DOI: 10.22122/jims.v38i592.13008 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۹۲/هفته‌ی چهارم آبان ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۱۶ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۸/۲۸

بهینه‌سازی بیان پروتئین اینترلوکین-۵ در باکتری Escherichia Coli سویه‌ی BL21

مینا جمالوندی[۱]، حسین خان‌احمد[۲]، شیوا ایرانی[۳]، صیاد بسطامی‌نژاد[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در آسم، رابطه‌ی بین تعداد ائوزینوفیل‌ها و شدت بیماری، این فرضیه را تقویت می‌کند که ائوزینوفیل، سلول مؤثر اصلی در التهاب راه‌های هوایی است. تکامل ائوزینوفیل به طور عمده با اینترلوکین-۵ تنظیم می‌شود. بنابراین، با ممانعت از عملکرد اینترلوکین- ۵ (IL-5)، می‌توان حداقل یکی از دلایل ایجاد آسم را سرکوب کرد. برای تولید آنتاگونیست‌هایی مثل آپتامر ضد اینترلوکین-۵، لازم است این پروتئین به مقدار زیاد و با خلوص بالا بیان گردد. مطالعه‌ی حاضر با هدف تهیه‌ی اپتامر ضد IL-5 به جای آنتی‌بادی جهت استفاده در درمان بیماری‌های ائوزینوفیلیک و بیان این پروتئین در یک سیستم پروکاریوتی انجام شد.

روش‌ها: ابتدا سازه‌ی حاوی complementary DNA (cDNA) ژن پروتئین اینترلوکین-۵ طراحی و سفارش ساخت در وکتور pET28a داده شد. وکتور بیانی به باکتری‌های مستعد شده‌ی Escherichia coli BL21 (DE3) تبدیل شد. سپس، بیان پروتئین با تغییر شرایط دما و زمان انکوباسیون و میزان Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) بهینه گردید. ارزیابی بیان پروتئین با به کار گیری روش‌های Western blot و Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) و در مراحل مختلف صورت گرفت.

یافته‌ها: شرایط بهینه برای بیان پروتئین اینترلوکین-۵، غلظتی از باکتری که در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب بین ۰/۸-۰/۶ داشت، غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار برای IPTG، ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۹ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب ۱۵۰ دور/دقیقه بود. باند ۱۳ کیلودالتونی روی ژل پلی‌آکریل‌آمید در SDS-PAGE و غشای نیتروسلولزی در روش Western blot تأیید کننده‌ی بیان پروتئین اینترلوکین-۵ بود.

نتیجه‌گیری: از این پروتئین، در فرایندهایی چون تهیه‌ی آپتامر بر علیه IL-5 و کیت‌های Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)ی مخصوص اندازه‌گیری IL-5 می‌توان استفاده نمود. در این فرایندها، به آنتی‌ژن با فولدینگ بسیار صحیح نیاز نمی‌باشد. بنابراین، بیان در سیستم پروکایوتی به علت بازده بالا انجام شد.

واژگان کلیدی: سیستم بیانی؛ اینترلوکین-۵؛ سیستم پروکاریوتی؛ Escherichia coli

ارجاع: جمالوندی مینا، خان‌احمد حسین، ایرانی شیوا، بسطامی‌نژاد صیاد. **بهینه‌سازی بیان پروتئین اینترلوکین-۵ در باکتری Escherichia Coli سویه‌ی BL21.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۹۲): ۷۰۰-۶۹۴.

مقدمه

آسم، یک بیماری التهابی مزمن پیچیده در درخت نایژه‌ای است. افراد مبتلا به آسم، علایم مختلفی نظیر سرفه، تنگی نفس و خس‌خس سینه دارند. این علایم، ممکن است تشدید و به طور مداوم وخیم‌تر شوند که کنترل و درمان این بیماری را مشکل‌تر می‌سازند (۱). حالت بسیار شدید این بیماری که Exacerbation نام دارد، یک مشکل بزرگ در زیرگروه بیماران با التهاب راه‌های هوایی ائوزینوفیلیک است که به درمان‌های معمول کمتر پاسخ می‌دهد (۲). ائوزینوفیل‌ها، به شدت با علایم سطوح بالاتر آسم، به ویژه در تنگی نفس و خس‌خس سینه، همراهی نشان می‌دهند (۳).

