تولید متالوپروتئیناز ۶۳ کیلودالتونی (gp63) لیشمانیاماژور در مخمر متیلوتروف Pichia pastoris

علی اکبر شعبانی [۱،۵*](Ph.D)، مک‌مستر روبرت [۳](Ph.D)، بهرام کاظمی [۴](Ph.D)، محسن کریمی [۱](M.Sc)، دلاور شهباززاده [۱](Ph.D)، فریدون مهبودی [۲،۱](Ph.D)

۱ – انستیتو پاستور ایران، بخش بیوتکنولوژی، تهران

۲ – مرکز مطالعات بیوتکنولوژی، دفتر همکاری‌های فن‌آوری ریاست جمهوری اسلامی ایران، تهران

۳ – دانشگاه بریتیش کلمبیا، دپارتمان ژنتیک پزشکی، کانادا

۴ – دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده‌پزشکی، بخش بیولوژی مولکولی

۵ – دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه انگل و میکروبیولوژی

خلاصه

سابقه و هدف: باتوجه به مشکلات ناشی از لیشمانیا به عنوان یک انگل داخل سلولی بیماریزا که بیش از ۱۲ میلیون نفر را در بیش از ۸۶ کشور جهان مبتلا نموده است و در راستای ارزیابی توانایی گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی (gp63) لیشمانیا ماژور به عنوان یک ایمنوژن در تحریک سیستم ایمنی میزبان و همچنین آنتی‌ژن تشخیصی، ژن کد کنندهٔ مولکول فوق در وکتور دو میزبانه pHIL-S1 به منظور بیان آن ژن در مخمر متیلوتروف P.pastoris کلون و بیان گردید و در نهایت خصوصیات مولکول نوترکیب حاصل نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ژن تغییر یافته gp63 به گونه‌ای که فقط پروتئین بالغ راکد نماید، در وکتور دومیزبانه (و همچنین پلاسمید puc19) کلون گردید. مخمر Pichia pastoris (سویه‌های KM71 و GS115) با پلاسمید دومیزبانه نوترکیب و همچنین باپلاسمید pHIL-S1 (به تنهایی) ترانسفورم گردید. کلون‌های ترانسفورم‌شده در محیط فاقد هیستیدین انتخاب شدند، DNA کروموزومی ترانسفورمنت‌ها تخلیص گردید و با روش‌های PCR و Sourthen Blotting (S. B.)، واردشدن ژن فوق درکروموزوم مخمر نوترکیب مورد ارزیابی قرارگرفت. ترانسفورمنت‌های تایید شده، در محیط حاوی گلیسرول BMGY، تاحصول کدورت OD600=6 کشت و سپس جهت بیان ژن هترولوگ فوق به محیط حاوی متانول، BMMY، انتقال داده شدند. باافزودن متانول به صورت روزانه، حالت‌القاء در آنان حفظ گردید. باتخلیص RNA و انجام Northen Blotting (N.B) صحت نسخه برداری و همچنین بیان ژن فوق (تولید پروتئین نوترکیب)با ژل ۱۲٪ SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ، و IFA مورد ارزیابی قرار گرفت. میکروسکوپ الکترونی و ایمونوالکترون میکروسکپی برای تعیین محل داخل سلولی گلیکوپروتئین هترولوگ rgp63، در مخمر بیان کنندهٔ ژن فوق مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت متالوپروتئیناز نوترکیب (rgp63) و همچنین تأثیر بازدارنده‌های آنزیمی با SDS-PAGE gelatin gel مطالعه گردید، توانایی مخمر در گلیکوزیلاسیون متالوپروتئیناز نوترکیب (rgp63) نیز سنجش گردید.

یافته‌ها: PCR و (S. B.) وارد شدن ژن gp63 را به گونه‌ای صحیح درکروموزوم مخمر نوترکیب تائید کردند. (N. B.) بر روی RNA تخلیص شده از مخمر نوترکیب صحت نسخه برداری از ژن gp63، ژل ۱۲٪ SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ نیز، بیان ژن فوق (تولید پروتئین نوترکیب) را در مخمر ترانسفورمنت تائید

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۳۲۰۸۰، نمابر: ۰۲۳۱-۳۳۳۱۵۵۱، E.mail: <Shaebani@sem-ums.ac.ir>

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

نمودند. مطالعه باSDS-PAGE gelatin gel، فعال بودن مولکول فوق را اثبات نمود. یدواستامید و EDTA با غلظت ۵ میلی‌مولار از فعالیت این مولکول در ژل مزبور ممانعت نمودند. بررسی‌ها با میکروسکوپ الکترونی وجود ناحیهٔ پروتئینی متراکم را در فضای پریپلاسمی مخمر ترانسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن نشان داد. بررسی‌های ایمونوالکترون میکروسکوپی و IFA نیز تأئید نمودند که ناحیهٔ پروتئینی فوق، همان پروتئین نوترکیب (rgp63) می‌باشد. آزمون PNGase-F نیز گلیکوزیله بودن باندهای بیش از ۵۳ کیلودالتونی آن را اثبات‌نمود.

نتیجه‌گیری: گلیکوپروتئین ۶۳ کیلودالتونی تولید شده در مخمر به فرم طبیعی خود بیشتر شباهت دارد، زیرا علاوه بر گلیکوزیله بودن در SDS-PAGE gelatin gel نیز فعال می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، لیشمانیا، مخمر، الکترون میکروسکوپی، gp63، Pichia pastoris

مقدمه

لیشمانیا، یک انگل داخل سلولی می‌باشد که به صور مختلف بیش از ۱۲ میلیون نفر را در بیش از ۸۶ کشور جهان مبتلا نموده است و ۳۵ میلیون نفر نیز در معرض ابتلاء به آن هستند [۳]. واکسن‌های زیرواحدی آن با استفاده از مولکول gp63 انگل فوق حداقل در موارد ذیل توانسته است به نوعی از ایمنی و حفاظت در برابر بیماری انگلی فوق منجر شود:

الف - مولکول gp63 انگل فوق، توانایی القاء تک‌آنتی‌سرم اختصاصی (Monospecific) را دارد. آنتی‌سرم فوق به عنوان یک آنتی‌ادهسین (Anti-adhesine) عمل کرده و در تقلیل اتصال انگل به ماکروفاژهای میزبان نقش دارد[۲۱].

ب - تزریق زیرجلدی لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌ژن gp63 طبیعی (تخلیص‌شده از پروماستیگوت‌های مرحلهٔ لگاریتمی رشد) لیشمانیا مکزیکانا توانسته‌است موش‌های Inbred از نوع CBA/ca را حفاظت نماید. حفاظت حاصله از طریق انتقال سلول‌های T، قابل انتقال به موش‌های سالم نیز بوده‌است[۱۳].

ج - حفاظت موش‌های BALB/C بعد از واکسیناسیون آنها با باسیل واکسن BCG که گلیکوپروتئین Gp63 لیشمانیا ماژور را نیز بیان میکرده‌است در مقابل ابتلاً به انگل فوق[۹].

د - بیان ژن gp63 لیشمانیا ماژور در سویه واکسن خوراکی سالمونلا تیفی‌موریوم، نیز توانسته تکثیر سلول‌های T کمکی را به سمت سلول‌های زیر واحد ۱ (Th-1) و در نتیجه به سمت ایمنی و حفاظت هدایت نماید [۱۶،۲۳،۲۴].

هـ - بی‌ضرری (Safety) واکسن زیرواحدی gp63 و همچنین توانایی آن در ایجاد مصونیت نسبی در مدل حیوانی میمونهای Vervet تأئید گردیده است. مولکول gp63 حداقل برای تشخیص سرولوژیک لیشمانیوز جلدی و احشایی نیز مفید گزارش شده است[۱۱].

بنابراین مولکول gp63 حداقل به عنوان یکی از کاندیداهای تهیه واکسن Subunit لیشمانیا مطرح است. از این رو، در راستای طرح مطالعات مولکولی لیشمانیا و همچنین جهت تولید مولکول فوق به مقدار زیاد و مشابه‌تر به فرم طبیعی آن، تصمیم گرفته شد تا گلیکوپروتئین gp63 را در سلولی یوکاریوت (مشابه‌تر به انگل) بیان نماییم.

