reteplase complementary deoxyribonucleic acid (cDNA), a thrombolytic agent used for the treatment of acute myocardial infarction and stroke, in E*scherichia coli* using tac promoter.

Methods: Reteplase cDNA was amplified using polymerase chain reaction (PCR) with designed primers. The product was then cloned into *pTZ57 plasmid.* The cloned DNA was digested out and ligated into pGEX-5x-1 expression vector. The presence of the insert was confirmed by restriction digestion and determination of the nucleotide sequence. By using 0.2, 0.5, and 1 mM isopropyl beta-D thiogalactopyranoside (IPTG), reteplase was induced in escherichia coli TOP10 cells and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Findings: Electrophoresis of PCR product as well as double digested recombinant *pTZ57 plasmid* showed a 1068 base pair band of reteplase. SDS-PAGE analysis showed a 60 kilodalton band of protein product induced by IPTG.

Conclusion: In the present study, reteplase cDNA was successfully cloned and expressed using tac promoter. This vector was used for the optimization of the expression of reteplase in escherichia coli.

Keywords: Reteplase, Tissue plasminogen activator, Genetic promoter regions, Molecular cloning, Escherichia coli

* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 389383 in Isfahan University of Medical Sciences.

[1] Pharm D Student, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[2] Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Hamid Mir Mohammad Sadeghi PhD, Email: h_sadegh@pharm.mui.ac.ir