ائوزینوفیل‌های فعال شده، پروتئین‌های پایه‌ای غشایی ترشح می‌کنند که به اپی‌تلیوم نایژه‌ای و میانجی‌گرهای لیپیدی مشتق شده از غشا، آسیب می‌زنند؛ ماهیچه‌ی صاف را منقبض می‌کنند، ترشح موکوس را افزایش می‌دهند و باعث اتساع عروق می‌شوند. رابطه‌ی بین تعداد ائوزینوفیل‌ها و

۱- دکتری ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲-دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳-دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴-دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسین خان‌احمد؛ دانشیار، گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: h_khanahmad@med.mui.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

شدت بیماری، این فرضیه را تقویت می‌کند که ائوزینوفیل، مؤثرترین سلول در التهاب راه‌های هوایی آسم است (۴).

بر اساس موارد پیش گفته، ائوزینوفیل یک هدف ایده‌آل برای پیش‌گیری انتخابی از آسیب رسیدن به بافت‌هایی است که با بیماری‌های آلرژیک همراه هستند. داروهایی که ائوزینوفیل‌ها را هدف قرار می‌دهند، دارای عوارض ناشی از سرکوب سیستم ایمنی با استفاده از داروهایی نظیر استروئیدها نمی‌باشند (۲).

تکامل ائوزینوفیل از پیش‌سازهای سلول‌های خونی، به طور عمده با کمک اینترلوکین-۵ (IL-5)تنظیم می‌شود که نقش انتخابی در بلوغ، تمایز، حرکت، فعال شدن و زنده ماندن این سلول‌ها دارد (۵).

برای بلوغ ائوزینوفیل‌ها در مغز استخوان و آزادسازی در خون، IL-5 ضروری است. در انسان‌ها، IL-5 فقط بر ائوزینوفیل‌ها و بازوفیل‌ها که دارای گیرنده‌ی IL-5 می‌باشند، عمل می‌نماید و باعث بلوغ، رشد، فعال شدن و زنده ماندن آن‌ها می‌گردد (۲). غیر فعال کردن IL-5 با منوکلونال آنتی‌بادی در حیوان و انسان، می‌تواند ائوزینوفیل‌های خون و ریه را که با مشکلات آلرژیک یا بیماری‌های مزمن ایجاد شده‌اند، کاهش دهد. بنابراین، با ممانعت از عملکرد IL-5 می‌توان حداقل یکی از دلایل ایجاد آسم را سرکوب کرد (۲).

اولین عامل بیولوژیکی ضد IL-5، Mepolizumab است که اثر آن روی آسم و سایر بیماری‌های ائوزینوفیلیک بررسی شده است (۶).

در نوامبر ۲۰۱۵، Mepolizumab با نام تجاری Nucala برای درمان آسم ائوزینوفیلیک شدید، از Food and Drug Administration (FDA) تأیید گرفت. در نهایت، در دسامبر همان سال، European Medicines Agency (EMA) مجوز معتبر فروش در سراسر اتحادیه‌ی اروپا را تحت عنوان «داروی تحت بررسی بیشتر» تأیید کرد (۶)، اما با وجود اثرات قابل توجه آن، آنتی‌ادی ضد IL-5، همانند سایر آنتی‌بادی‌ها معایبی همچون ایمونوژنیسیته و وزن مولکولی بالا و پایداری دمایی پایین دارد. به همین منظور، تحقیقات زیادی برای غلبه بر این مشکل انجام شده است (۷). در دو دهه ی اخیر، اپتامرها به عنوان جایگزین مناسبی برای آنتی‌بادی‌ها معرفی شده‌اند. اپتامرها، الیگونوکلئوتیدهای تک رشته‌ای هستند که به طور اختصاصی به هدف از پیش تعیین شده متصل و عملکرد آن را مختل می‌سازند (۸). یکی از روش‌های تولید اپتامرها، روش Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) می‌باشد که انواع مختلفی دارد. انجام SELEX با استفاده از بیدهای مغناطیسی یکی از آن‌ها است که برای انجام آن پروتئین خالص مورد نیاز است. بنابراین، مطالعه ی حاضر با هدف تهیه ی اپتامر ضد IL-5 به جای آنتی‌بادی جهت استفاده در درمان بیماری‌های ائوزینوفیلیک و بیان این پروتئین در یک سیستم پروکاریوتی انجام شد. در تحقیقات آتی، از پروتئین حاصل در فرایند SELEX برای انتخاب آپتامر استفاده می‌گردد.