از آنجایی که زمینه ژنتیکی میزبان می‌تواند مواردی از جمله صحت (Authenticity) پروتئین نوترکیب را تحت تأثیر قرار دهد، به گونه‌ای که گاهاً موارد فوق، اهمیت بیشتری از میزان بالای تولید می‌یابد[۱۷]. با توجه به انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای در مخمر به عنوان یک میزبان اوکاریوتی و شباهت این نوع تغییرات در مخمر، به تغییرات پس از ترجمه‌ای انجام شده توسط سلول‌های اوکاریوت عالی‌تر در بسیاری از موارد، مخمر

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

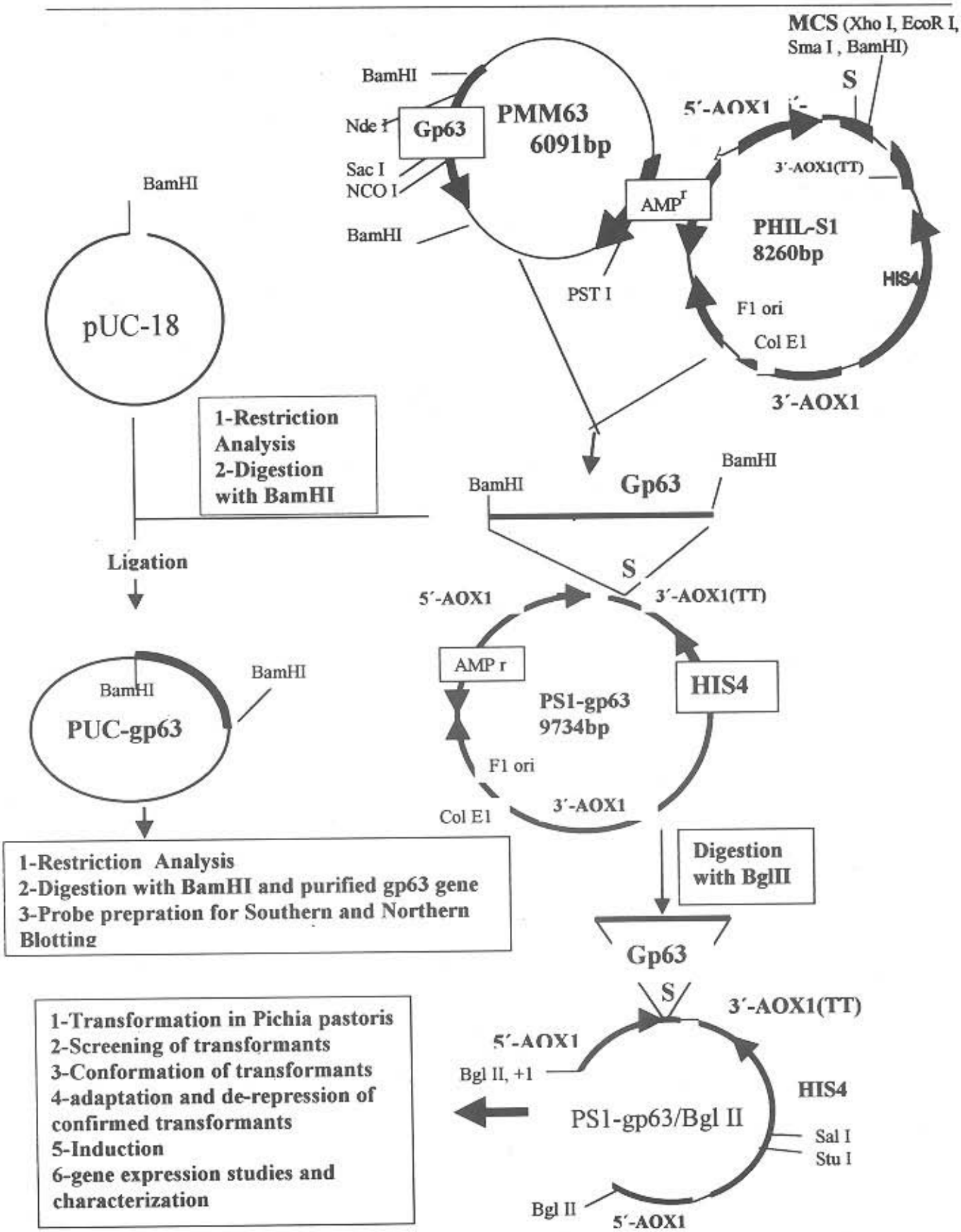
میزبانی مناسب برای بیان ژن‌ها و تولید پروتئین‌های اوکاریوتی می‌باشد.

از طرف دیگر علی‌رغم استفادهٔ وسیع و طویل‌المدت از مخمر ساکارومیسس سرویزیه برای مقاصد مختلف در بیوتکنولوژی، از مخمر نانوایی گرفته و تا این اواخر به عنوان یک میزبان اوکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، وجود مشکلات و محدودیت‌هایی دراین راستا مانند هیپرگلیکوزیلاسیون پروتئین‌های نوترکیب، محققان را به طور جدی بر آن داشته است که در صدد جایگزین نمودن مخمر فوق با جنس‌ها و یا گونه‌های دیگری از این میزبان اوکاریوتی باشند. در این راستا، چندین گونه مخمر متیلوتروف از جمله Pichia pastoris، Hansenula polymorpha، Kluyveromyces lactis، Schizosaccharomyces pombe و Yarrowia lipolytica کاندیدا می‌باشند که در بین آنها Pichia pastoris بدلیل فقدان اتصالات گلیکانی Alpha(1-3) که می‌تواند به عنوان سوبسترا و یا هستهٔ اولیهٔ هیپرگلیکوزیلیشن عمل نماید[۱۳] همچنین توانایی تولید پروتئین نوترکیب با مقادیر بسیار بالا حتی تا مقدار ۱۲ گرم در لیتر [۷] ارجح می‌باشد. لذا از سال ۱۹۸۷ به عنوان یک میزبان اوکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است. در این پروژه هم به منظور تولید گلیکوپروتئین عمدهٔ لیشمانیا (gp63) در شرایطی نزدیک‌تر به شرایط طبیعی (تولید آن)، برآن شدیم که از میزبانی یوکاریوتیک که توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه‌ای (translational Post-modifications) همانند سایر سلول‌های اوکاریوتی را داراست، استفاده نماییم تا بتوان اهمیت و نقش احتمالی تغییرات فوق را در تولید کامل این آنتی‌ژن گلیکوپروتئینی، که حداقل به عنوان یک جزء اصلی در طراحی واکسن‌های نسل دوم لیشمانیا و همچنین در طراحی کیت‌های تشخیصی این بیماری مطرح است، مورد مطالعه قرار داد. لذا، کلونینگ و بیان این ژن در مخمر متیلوتروف Pichia pastoris و ارزیابی خصوصیات مولکول نوترکیب حاصل برای تحقق این هدف مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش کار

شکل ۱، ترسیم شماتیکی از مراحل کلونینگ ژن gp63 در مخمر Pichia pastoris است. پس از تأئید ژن تغییریافته gp63، به گونه‌ای که فقط قسمت بالغ پروتئین مزبور را کد نماید [۵]. بااستفاده‌از Restriction map آن، ژن فوق با آنزیم برش دهنده BamHI بیرون آورده شد و پس از الکتروفورز و استخراج از ژل آگاروز، در ناقل دو میزبانه pHIL-S1 و همچنین pUC18، کلون شد. پلاسمید نوترکیب حاصل pS1-gp63 نام گذاری شد. پس از خطی و دوقطعه نمودن پلاسمید فوق توسط آنزیم برش دهندهٔ(BglII)، قطعهٔ حاوی ژن از ژل آگاروز با روش فنل-کلروفرم و نیز استفاده از کیت Gene Clean، استخراج گردید. سلول‌های پذیرا (صلاحیت‌دار) از سویه‌های KM71 و GS115 مخمر Pichia pastoris تهیه شد و برای ترانسفورماسیون قطعه DNA حاوی ژن به روش‌های شیمیایی نظیر لیتیم کلراید مورد استفاده قرار گرفت. پس از۳-۲ روز در دمای ۳۰ درجه، ترانسفورمنت‌ها برروی محیط فاقد هیستیدین انتخاب شدند. DNA کروموزومی آنها استخراج شد. پس از استخراج پلاسمید pUC19+gp63 به مقدار لازم و هضم آن توسط آنزیم BamHI، ژن gp63 کلون شده در آن از ژل LMP جدا شد و سپس مقدار ۱ میکروگرم از آن همراه با یک میکروگرم از DNA غیر نشان دار همراه کیت DIG-DNA labeling، به روش Random Priming، با دیگوگسیژنین (DIG) نشان دار گردید. کمیت و کیفیت پروب تهیه شده با روش لکه گذاری نقطه‌ای (Blot Dot Southern) روی غشاء نایلونی در مقایسه با کنترل‌های کیت تعیین شد. این پروب برای غربال‌گری و همچنین تأئید تداخل ژن gp63 در DNA کروموزومی مخمرهای فوق باروش Southern blotting، مورد استفاده قرارگرفت. PCR با پرایمرهای 5-AOX-1 & 3- و پرایمرهای طراحی شده برای داخل ژن (PCR3 وPCR4) نیز بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