روش‌ها

تهیه‌ی سلول‌های بیان کننده‌ی IL-5: جهت تهیه‌ی وکتور بیانی، سازه‌ی ۳۵۹ نوکلئوتیدی حاوی توالی complementary DNA (cDNA) مربوط به IL-5 طراحی و سفارش ساخت و کلون نمودن آن در جایگاه NcoI و XhoI در وکتور pET28a به شرکت Gene cust داده شد.

باکتری Escherichia coli سویه‌ی BL21 با روش کلسیم کلراید و شوک حرارتی، مستعد دریافت وکتور مورد نظر شد (۹). سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری مستعد شده BL21 با ۳ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) از وکتور بیانی تبدیل شد و باکتری‌های تغییر شکل یافته، روی پلیت‌های LB آگار حاوی ۲۵ میکروگرم/میلی لیتر کانامایسین پخش شد. سپس، جهت تأیید تغییر شکل و مشخص کردن کلون‌های مثبت، کلونی Polymerase chain reaction (PCR) با پرایمر رفت T7 (F: 5-TAATACGACTCACTATAGGG-3) و برگشت (R: 5-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3) روی تک کلون‌های حاصل با برنامه ای شامل ۴ دقیقه انکوباسیون با دمای ۹۵ درجه ی سانتی‌گراد و بعد از آن ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در تکمیل چرخه ها به مدت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه ی سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Solgent، پلاسمید دو تا از کلون‌های مثبت استخراج گردید و یک هضم دوتایی با دو آنزیم NcoI و XhoI بر روی آن انجام گردید و محصول هضم روی ژل آگارز ۱ درصد برده شد.

بیان پروتئین نوترکیب IL-5: ابتدا یکی از کلون‌های مثبت در محیط کشت LB broth کشت داده شد. سپس، باکتری در شرایط مختلف از نظر غلظت باکتری هنگام القا، زمان القا، دما و دور انکوباتور و غلظت القا کننده کشت داده شد تا شرایط بهینه برای بیان پروتئین IL-5 مشخص گردد و در نهایت، باکتری در شرایط بهینه برای بیان پروتئین کشت داده شد.

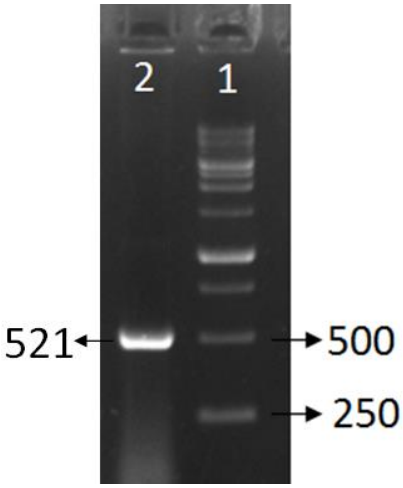
رسوب باکتری‌ها تهیه و جهت تأیید بیان پروتئین، ابتدا لیزیت باکتری پس از آماده‌سازی نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و ۲۰ میکرولیتر از نمونه روی ژل Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ۱۲ درصد بارگذاری و الکتروفورز شد. در پایان، ژل با کوماسی بلو G250 رنگ‌آمیزی شد. همچنین، برای تأیید نهایی بیان پروتئین

Western blot ،IL-5 بـا آنتـی‌بـادی Horseradish peroxidase (HRP) کنژوگـه‌ی ضـد His-tag انجـام شـد و پـروتئین Zinc-finger nucleases (ZFN) به عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

تأیید باکتری‌های تغییر شکل یافته ی حـاوی پلاسـمید pET28a-IL5

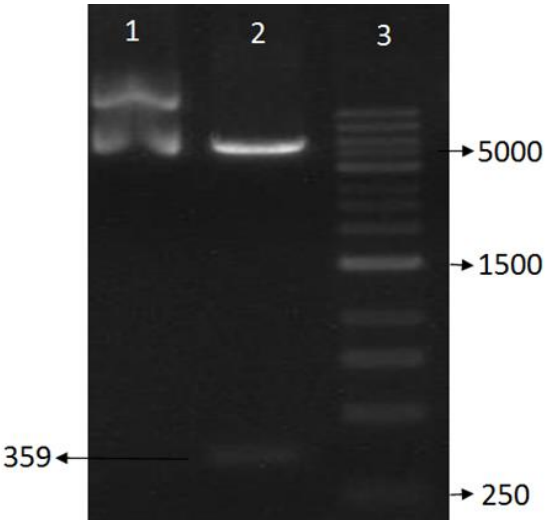
همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، پـس از انجـام کلـونی PCR، کلونی‌های مثبت (باند ۵۲۱ جفت‌بازی) مشخص شد.



شکل ۱. تأیید کلونی‌های مثبت با روش کلونی Polymerase chain reaction (PCR). چاهک شماره‌ی ۱، DNA Ladder ۱ کیلوبایت شرکت Fermentas، چاهک ۲ کلنی PCR روی یکی ازکلنی‌های باکتری BL21 تغییر شکل یافته با پلاسمید. مشاهده‌ی باند ۵۲۱ جفت بازی نشان دهنده‌ی تغییر شکل باکتری توسط سازه‌ی مورد نظر می‌باشد.

محصول هضم دوتایی پلاسمید یکی از کلون‌های مثبـت بـر روی ژل آگارز شامل دو قطعه‌ی ۳۵۹ و ۵۰۱۰ نوکلئوتیدی بود (شکل ۲).

بیـان پـروتئین نوترکیـب IL-5: شـرایط بهینـه بـرای بیـان پـروتئین نوترکیـب IL-5، غلظتـی از بـاکتری کـه در طـول مـوج ۶۰۰ نـانومتر جـذب بـین ۰/۸-۰/۶ داشـت، غلظـت نهـایی ۱ میلـی‌مـولار بـرای Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside (IPTG)، بـه مـدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار با شـتاب ۱۵۰ دور/دقیقـه در دمـای ۲۹ درجه ی سانتی‌گراد مشخص شد. داده‌هـای حاصـل از بهینـه‌سـازی بـا توجه به متغیرها شامل غلظت باکتری هنگام القا، مـدت زمـان پـس از القـا، دما، دور انکوباتور پس از القا و غلظت القا کننده در جدول ۱ آمده است.

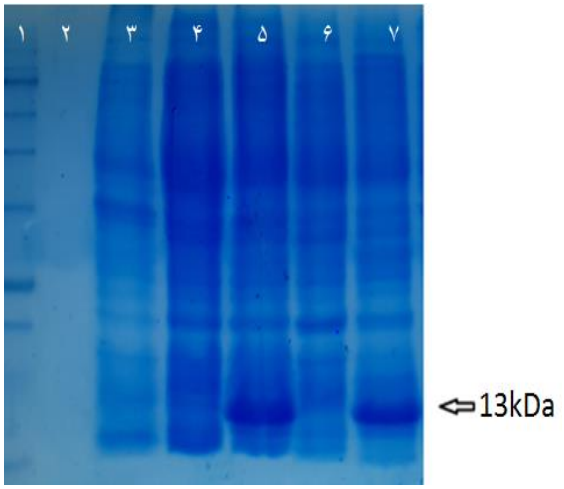


شکل ۲. محصول هضم دوتایی پلاسمید حاصل از یکی از کلون‌های مثبت بر روی ژل آگارز. چاهک اول حاوی پلاسمید هضم نشده و چاهک دوم حاوی محصول هضم دوتایی همان پلاسمید با آنزیم‌های NcoI و XhoI می باشد که دو قطعه‌ی ۳۵۹ و ۵۲۳۷ نوکلئوتیدی حاصل شده است.

بعد از شکستن سلول‌های رسوب حاصـل از بـاکتری‌هـای بـدون پلاسمید و دو کلون مثبت کشت داده شده قبل و بعد از القا بـا IPTG با محلول اوره ی ۸ مولار، بیان پروتئین IL-5 بـا انجـام SDS-PAGE روی ژل جدا کننده‌ی ۱۲ درصد بررسی شد (شکل ۳). همان‌طـور کـه در این شکل مشاهده می‌شود، در باکتری‌های بدون پلاسمید و نیز القـا نشده، باندی در ۱۳ کیلودالتون مشاهده نمی‌شود، اما در نمونه‌های بعد از القا بـا IPTG، وجـود یـک بانـد مشـخص ۱۳ کیلودالتـونی، نشـان دهنده‌ی بیان پروتئین مورد نظر می‌باشد.