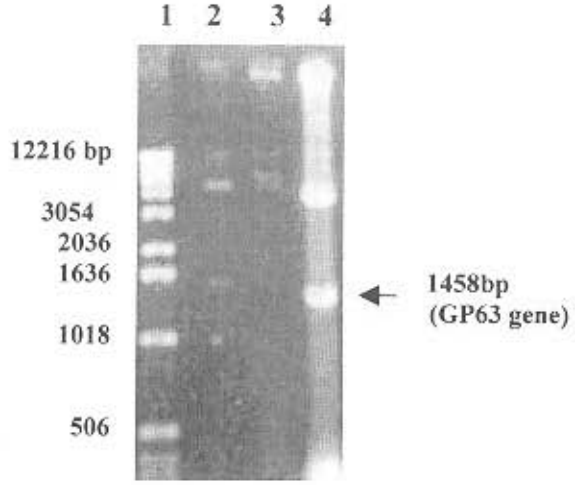
شکل ۱. نمایش شماتیک مراحل کلونینگ ژن gp63 در مخمر Pichia pastoris

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

ترانسفورمنت‌های تأئید شده جهت عادت دادن و سپس القاء، در ابتداء در محیط بافری حاوی حداقل گلیسرول، BMGY، تلقیح شدند. محیط‌های تلقیح شده در انکوباتور ۳۰ درجه همراه با تکان شدید، قرار داده شدند تااین که کدورت آنها به حدود OD600=6 برسد. پس از آن سلول‌هارا در شرایط و ظروف استریل سانتریفوژ نموده و سپس آن را به محیط بافری حاوی حداقل متانول BMMY، انتقال داده و مجددا در همان شرایط انکوبه شد. BMMY همان محیط BMGY می‌باشد، بااین تفاوت که به جای ۱٪ گلیسرول، واجد ۰/۵ درصد متانول می‌باشد. حدود یک هفته در آن شرایط می‌ماند. البته متانول نیز به صورت روزانه و بر حسب حجم نهایی محیط القاء در شرایط استریل به آن اضافه می‌گردید. سرانجام سلول‌ها و محیط کشت با سانتریفوژ از همدیگر جدا گردیدند و به رسوب سلولی حاصل Breaking buffer حاوی ممانعت کنندهٔ پروتئاز افزوده شد و پس از شکستن سلول‌ها با سونیکاتور با روش SDS-PAGE، کلون‌های بیان کنندهٔ ژن فوق در مقایسه با کنترل منفی (مخمر ترانسفورم شده با پلاسمید pHIL-S1 به تنهایی) و همچنین با کنترل مثبت (پروتئین rgp63 تخلیص شده از E.coli) غربال می‌گردیدند. پس از یافتن کلون‌های مثبت با SDS-PAGE، به منظور رد و یا تأئید یافته‌های فوق آزمون .S. B روی آنان انجام گردید. همچنین، برش‌های میکروسکوپی تهیه شده از مخمرهای نوترکیب تائید شده با آزمون .S. B (قبل و بعد از القاء)، با استفاده از آنتی‌بادی های اختصاصی بر علیهٔ gp63، به عنوان آنتی‌بادی اولیه و استفاده از آنتی موس کونژوگه با مادهٔ فلوئورسانس فلوئورسئین ایزوتیوسیانات، FITC، مورد آزمون IFA نیز قرار گرفتند. برای تعیین محل تولید پروتئین فوق از میکروسکوپ الکترونی و روش ایمنوالکترون میکروسکپی (IEM) که تلفیقی از روش‌های سرولوژی و روش‌های الکترون میکروسکپی می‌باشد، بهره گرفته شد. فعالیت آنزیمی rgp63، اثر بازدارنده‌های آنزیمی یدواستامید و EDTA بر فعالیت آن با استفاده از SDS-PAGE gelatin gel مورد سنجش قرار گرفت. در پایان، آزمون دگلیکوزیلاسیون PNGase-F نیز بر روی مولکول فوق انجام شد.

نتایج

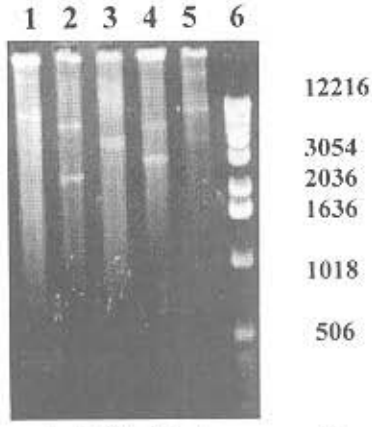
پس از تأئید ژن تغییر یافتهٔ gp63 با ۱۴۵۸bp و بیرون کشیده شدن آن از پلاسمید pPMM63:TEX3 توسط آنزیم BamHI (شکل۲، ردیف۴)، به طور هم‌زمان در ناقل دو میزبانهٔ pHIL-S1 تایید شد (شکل۳) و پلاسمید PUC18 کلون گردید. نتایج حاصل از هضم‌های آنزیمی (Restriction map) پلاسمید نوترکیب pUC19-gp63 در شکل۴ آمده است. با توجه به وجود یک سکانس شناسایی و برش در سکانس نوکلئوتیدی این پلاسمید نوترکیب برای آنزیم‌های SalI، HindIII، SmaI، EcoRI و BamHI، هضم پلاسمید مزبور توسط آنزیم‌های فوق منجر به خطی شدن آن می‌گردد. در سایر موارد نیز اندازه قطعات حاصل در مقایسه با مارکر مولکولی 1kb DNA ladder مطابق با موارد مورد انتظار بود.



شکل۲. هضم آنزیمی پلاسمیدهای مختلف pPMM63:TEXT3 با آنزیم BamHI. قطعات DNA با اندازهٔ ۱۴۵۸bp، ژن‌gp63، از پلاسمیدهای شمارهٔ ۹۰ و۴۲ رها شده است (ردیف‌های ۲ و ۴). ژن gp63 رها شده از پلاسمید شمارهٔ ۴۲ (ردیف ۴) برای کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. در ردیف ۱، 1kb DNA Ladder لود شده است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

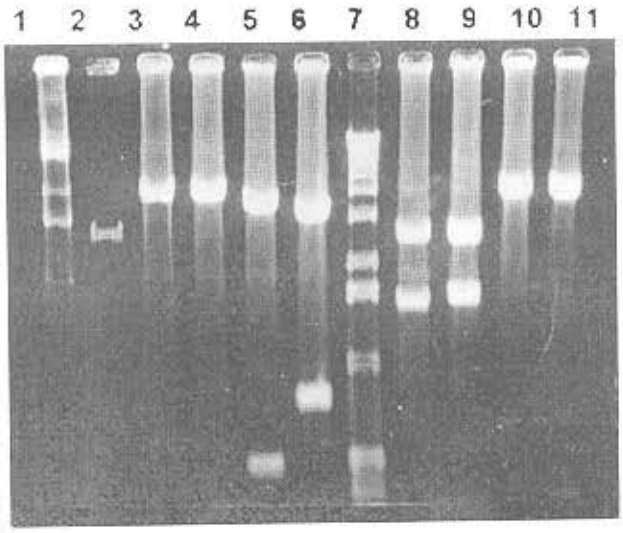
کلونینگ ژن gp63 در ناقل دومیزبانهٔ pHIL-S1 نیز به همان صورت تأیید گردید. پلاسمیدهای نوترکیبی که پس از هضم با آنزیم BamHI، قطعه DNA با اندازه ۱۴۵۸bp را، رها می‌ساختند، مجددا توسط آنزیم‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل آنزیمی پلاسمید دو میزبانهٔ pHIL-SI به تنهایی هضم گردیدند (شکل۳).