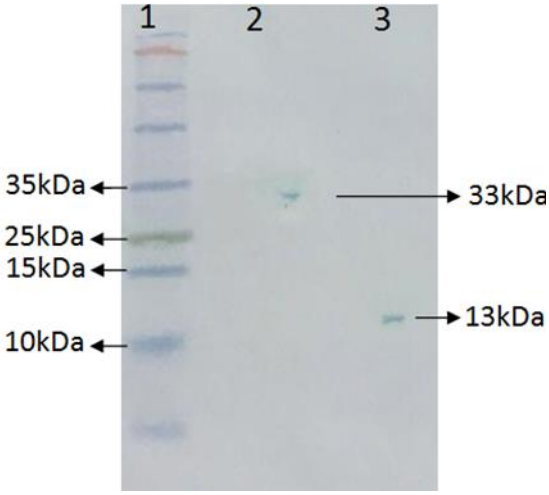
جدول ۱. انتخاب شرایط بهینه برای بیان پروتئین مورد نظر با تغییر عوامل مختلف

متغیر	مقادیر	شرایط بهینه
غلظت باکتری هنگام القا (جذب نوری ۶۰۰ نانومتر)	۰/۵-۰/۴، ۰/۶-۰/۸، ۱-۱/۲	تنها در ۰/۸-۰/۶ بیان مناسب وجود داشت.
مدت زمان پس از القا (ساعت)	۵، ۱۰، ۱۸ و ۲۴	تنها در زمان ۱۸ ساعت بیان مناسب وجود داشت.
دما (درجه‌ی سانتی گراد)	۲۶، ۲۹ و ۳۷	تنها در دمای ۲۹ درجه‌ی سانتی گراد بیان مناسب وجود داشت.
شتاب انکوباتور پس از القا (دور/دقیقه)	۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰	تنها در شتاب ۱۵۰ دور/دقیقه بیان مناسب وجود داشت.
غلظت القا کننده (میلی‌مولار)	۰/۵، ۱ و ۲	تنها در غلظت ۱ میلی‌مولار بیان مناسب وجود داشت.



شکل ۳. تأیید بیان IL-5 در Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). چاهک ۱ نشانگر SMOBio PM2700، چاهک ۲ خالی، چاهک ۳ BL21 بدون پلاسمید، چاهک ۴ کلون ۱ القا نشده، چاهک ۵ کلون ۱ القا شده، چاهک ۶ کلون ۲ القا نشده، چاهک۷ کلون ۲ القا شده

همچنین، برای تأیید نهایی بیان پروتئین IL-5، Western blot انجام شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشخص است، یک باند ۱۳ کیلودالتونی، نمایانگر بیان این پروتئین می‌باشد. در این بررسی، از پروتئین ZNF که حدود ۳۳ کیلودالتون است، به عنوان شاهد استفاده شد.



شکل ۴. تأیید بیان پروتئین اینترلوکین ۵ توسط Western blot. چاهک اول نشانگر پروتئین، چاهک دوم پروتئین شاهد Zinc-finger nucleases (ZFN) با وزن ملکولی ۳۳ کیلودالتون به عنوان شاهد مثبت و چاهک سوم پروتئین IL-5 با وزن ملکولی ۱۳ کیلودالتون

بحث

پروتئین‌های نوترکیب کاربردهای زیادی در زمینه‌های زیست مولکولی، صنایع غذایی و شرکت‌های دارویی دارند (۱۰). اولین داروهای تولید شده با روش‌های زیست‌فن‌آوری شامل انسولین، هورمون رشد و اینترفرون‌ها در Escherichia coli تولید شدند. هزاران پروتئین دیگر هم در این باکتری با اهداف درمانی یا تحقیقاتی تولید شدند (۱۱). نقش IL-5 در پاتوژنز بعضی بیماری‌های آلرژیک مانند آسم، اثبات شده است. به همین دلیل، هم بلوکه کردن این پروتئین می‌تواند به عنوان درمانی برای چنین بیماری‌هایی در نظر گرفته شود (۲). از این رو، برای یافتن مولکولی برای بلوکه کردن آن در گام اول آنتی‌ژن خالص مورد نیاز است. در این تحقیق، پروتئین IL-5 در باکتری Escherichia coli سویه‌ی Origami (DE3) BL21 با غلظت نهایی ۱ میلی مولار برای IPTG و انکوباسیون به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۹ درجه‌ی سانتی‌گراد و شتاب ۱۵۰ دور/دقیقه بیان شد و با روش‌های SDS-PAGE و Western blot تأیید گردید.

همان‌گونه که ذکر شد، این پروتئین یوکاریوتی در یک سیستم پروکاریوتی بیان شده است. اغلب لازم است پروتئین‌های یوکاریوتی در سیستم‌های مشابه بیان شود. یکی از محاسن بیان در سیستم‌های یوکاریوتی، ایجاد تغییرات پس از ترجمه نظیر گلیکوزیلاسیون و تولید پروتئین با فولدینگ و ساختار فضایی مناسب می‌باشد، اما از جمله اشکالات این سیستم‌ها، میزان بیان پایین و هزینه‌ی بالا می‌باشد (۱۲). به طوری که اگر امکان بیان در سیستم‌های پروکاریوتی وجود داشته باشد، بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتیک به علت بازده بالا و هزینه ی بسیار پایین‌تر ارجح می‌باشد. در بین میزبان‌های مختلفی که برای بیان پروتئین قابل استفاده می‌باشند، Escherichia coli سویه‌ی BL21 (DE3)، رایج‌ترین سویه می‌باشد؛ چرا که این سویه، مزایای زیادی نظیر دست‌ورزی آسان، سرعت بالای تکثیر و نیز بیان زیاد پروتئین و هزینه‌ی پایین دارد. برای بیان زیاد پروتئین در چنین سیستم‌هایی، باید از وکتورهایی استفاده شود که دارای پروموتر T7 باشند؛ چرا که T7 RNA Polymerase –که در باکتری میزبان تولید می‌شود، رونویسی از ژن هدف را در وکتور بیانی انجام می‌دهد (۱۲).

وکتورهای pET برای بیان پروتئین در سیستم‌های پروکاریوتی، به خصوص باکتری Escherichia coli سویه‌ی BL21 (DE3)، از مناسب‌ترین وکتورها هستند؛ چرا که ژن‌هایی که قرار است با این وکتورها بیان شوند، تحت پروموتر T7 قرار می‌گیرند که از قوی‌ترین پروموترها می‌باشد و باعث می‌شود پروتئین مورد نظر به میزان فراوانی در باکتری بیان شوند. به علاوه، تعداد پلاسمیدهای pET، بین ۲۵-۲۰ عدد در هر باکتری است و به همین جهت، مشکلات سایر

پلاسمیدها با نسخه‌های کمتر یا بیشتر در باکتری (نظیر بیان کم پروتئین به دلیل کم بودن تعداد نسخه‌های پلاسمید یا مسمومیت باکتری به دلیل تعداد نسخه‌های زیاد پلاسمید) را ندارد (۱۳). از این رو، در مطالعه ی حاضر، از وکتور pET 28a استفاده شد. دلیل استفاده از سویه‌ی Origami محلول شدن پروتئین در سیتوپلاسم و کمتر شدن احتمال ایجاد انکلوژن بادی می‌باشد. به این طریق پروتئین‌های محلول بیشتری تولید می‌شود و ساختار فضایی و فولدینگ پروتئین بیشتر حفظ می‌گردد.

تاکنون پروتئین‌های یوکاریوتی زیادی با این سیستم بیان شده‌اند. از جمله پروتئین MCP-1 خرگوشی که در شرایط بهینه‌ی ۱ میلی‌مولار القا کننده‌ی IPTG در دمای ۲۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، شتاب ۱۸۰ دور/دقیقه و به مدت ۲۴ ساعت به میزان بالایی در سیستم پروکاریوتی بسیار مشابه این تحقیق بیان شد (۱۴). چندین پروتئین هترولوگوس درمانی با موفقیت در Escherichia coli بیان شدند که اولین آن‌ها، انسولین انسانی بود که در سال ۱۹۸۲ برای استفاده ی انسانی تأیید گردید (۱۵).

در مطالعه‌ی Zarei Jaliani و همکاران، بالاترین بیان فنیل آلانین آمونیا لیاز با ۰/۵ میلی‌مولار القا کننده‌ی IPTG در محیط کشت TB در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، شتاب ۱۵۰ دور/دقیقه و به مدت ۱۸ ساعت در سیستم pET/BL21 به دست آمد (۱۶). در مطالعه‌ی Hu و همکاران، بیشترین میزان پروتئین محلول Phosphatase and tensin homologue (PTEN) در سیستم pGEX-6p-1/BL21 با مبدأ همانندسازی pBR322، ۰/۱ میلی مولار IPTG به مدت ۸ ساعت در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به دست آمد (۱۷). در یک مطالعه‌ی دیگر نیز گزارش شده است که بالاترین میزان cHSPA6 محلول با ۱۰ میکرومولار محلول IPTG در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۳ ساعت، به دست آمد (۱۸). Lee و همکاران، توانستند Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1) انسانی نوترکیب را با استفاده از وکتور pET SUMO در BL21 بیان کنند. در این سیستم، Small ubiquitin-related modifier (SUMO) به عنوان یک تگ فیوژن برای MCP1 میزان عملکرد پروتئین بیان شده را افزایش می‌دهد (۱۹).