شکل ۳. تأیید پلاسمید دو میزبانه pHIL-S1 از طریق هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های BamHI (ردیف ۱ از چپ به راست)، BglII (ردیف ۲)، EcoRV (ردیف ۳)، PvuII (ردیف ۴). ضمناً در ردیف ۶ 1Kb DNA Ladder و در ردیف ۵ پلاسمید Uncut بارگیری شده‌است. موارد مشاهده شده در مقایسه با شاخص وزن مولکولی 1Kb DNA ladder DNA (ردیف ۶) مبین آن است که قطعات DNA حاصله درموارد ذکر شده کاملاً باموارد مورد انتظار مطابقت کامل دارد.

آنزیم‌های مورد استفاده برای این موضوع به گونه‌ای انتخاب گردیدند که دارای محل برش در سکانس ژن gp63 و همچنین در سکانس پلاسمید فوق باشند. پس از مقایسه اندازه قطعات حاصل با مارکر مولکولی 1kb DNA Ladder مناسب‌ترین پلاسمید انتخاب گردید. برای حصول اطمینان از قرارگرفتن ژن gp63 در پلاسمید دو میزبانه pHIL-SI در جهت صحیح (پلاسمید نوترکیب pHIL-SI +gp63)، پلاسمیدهای مزبور مجدداً با آنزیم‌های NdeI و NcoI هضم گردیدند.

با توجه به وجود سکانس مورد شناسایی و برش آنزیم NdeI در موقعیت نوکلئوتیدی شماره ۵۶۲۹ در سکانس پلاسمید دومیزبانه pHIL-S1 و همچنین در موقعیت نوکلئوتیدی شماره ۶ سکانس تغییر یافتهٔ ژن gp63 انتظار بود که از هضم پلاسمید نوترکیب فوق (pHIL-SI-gp63) با آنزیم مزبور، در صورتی که ژن gp63 در در جهت صحیح قرار گرفته باشد، قطعات ۶۰۵۸bp و ۳۶۵۷bp حاصل گردد.

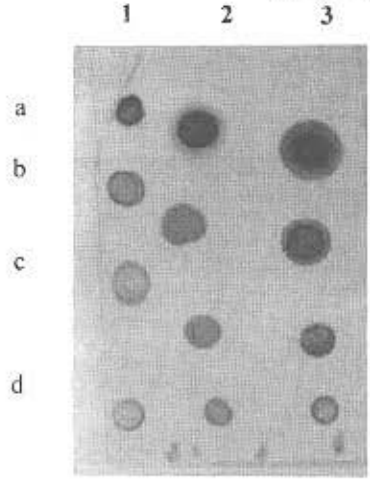


شکل ۴. تأیید پلاسمید نوترکیب (ردیف pUC19-gp63) توسط هضم‌های آنزیمی، به منظور استفاده از آن در تهیه پروب نشان‌دار. تأیید پلاسمید نوترکیب از طریق هضم آنزیمی آن توسط آنزیم‌های BamHII (ردیف۳)، EcoRI (ردیف۴)، SmaI (ردیف ۵)، PstI (ردیف ۶)، & BamHII HindIII (ردیف ۸)، EcoRI & HindIII (ردیف ۹)، HindIII (ردیف ۱۰) و SalI (ردیف ۱۱). ضمناً در ردیف ۷، 1Kb DNA Ladder و در ردیف ۱ پلاسمید pUC19 Uncut و در ردیف ۲ pUC19/linear بارگیری شده‌است.

در نهایت پلاسمید نوترکیبی برای ترانسفورمیشن در مخمر انتخاب گردید که علاوه بر تائید وجود ژن gp63 در آن، قرار گرفتن ژن مزبور در جهت صحیح نیز در آن تائید شد. پلاسمیدهای نوترکیب فوق توسط آنزیم برش دهندهٔ BglII هضم گردید. با توجه به وجود سکانس مورد شناسایی برای آنزیم فوق در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۲ و ۵۳۹۴ پلاسمید فوق، دو قطعه DNA با اندازه‌های ۶۸۴۷ جفت باز (حاوی ژن gp63) و ۲۸۶۸ جفت باز ایجاد شد. پس از تائید هضم آنزیمی فوق، و الکتروفورز آن در ژل آگاروز،و انجام ترانسفورماسیون با قطعهٔ ۶۸۴۷ جفت بازی، ترانسفورمنت‌های +HIS روی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

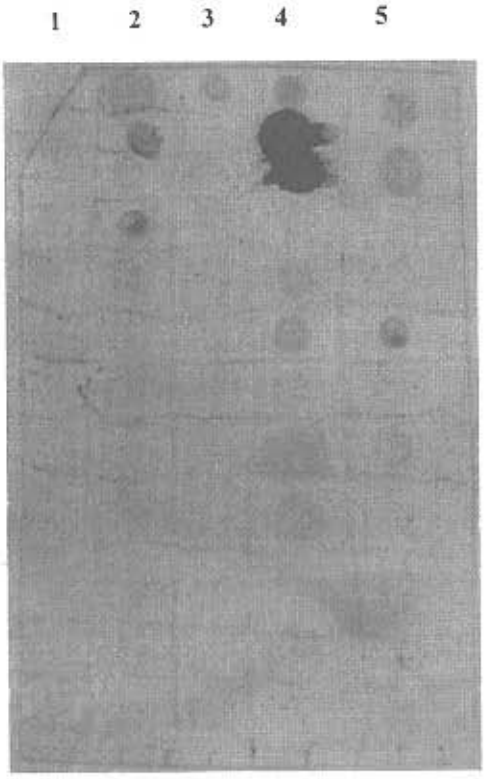
محیط فاقد هیستیدین انتخاب شدند. DNA کروموزومی آنها استخراج گردید و پس از کنترل غلظت آنها، با استفاده از پروب نشاندار تهیه شده (شکل۵)، مورد آزمون غربالگری Dot Southern blotting قرار گرفتند (شکل ۶).



شکل ۵. تخمین کمی و ارزیابی کیفی پروب نشاندار تهیه شده در مقایسه با DNA standard labeled control. مقدار DNA در هر لکه (DOT، ردیف a) یک میکرولیتر (معادل ۵ نانوگرم) می‌باشد. مقدار DNA در ردیف b، ۱/۱۰ ردیف a می‌باشد (رقت ۱:۱۰ ردیفa). مقدار DNA در ردیف c ۱/۱۰ ردیف b می‌باشد (رقت ۱:۱۰۰ ردیفa) و مقدار DNA در ردیف d، ۱/۱۰ ردیف c می‌باشد (رقت ۱:۱۰۰۰ ردیفa).
۱ - Unlabeled DNA of Kit ۲.Prepared prob from gp63 Gene - ۳ - Labeled DNA of Kit

در ستون ۱ شکل ۵، رقت‌های مختلف پروب (کاوشگر) نشاندار تهیه شده از ژن gp63 می باشد که الگوی آن از پلاسمید Puc19-gp63 (شکل ۴) جدا شده بود. شدت و ضعف و یا به عبارتی درجه واکنش‌گری هر یک از لکه‌ها (DOT) در مقایسه با کنترل‌های کیت (شکل ۵، ستون‌های ۲ و ۳) مشاهده می‌شود. همانگونه که ملاحظه می‌گردد، کاوشگر تهیه شده حتی تا رقت ۱:۱۰۰۰ از کیفیت مطلوبی برای واکنش هیبریدیزاسیون برخوردار بود.

شکل ۶ دو رگه‌گیری رابا روش لکه‌گذاری نقطه‌ای با DNA-پروب تهیه شده از روی ژن gp63 (با روش Random priming) نشان می‌دهد. ستون‌های ۲ و ۴ ردیف‌های d و b به ترتیب DNA جایگزین شده را نشان می‌دهند. مقدار DNA در هر لکه (Dot) معادل ۲۰ نانوگرم می‌باشد. Dotهای ستون ۴ ردیف‌های b و c، Puc19-gp63 و pHIL-SI-gp63 می‌باشند که با شدت بیشتری ظاهر گردیده‌اند. پلاسمیدهای فوق بدون ژن gp63 نیز به عنوان کنترل منفی در ستون ۵ به ترتیب در ردیف‌های g و hگرفته‌اند.در ستون ۲ ردیف b، DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۶، ردیف c، DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۸ (کنترل منفی)، و ردیف d، DNA کروموزومی متعلق به کلون شمارهٔ ۱۱۰ می‌باشد. در ستون ۴ ردیف a، DNA کروموزومی متعلق به کلون شماره ۲۵ می‌باشد. در ستون ۵، ردیف f، DNA کروموزومی متعلق به کلون GS-I می‌باشد.

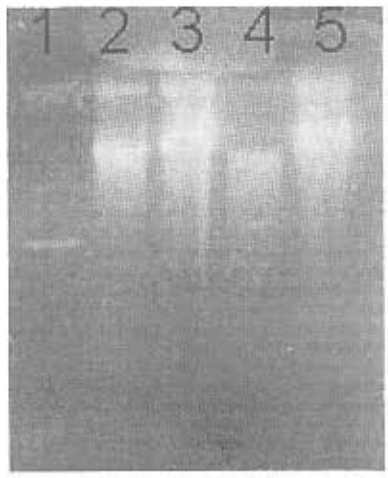


شکل ۶. Dot Southern Blot Hybridization برای غربالگری اولیهٔ کلونهای حاوی ژن gp63. مقدار DNA در هر لکه (DOT) معادل ۲۰ نانوگرم می‌باشد. نتیجهٔ واکنشگری DNA کروموزومی استخراج شده از ترانسفورمنتهای مختلف، در مقایسه بالکه‌های (Dots) ستون ۴ ردیفهای b و c به عنوان کنترل مثبت و ستون ۵ ردیفهای g و h به عنوان کنترل منفی ملاحظه می‌گردد.

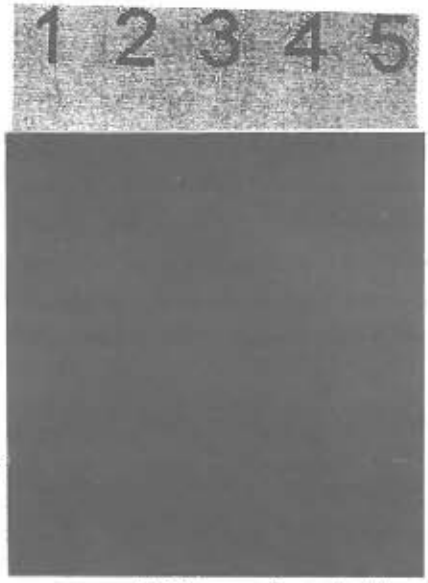
پس از شناسایی کلون‌های حاوی ژن در این مرحله، DNA کروموزومی آنها استخراج شد و با آنزیم BamHI هضم گردید (شکل ۷-الف). پس از الکتروفورز، به نایلون ممبران انتقال یافته و با استفاده از پروب نشاندار

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

الف



ب



شکل ۷. نتایج حاصل از هضم آنزیمی DNA کروموزومی مخمرهای نوترکیب با آنزیم BamHI (قسمت الف) و سپس انجام سادرن بلاتینگ با آنها(قسمت ب). هدف از انجام این آزمایش، تائید تداخل ژن gp63 در DNA کروموزومی مخمر بود.
۱ - gp63 gene، ۲ - DNA کروموزومی مخمر فاقد ژن gp63 کلون شماره ۲۸ به عنوان کنترل منفی (-).CTRL، ۳الی ۵. DNA کروموزومی مخمرهای مظنون به داشتن ژن gp63، کلونهای شماره ۲۴، ۲۵، و ۲۶

تهیه شده (از ژن gp63) آزمون Southern blotting روی DNAهای کروموزومی فوق انجام شد (شکل ۷ - ب).

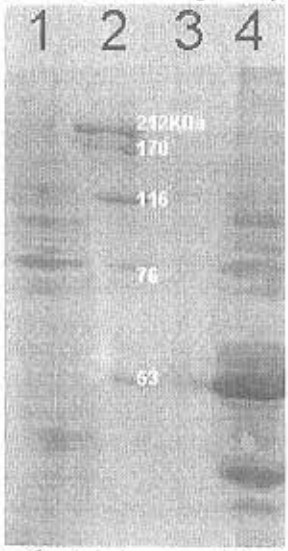
همانگونه که در شکل ۷ مشاهده می‌گردد مشاهدهٔ باندی با اندازهٔ مشابه باند مشاهده شده در مورد کنترل مثبت (ژن gp63) در ردیف ۵ در مورد DNA کروموزومی متعلق به کلون شمارهٔ ۲۶ (ردیف ۵) و عدم مشاهدهٔ باند فوق در مورد کنترل منفی (ردیف ۲) دال بر ورود ژن gp63 در DNA کروموزومی مخمر می‌باشد.

شکل ۷- ب، Southern blot hybridization را با DNA-probe نشان می‌دهد. ستون ۱، DNA (ژن gp63) حاصل از برش پلاسمید نوترکیب pHIL-S1-gp63 متعلق به کلون شمارهٔ ۲۶ با آنزیم BamHI (ستون ۵)، و ستون‌های دیگر DNA کروموزومی هضم شده متعلق به کلون شماره ۲۸ (ستون۲) و سایرین را نشان می‌دهد. هیبریدیزاسیون فقط با DNA موجود در ستون‌های ۱ و ۵ متعلق به ژن gp63 و DNA کروموزومی کلون ۲۶ مخمر انجام شد. مضافاً به این که، DNA probe مذکور در همان منطقه (اندازه مولکولی) که با کنترل مثبت (ژن gp63) هیبرید شده‌است با DNA کروموزومی مخمر متعلق به کلونی شماره ۲۶ نیز هیبرید شده است. اما با DNA ستون‌های دیگرکه مربوط به کلون‌های دیگر است پروب مذکور هیبرید نشده است. این پدیده مبین تداخل (Integration) ژن در DNA کروموزومی کلون شماره ۲۶ می باشد. ناگفته نماند که DNAهای کروموزومی مورد استفاده برای این منظور با استفاده از خرده شیشه استخراج شده‌اند و بنابراین مشاهده باندهای بیشتر DNA حاوی ژن gp63 هم، دور از انتظار نخواهد بود. PCR با پرایمرهای 5-AOX-1 &-3 و اما با DNA ستون‌های دیگرکه مربوط به کلون‌های دیگر است پروب مذکور هیبرید نشده است. این پدیده مبین تداخل (integration) ژن در DNA کروموزومی کلون شماره ۲۶ می باشد. ناگفته نماند که DNAهای کروموزومی مورد استفاده برای این منظور با استفاده از خرده شیشه استخراج شده‌اند و بنابراین مشاهده باندهای بیشتر DNA حاوی ژن gp63 هم، دور از انتظار نخواهد بود. PCR با پرایمرهای 5-AOX-1 &-3 و پرایمرهای طراحی شده برای داخل ژن (PCR4 و PCR3) نیز تداخل ژن gp63 را در DNA کروموزومی مخمر (کلون

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

۲۶) تأئید کردند. پس از کشت کلون‌های مزبور در محیط حاوی گلیسرول و سپس انتقال آنها به محیط حاوی متانول، محیط کشت و القاء و همچنین رسوب سلولی آنها از جهت تولید پروتئین نوترکیب rgp63 با ژل SDS-PAGE، ۱۲ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. در محیط کشت والقاء آنها، حتی پس از تغلیظ با TCA و یا فیلترهای آمیکون پروتئینی هم‌اندازه و یا بزرگتراز rgp63 تخلیص شده از E.coli، که با آنتی‌بادی اختصاصی هم واکنش نماید، مشاهده نگردید. ولی در مایع رویی حاصل از شکسته شدن رسوب سلول‌های القاء شده باندهای پروتئنی هم‌اندازه و سنگین‌تر (شکل ۸، ردیف ۴) از پروتئین نوترکیب rgp63 تخلیص شده ازE.coli (شکل ۸، ردیف ۳)، مشاهده گردید. پروتئین فوق در نمونهٔ کنترل منفی که با پلاسمید pHIL-S1 به تنهائی ترانسفورم شده بود، حتی پس از القاء مشاهده نگردید (شکل ۸، ردیف ۱). عدم وجود باند پروتئینی مزبور در نمونه‌های رشد یافته در محیط حاوی گلیسرول به تنهائی (همان نمونه‌ها) به عنوان نمونه‌های قبل از القاء بیانگر آن است که القاء با متانول سبب تولید پروتئین فوق گردیده‌است. این مشاهده با موارد مورد انتظار، یعنی؛ کلون نمودن ژن gp63 تحت کنترل پروموتور ژن الکل اکسیداز-۱ مخمر مطابقت کامل دارد.این مشاهده با موارد مورد انتظار، یعنی؛ کلون نمودن ژن gp63 تحت کنترل پروموتور ژن الکل اکسیداز-۱ مخمر مطابقت کامل دارد. وسترن بلاتینگ وجود دو باند پروتئینی با قابلیت واکنش‌گری با آنتی‌بادی اختصاصی و در اندازه‌های مشابه و سنگین‌تراز پروتئین نوترکیب بیان شده در E.coli و عدم وجود باندهای پروتئینی مشابه در نمونهٔ کنترل منفی و همچنین نتایج آزمون ایمونوالکترون میکروسکپی دال بر تأئید تولید پروتئین نوترکیب فوق توسط مخمرهای متعلق به کلون‌های یاد شده می‌باشد.