البته گونه‌های باکتری‌های دیگری هم می‌توانند به عنوان میزبان برای بیان پروتئین کاربرد داشته باشند، مثل Pseudomonas که می‌تواند مزایایی هم داشته باشد و نیازمند مطالعه‌ی بیشتر است (۲۰).

نتیجه‌گیری

بنابراین، در این مطالعه، پروتئین IL-5 را در سیستم pET28a/Escherichia coli و در شرایط بهینه بیان شد. این پروتئین در تحقیقات آتی برای ایمن سازی خرگوش، موش و شتر جهت تهیه‌ی آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوشی و هیبریدومای ترشح کننده ی آنتی بادی منوکلونال موشی و نانوبادی ضد IL-5 استفاده خواهد شد. همچنین، در فرایند SELEX برای انتخاب آپتامر ضد IL-5 کاربرد دارد. با توجه به این که گروه تحقیقاتی ما در زمینه‌های پیش‌گفته طرح تحقیقاتی دارد، بیان این پروتئین، سبب کاهش هزینه‌های تحقیق می‌گردد. نکته‌ی مهم در استفاده از پروتئین در موارد ایمن‌سازی یا SELEX برای تهیه‌ی آنتی‌بادی یا آپتامر ضد یک آنتی ژن این است که فولدینگ مناسب پروتئین در بسیاری از موارد مهم نیست و هدف‌گیری اپی‌توپ‌های خطی، می‌تواند سبب ایجاد آنتی بادی و آپتامرهای کارآمد برای تشخیص یا مهار آنتی‌ژن گردد. از این رو، بیان پروتئین در سیستم پروکاریوتیک در این موارد بسیار مناسب و مقرون به صرفه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از نتایج پایان‌نامه‌ی دکتری با کد ۹۸۶۳۰ با عنوان «انتخاب و تولید آپتامر ssDNA ضد اینترلوکین- ۵ با کاربرد آتی در بیماری‌های آلرژیک مانند آسم» می باشد که در دانشگاه علوم و تحقیقات تهران تصویب شده است. از تمامی دست اندر کاران اجرای پایان نامه به خصوص خانم دکتر مریم بشتام کمال تشکر را داریم. لازم به ذکر است که تمام هزینه‌ی این پایان‌نامه توسط دانشجو پرداخت شده است.

References

1. Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, Gupta S, Monteiro W, Sousa A, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. N Engl J Med 2009; 360(10): 973-84.
2. Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. Respir Res 2001; 2(2): 71-9.
3. Miranda C, Busacker A, Balzar S, Trudeau J, Wenzel SE. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. J Allergy Clin Immunol 2004; 113(1): 101-8.
4. Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. Am J Respir Crit Care Med 2003; 167(2): 199-204.
5. Rothenberg ME, Klion AD, Roufosse FE, Kahn JE, Weller PF, Simon HU, et al. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. N Engl J Med 2008; 358(12): 1215-28.
6. Menzella F, Lusuardi M, Galeone C, Taddei S,