پس از القاء مجدد نمونه‌های فوق و تهیه رسوب سلولی آنها و تثبیت آن با گلوتارآلدئیدو تتراکسید اسمیم، برش‌های تهیه شده از آنها برروی پولک (گرید) قرار گرفته و با استفاده‌از همان آنتی‌بادی اختصاصی استفاده شده برای وسترن بلاتینگ، و آنتی‌بادی نشان‌دار شده با FITC و انجام آزمون IFA بر روی آنان (شکل ۸)،فلوئورسانس مشاهده شده در نمونه‌های مثبت قبلی و منطبق بر همان نواحی مشاهده شده در آزمون‌های قبلی (شکل ۹ - الف) و عدم رؤیت آن در نمونهٔ قبل از القاء و نمونهٔ فاقد ژن حتی پس از القاء (شکل ۹ - ب) مبین بیان ژن و تأئید وجود پروتئین در سیتوزول سلول ترانسفورم شده می‌باشد.

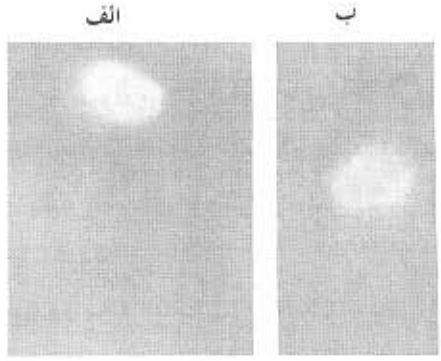


شکل ۸. نتایج الکتروفورز مایع رویی حاصل از شکسته شدن سلول‌ها مخمر القاء شده در ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد. مشاهده باندهای پروتئینی هم‌اندازه و بزرگتر (ردیف ۴) از rgp63 تخلیص شده از E.coli (ردیف ۳) و عدم رویت آنها در مایع رویی حاصل از شکسته شدن سلول‌های کنترل منفی بعداز القاء (ردیف ۱) تأئید کننده بیان ژن gp63 در مخمرهای متعلق به کلون شمارهٔ ۲۶ می‌باشد. ردیف ۲ سایز مارکر پروتئینی HMW می‌باشد.

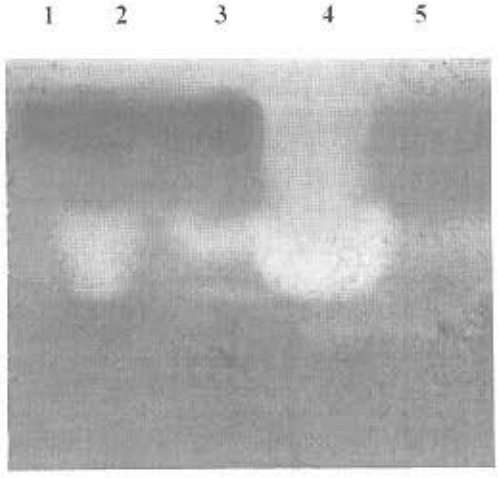
آزمون سنجش فعالیت آنزیمی در SDS-PAGE gelatin gel فعال بودن متالوپروتئیناز نوترکیب را نیز نشان داد (شکل ۱۰). همانگونه که مشاهده می‌گردد، نواحی هضم شده از ژل فوق توسط نمونه های متعلق به ترانسفورمنت شماره ۲۶ (ردیف‌های ۲ و ۳) حاوی مقادیر ۶۰ و ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی (به ترتیب) در منطقه‌ای مشابه ناحیهٔ هضم شده توسط ۶۰ و ۱۰ میکرولیتراز Crud lysate انگل (ردیف‌های ۴ و ۵) ازنظر اندازه (وزن مولکولی) دال بر فعالیت آنزیمی مولکول rgp63 تولید شده توسط مخمر می‌باشد، زیرا رنگ‌آمیزی نواحی هضم‌شده توسط کوماسی‌بلو امکان پذیر نمی‌باشد.عدم فعالیت آنزیمی در نمونه‌ای که قبلا فعالیت داشته است، پس از مجاورت آن با یدواستامید و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

EDTA دال بر حساس‌بودن rgp63 بیان شده در مخمر نوترکیب در مقابل مواد ذکر شده با غلظت‌های فوق می‌باشد.

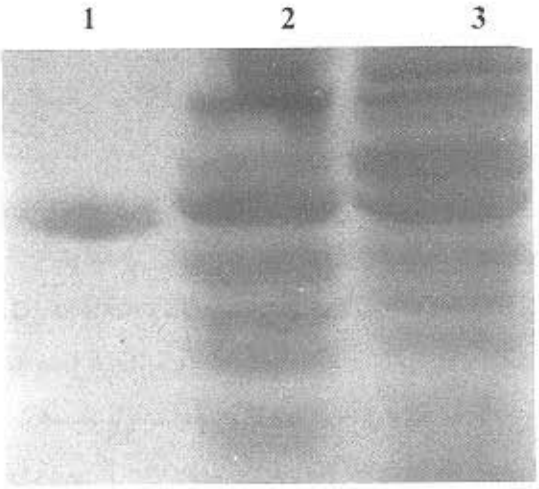


شکل ۹. تأیید بیان ژن gp63 توسط مخمر ترانسفورمنت شماره ۲۶ با روش ایمونوفلوئورسانس. مخمر واجد ژن gp63 (الف) و مخمرفاقد ژن gp63 (ب).



شکل ۱۰. ارزیابی فعالیت rgp63 بیان شده توسط مخمر نوترکیب P.pastoris در SDS-PAGE Gelatin Gel.
1=28/AI, CTRL(-), 2 & 3=60 & 10 uL of 26/AI
4=&5= 60 & 10 uL of Crud lysate of L.major

نتایج آزمون دگلیکوزیلاسیون PNGase-F نیز نشان داد که گلیکوزیلاسیون باعث افزایش وزن مولکولی باندهای بیش از ۵۳ کیلودالتونی متالوپروتئیناز نوترکیب می‌باشد. زیرا وزن مولکولی (MV) تعدادی از باندهای پروتئینی موجود در مایع رویی حاصل از شکست مخمرهای حاوی ژن پس ازالقاء، از جمله باندهای پروتییینی مورد نظر که سنگین تر (شکل ۱۱، ردیف ۳) از rgp63 تخلیص شده از E.coli (شکل ۱۱، ردیف ۱) بودند، پس از مجاورت با آندوگلیکوزیدازF، کاهش یافت (شکل ۱۱، ردیف ۲).



شکل ۱۱. کاهش وزن مولکولی تعدادی از باندهای پروتییینی موجود در مایع رویی حاصل از شکسته شدن سلول‌های مخمرحاوی ژن القاء شده، پس از مجاورت آن با آندوگلیکوزیداز F.
3=26/AI2, 2=26/AI+PNGF, 1=rgp63

بحث

همانگونه که در ژل SDS-PAGE 12% مشاهده گردید (شکل ۸ -الف) و در وسترن، IEM و IFA هم تأئید شد (شکل ۸- ب و ۹) وجود دو باند پروتئینی هم‌اندازه و بزرگتر از مولکول rgp63 بیان شده در E.coli، مبین انجام گلیکوزیلاسیون برروی بیان پروتئین فوق در میزبان اوکاریوتی P.pastoris می‌باشد. با توجه به مشاهدات میکروسکوپ الکترونی و همچنین اندازه‌گیری‌ها با دانسیتومتر، تولید پروتئین فوق زیاد (Overexpression) می‌باشد. از این رو، به طور طبیعی انتظار داریم که بخشی ا ز آن گلیکوزیله نشده باشد. بنابراین هم‌اندازه با پروتئین بیان شده در E.coli باشد. باتوجه به وزن مولکولی gp63 طبیعی که در حدود ۶۳ کیلودالتون می‌باشد و همچنین وجود سه محل N-گلیکوزیلیشن در ژن فوق، اگر علاوه بر دو باند فوق دو باند دیگر هم، با اندازه تقریبی حد فاصل ۵۲ تا ۶۳ کیلو دالتونی دیده شود براساس تعداد محل‌های گلیکوزیله

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

شده و حجم گلیکوزیلاسیون دور از انتظار نخواهد بود. بدیهی است که اگر هیپرگلیکوزیلیشن هم اتفاق افتد باندهای پروتئینی بزرگتراز ۶۳ کیلو دالتونی هم با توجه به حجم گلیکوزیلیشن دیده خواهد شد. بنابراین، بیان ژن gp63 در مخمر P. pastoris به صورت بیش از یک باند پروتئینی در اندازه‌های kDa ۵۳ (معادل فرم غیرگلیکوزیلهٔ rgp63) و سنگین‌تر دور از انتظار نبوده است. نتایج این پژوهش با بیان گلیکوپروتئین‌های ذیل در P. pastoris قابل مقایسه می‌باشد:

- تولید پروتئین دومن خارج سلولی TGF-Beta soluble RII (یک ممانعت کنندهٔ TGF-Beta و دارای سه محل N-گلیکوزیلاسیون) به صورت یک باند KDa ۲۵ همراه بایک اسمیر تاKDa ۶۰. باندهای پروتئینی فوق پس از مجاورت باآندوگلیکوزیداز F، به یک تک باند ۲۲KDa تبدیل شدند [۱۲].