Facciolongo N, Zucchi L. Mepolizumab for severe refractory eosinophilic asthma: evidence to date and clinical potential. Ther Adv Chronic Dis 2016; 7(6): 260-77.
7. Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. Sensors (Basel) 2012; 12(1): 612-31.
8. Ruigrok VJ, Levisson M, Hekelaar J, Smidt H, Dijkstra BW, van der Oost J. Characterization of aptamer-protein complexes by X-ray crystallography and alternative approaches. Int J Mol Sci 2012; 13(8): 10537-52.
9. Sambrook J, Russell DW. Gel retardation assays for dna-binding proteins. Cold Spring Harb Protoc 2006; 2006(1): prot3948.
10. Sadeghian-Rizi T, Ebrahimi A, Moazzen F, Yousefian H, Jahanian-Najafabadi A. Improvement of solubility and yield of recombinant protein expression in E. coli using a two-step system. Res Pharm Sci 2019; 14(5): 400-7.
11. Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, et al. Production of biopharmaceuticals in E. coli: Current scenario and future perspectives. J Microbiol Biotechnol 2015; 25(7): 953-62.
12. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res 1988; 16(13): 6127-45.
13. Sheykhi S, Amininasab M, Saffari B, Abdi S. DNA Cloning and expression of alpha-Synuclein Protein in E. coli. Modares Journal of Biotechnology 2018; 9(1): 145-52. [In Persian].
14. Boshtam M, Khanahmad SH, Feizollahzadeh S, Rahimmanesh I, Asgary S. Expression and purification of biologically active recombinant rabbit monocyte chemoattractant protein1 in Escherichia coli. FEMS Microbiol Lett 2018; 365(9): fny070.
15. Crowl R, Seamans C, Lomedico P, McAndrew S. Versatile expression vectors for high-level synthesis of cloned gene products in Escherichia coli. Gene 1985; 38(1-3): 31-8.
16. Zarei Jaliani H, Farajnia S, Safdari Y, Mohammadi SA, Barzegar A, Talebi S. Optimized condition for enhanced soluble-expression of recombinant mutant anabaena variabilis phenylalanine ammonia lyase. Adv Pharm Bull 2014; 4(3): 261-6.
17. Hu Y, An Y, Fang N, Li Y, Jin H, Nazarali A, et al. The Optimization of Soluble PTEN Expression in Escherichia coli. Open Biochem J 2015; 9: 42-8.
18. Malik A, Alsenaidy AM, Elrobh M, Khan W, Alanazi MS, Bazzi MD. Optimization of expression and purification of HSPA6 protein from Camelus dromedarius in E. coli. Saudi J Biol Sci 2016; 23(3): 410-9.
19. Lee SE, Kwon SH, Huh JW. Soluble expression and purification of human monocyte chemoattractant protein-1 in escherichia coli via fusion with a small ubiquitin-like modifier. Int J Recent Sci 2015; 6(7): 4999-5003.
20. Hutchison CA, III, Chuang RY, Noskov VN, Assad-Garcia N, Deerinck TJ, Ellisman MH, et al. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. Science 2016; 351(6280): aad6253.

DOI: *10.22122/jims.v38i592.13008* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 592, 4th Week, November 2020**

Received: 03.04.2020 Accepted: 06.09.2020 Published: 26.11.2020

Optimization of Interleukin-5 Protein Expression in BL21 Strain of Escherichia Coli

Mina Jamalvandi[1], Hossein Khanahmad[2], Shiva Irani[3], Sayad Bastaminezhad[4]

Original Article

Abstract

Background: In asthma, the relationship between number of eosinophils and severity of this disease supports the hypothesis that eosinophil is the major effector cell in inflammation of airway. Evolution of eosinophils is regulated by interlukin-5 (IL-5). Therefore, by blocking IL-5, at least one major reason of asthma would be prevented. To produce antagonists against IL-5 (like aptamer), it is necessary to have this protein in large scale and high purity. This study aimed to optimize IL-5 protein expression of BL21 strain of Escherichia coli (E. coli) to be used instead of antibody.

Methods: At first, complementary DNA (cDNA) construct encoding IL-5 was designed, and was ordered to be produced in pET28a vector. Expression vector was transformed into competent E. coli Bl21 (DE3) origami. Then, protein expression was optimized by altering temperature, incubation time, and the amount of isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Protein expression was assessed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot in different levels of the test.

Findings: The optimum conditions for protein expression were gained when the density of bacteria at the OD600 reached to 0.6 to 0.8, and culturing was done at 29 °C for 18 hours and 150 rpm, andinduction with 1mM IPTG. There was a 13-kDa protein band on SDS-PAGE and western blot that confirmed the expression of IL-5 protein.

Conclusion: This protein can be used for producing aptamers against IL-5 and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for measuring IL-5. In all these process, there is no need to perfect folding of the protein. Therefore, the expression can be done in prokaryotic system, as it has high efficiency.

Key words: Gene expression; Interleukin-5; Prokaryotic cells; Escherichia coli

Citation: Jamalvandi M, Khanahmad H, Irani S, Bastaminezhad S. **Optimization of Interleukin-5 Protein Expression in BL21 Strain of Escherichia Coli.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(592): 694-700.

1- PhD in Genetics, Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Genetics, School of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
Corresponding Author: Hossein Khanahmad, Associate Professor, Department of Genetics and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: h_khanahmad@med.mui.ac.ir