- بیان شدن ژن مربوط به دومن خارج سلولی HTF (Human tissue factor) در سویهٔ SMD1168 مخمر P. pastoris (معیوب از نظر تولید پروتئاز B) منجر به تولید سه باند پروتئینی متمایز بااندازه‌های KDa ۵۴-۳۷ در SDS-PAGE گردید. دومن خارج سلولی hTF دارای ۲۱۹ اسیدآمینه، دو باند دی‌سولفیدی و سه محل برای N-گلیکوزیلاسیون می‌باشد. هر سه باند فوق توسط یک آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی تشخیص داده شدند. قرارگیری باندهای فوق در معرض Endoglycosidase H نشان داد که سه باند فوق نتیجه‌ای از گلیکوزیلاسیون افتراقی این مولکول هستند، زیرا مجاورکردن سه باند فوق با Endo H منجر به تولید یک باند با MW=۳۳KDa گردید[۱].

- پروتئین E در ویروس Dengue تیپ ۱ (DEN-1)، الگوی مخلوطی از گلیکوزیلاسیون دو باند آنتی‌ژنیک KDa 65 (مولکول کامل پروتئین E ویروس dengue تیپ ۱، DEN-1) و kda 50 را به نمایش گذارد[۱۰].

- مخمر نوترکیب (واجد ژن hIL-17) دو باند پروتئینی با اوزان ۲۰KDa فرم گلیکوزیله و باند ۱۶KDa فرم دگلیکوزیله hIL-17 می‌باشد. سکانس ۱۰ اسید آمینه اول هر دو باند پروتئینی فوق (از N ترمینال آنها) نشان داد که این اسیدهای آمینه در هر دو باند فوق یک‌سان می‌باشند. هضم hIL-17 با PNGase F منجر به حذف باند ۲۰KDa و افزایش غلظت باند ۱۶KDa گردید. بنابراین، افزایش وزن مولکولی آن نتیجهٔ N-گلیکوزیلاسیون پروتئین فوق می‌باشد [۱۴].

- گاها پردازش ناکامل سیگنال پپتید نیز می‌تواند منجر به تولید باندهای پروتئینی سنگین‌تر از همتاهای طبیعی آنان گردد.

تولید دو باند (Wheat lipid transfer protein) WLTP در اندازه‌های ۱۴KDa و ۱۰KDa، باند ۱۴KDa (۱۳۶۸۰Da) مربوط به پروتئین پردازش نشده است که بخش‌هایی از سکانس سیگنالی اسید فسفاتاز و همچنین سکانس سنتتیک رهبر(Leader) که در داخل Construct جاسازی شده، بریده نشده و بنابراین کد شده بود[۷].

P. pastoris- ترانسفورم شده با pHIL-D2prepro alfa-S (حاوی cDNA سم سلولی آلفا- سارسین با سکانس Leader peptide خود ژن) و همچنین ترانسفورم شده با pHIL-S1prepro alfa-S (حاوی cDNA سم سلولی آلفا- سارسین ممزوج شده با سکانس سیگنال ترشحی اسید فسفاتاز PHO1 مخمر)، هر دو فرم کامل Mature و Pro-alfa-sarcin را ترشح نمودند. وجود Pro-alfa-sarcin در محیط خارج سلولی مخمر ناشی ازتشخیص ناکارآمد توسط یک آندوپپتیداز مشابهٔ پروتیئن Kex2 مشهور، بوده‌است [۱۵].

تجزیه زیستی پروتئین فوق تحت تأثیر عوامل مختلف از جمله پروتئازها که مشکل لاینحلی را در کار با مخمر می‌نمایاند ممکن است منجر به رؤیت باندهای کوچکتر از ۵۲ کیلودالتونی نیز منتهی شود.

بنابراین، تولید پروتئین هترولوگ با اندازهٔ کوچکتراز فرم دگلیکوزیله نیز همانند آنچه که در واکنش با آنتی‌بادی شمارهٔ ۲۳۵ دیده شد نیز مقدور می‌باشد. به ذکر موردی دراین خصوص بسنده می‌گردد، بااستفاده از سویه معیوب از نظر تولید کربوکسی پپتیداز y (ژن pep4)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

سویهٔ SMD1168 [۱۸] و همچنین استفاده از وکتور ترشحی با سیگنال پپتید آلفا- فاکتور (پلاسمید دو میزبانه pIC9) برای تولید آندوستاتین (انسانی و موشی) علاوه بر تولید ملکول کامل، ملکول‌های پروتئینی کوتاه شده (دو باند) بویژه از ناحیه کربوکسیل پروتئین نیز تولید شد [۴]. بنابراین، ناپایداری gp63 تولید شده توسط مخمر P. pastoris و همچنین مشاهده باند پروتئین کوتاه شده آن در وسترن بلاتینگ با منوکلونال آنتی‌بادی اختصاصی ۲۳۵ با توجه به تجربیات اندیشمندانی چون Boehme و همکارانش نیز کاملاً طبیعی و در حد انتظار می‌باشد، بویژه آن که در این پروژه هم کارایی سیگنال پپتید مخمری استفاده شده در وکتور دو میزبانهٔ pHIL-S1 (اسید فسفاتاز PHO1)، کمتر از کارایی سیگنال پپتید مخمری آلفا- فاکتورمی باشد، به گونه‌ای که سیگنال پپتید PHO1 برای اهداف مکان یابی پروتئین‌های نوترکیب نیز کاربرد دارد [۱۸] و هم میزبان مورد استفاده توسط آنها از تولید کربوکسی پپتیداز y (ژن pep4) معیوب بود. دراین مطالعه از سویه‌های KM71 و GS115 مخمر P. pastoris به عنوان میزبان برای بیان ژن gp63 استفاده شد.

در تجربهٔ دیگری باجود استفاده از سویه معیوب از نظر تولید کربوکسی پپتیداز y (ژن pep4) سویهٔ [SMD1168 [۱۹] و همچنین استفاده از وکتور ترشحی با سیگنال پپتید آلفا- فاکتور، پلاسمید دو میزبانه pIC9، باز در تولید ملکول کامل آندوستاتین (انسانی و موشی) مشکل داشتند به گونه‌ای که علاوه بر تولید ملکول کامل این پروتئین، ملکول‌های پروتئینی کوتاه شده (دو باند) بویژه از ناحیه کربوکسیل پروتئین نیز تولید می‌شد. تلاش آنها برای حذف باندهای پروتئینی کوتاه شده (و یا به عبارت دیگر فقط برای تولید پروتئین کامل) حتی با تخریب ژن KEX1 در مخمر P. pastoris و بهینه سازی شرایط بیان ژن آندوستاتین با موفقیت کامل همراه نبود، بلکه حداکثر توانستند نسبت این دو باند کوتاه شده را نسبت به باند اصلی تقلیل دهند [۴].

با توجه به نقش پروتئازهای مخمری در تخریب پروتئین‌های هترولوگ بیان شده توسط مخمر، استفاده از روش IEM(Immune-electron microscopy) نیز برای تائید بیان و یا عدم بیان ژن خارجی کلون شده در مخمر نوترکیب و همچنین تعیین جایگاه سلولی تجمع پروتئین فوق یک روش پذیرفته شده است. برای مثال، پس از القاء با متانول، ایمونوبلات وجود یک باند آنتی‌ژنتیک اختصاصی ۶۵KDa را در محیط کشت GS115/CprME به اثبات رساند. این وزن مولکولی برای پروتئین E گلیکوزیله و پردازش شده بطور صحیح مطابقت دارد. برعکس، هیچ پروتئین E نوترکیب، DEN-1، در محیط کشت علیرغم تکرار غربالگری مشاهده نگردید. هضم پروتئولیتیکی وسیع پروتئین E ویروس DEN-1 بیان شده و همچنین پروتئین E ویروس JEV (ویروس آنسفالیت ژاپنی) در مخمرتوسط فعالیت یک پروتئاز ناشناخته مخمری مشاهده شد [۲۲]. باتوجه به رؤیت دو باند کاملا مجزا در وسترن با آنتی‌بادی اختصاصی، هم اندازه با پروتئین بیان شده در E.coli و بزرگ‌تر از آن (شکل ۹) دال برتولید پروتئین فوق به دو فرم گلیکوزیله کامل و غیرگلیکوزیله می‌باشد. نتایج آزمون دگلیکوزیلاسیون نیز مبین این اتفاق می‌باشد (شکل ۱۱).

تشکر و قدردانی

هزینه این تحقیق، توسط سازمان‌های TDR، بانک جهانی، UNDP و گرانت شمارهٔ TDR ID#961011 و نیز نهاد ریاست جمهوری اسلامی ایران تامین است. از تمام همکاران و پرسنل بخش بیوتکنولوژی، به ویژه آقای دکترحبیبی، آقای دکتر معین، آقای دکتر عزیزی، آقای عادلی، از همکاران بخش ایمنولوژی آقای دکتر خبیری، آقای دکتر میرجلیلی، خانم دکتر ملک‌زاده، همکاران بخش میکروسکوپ الکترونی به ویژه آقای سیدی‌پور و سرکار خانم طائب باحمایت‌های عملی خود امکان انجام این تحقیق را فراهم نموده‌اند، تقدیر و تشکر می‌شود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

منابع

[1] Abdulaev, N.G.., Popp, M.P., Smith, W. C. and Ridge, K. D., Functional expression of bovin opsin in the methylotrophic yeas; Pichia pastoris, Protein Express. Purif., 10 (1997) 61-69.

[2] Angela, J., Austin, C. E. J. and Ginovan H.. Production of human tissue factor using the Pichia pastoris expression system, Protein Express. Purif., 13 (1998) 136-142.

[3] Ashford, R.W., Desjeuc, P. and Deradt, P., Estimation of population at risk infection with Leishmaniasis, Parasitol. Today, 8(1992) 104-105.

[4] Boehm,T., Pirie-Shepherd, S., Trinh, L. B., Shiloach, J. and Folkman, J., Disruption of the KEX1 gene in Pichia pastoris allows expression of full-length murine and human endostatin, Yeast 15 (1999) 563-572.

[5] Bordier , C. The promastigote surface of Leishmania, Parasitol. Today, 2(1987) 473-479.

[6] Botton, L.L., Reiner, N.E. and McMaster, W.R., Modification Gp63 genes from divers species of Leishmania for expression of recombinant protein at high levels in E.coli, Mol. Biochem. Parasitol., 44 (1991) 213-224.

[7] Cecile, K., Ferederic de Lamotte, G., Francois, G., Guy Moulin, H. B., Philippe, J. and Marie-Francoise, G., High-level secretion of a wheat lipidTransfer protein in Pichia pastoris, Protein Express. Purif., 13 (1998) 73-82.

[8] Clare J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A., High-level expression of tetanus toxin fragment C in Pichia pastoris strains containing multiple tandem integration of the gene, Biotecnology, 9 (1991a) 455-459.

[9] Connell, N.D., Medina-Acesta, E., McMaster, R. and Bloom, B.R., Effective immunization against cutaneous leishmaniosis with recombinant bacille calmette-Gurein expressing the leishmania surface proteinase gp63, Proc. Natl. Acad. Sci (USA)., 90 (1993) 11473-11477.

[10] Fonsacs, B.A.L., Pincus, S., Shope, R. E., Paoletti, E. and Mason, P. W., Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralising antibodies in mice, Vaccine, 12 (1994) 279-285.

[11] Giecheru, M.M. and Olobo, J.O., Evaluation of recombinat Gp63, The major Leishmania surface glycoprotein, as a diagnostic molecule for Leishmaniasis in vervet monkeys, Acta Trop., 58 (1994) 45-348.

[12] Harrie, L.G., Glansbeek, H. M., Van B., Elly, L. Vitters, P. M. Vanderm, K. and Wim, B., E xpression of recombinant human soluble type II transforming growth factor-ß receptor in Pichia pastoris and Escherichia coli: two powerful systems to express a protent inhibitor of transforming growth factor-ß, Protein Express, Purif., 12(1998) 201-207.

[13] Hyun, A.H., Kang, Jung-Hoon Sohn; Eui-Sungchoi; Bong Hyun Chung; Meyonng-Hee, yu ANA Sang-ki Rhee;

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

glycosylation of human a1 -antitrypsin in saccharomyces cervisiae and methylotrophic yeasts, Yeast, 14 (1998) 371-381.

[14] Kevin, M., Murphy, J.R., Gagne, P., Pazmany, C. and Moody, M. D., Expression of human interleukin-17 in Pichia pastoris: purification and characterization, Protein Express. Purif., 12 (1998)208-214.

[15] Martinez-Ruiz, A., Martinez del Pozo, A., Lacadena, J., Mancheno, T. M., Onaderra, M., Lopez-Otin, N., and Gavilanes, J. G., Secretion of recombinant pro and mature alpha-sacrin ribotoxin by the methylotrophic yeast Pichia pastoris: the Lys-Arg motif is rrquired for mutation, Protein Express. Purif., 12 (1998) 315-322.

[16] Mcs and sorley S.J., XU, D., Liew, F.Y., Vaccine efficacy of salmonella strains expressing glycoprotein 63 with different promoters, Infec. Immunity, 65 (1997) 171-178.

[17] Michael, R., Christopher, E. and Bussineau,B., Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast, Curr. Opinn. Biotecnol.,7 (1996) 525-530.

[18] Najmoutin, G., Abdulaev, N. G. and Kevin, D. R., Heterologous expression of bovin opsin in Pichia pastoris, Methods Enzymol., 315 (2000)3-11.

[19] Ohi, H., Cregg, J. M., Verdick, T.S. and Raschke, W. C., Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris, Biotechnology, 11 (1996) 905-910.

[20] Russell, D. G. and Alexander, J., Effective immunization against cutaneous Leishmaniosis with defiend membrane antigens reconstituted into liposomes, J. Immunol., 140 (1988) 1274-1279.

[21] Russell, D.G. and Wilhelm, H., The involvment of glycoprotein (gp63) of Leishmania promastigotes in attachment to macrophages, J. Immunol., 136(1986) 2613-2620.

[22] Sugrue, R. J., Fu, J., Howe, J., and Chan, Y. C., Expression of the dengue virus structural proteins in Pic hia pastoris leads to the generation of virus-like particles, 78 (1997) 1861-1866.

[23] Xu, D., Ssorley, M., Chatfield, S.J., Dougani, S.N. and Liew, F.Y., Protection against Leishmania major infection in genetically susceptible BALB/ C mice by Gp63 delivered onally in attenuated salmonella typhimulium (ArOA-, ArOD-), Immunology, 85 (1995) 1-7.

[24] Yang, D.M., Fairweather, N., Botton L.L., McMaster, W.R., Kahi, L.P., Leiw, F.Y., Salmonella typhimurium (AroA-) vaccine expressing major Leishmania surface protein (gp63) preferentially induces T-helper1 cells and protective immunity against Leishmaniasis, J. Immunol., 145 (1990) 2281-2285.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

The production of recombinant 63kDa glycoprotein of Leishmania major by methylotropic yeast Pichia Pastoris

A. A. Shaebani*[1] (Ph.D), R.W. McMaster[3] (Ph.D), B. Kasemi[4] (Ph.D), M. Karimi[1] (M.Sc), D.Shahbzzadeh[1] (Ph.D), F. Mahboudi[2] (Ph.D)

1 - Dept. of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2 - Dept. of Biotechnology Studies, Scientific and Technology Studies Office of Presidency of Iran, Tehran, Iran

3 - Dept. of Medical Genetic, Faculty of Medicine, British Colombia University, vancouver, Canada

4 - Dept. of Microbiology and Parasitilogy, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Introduction: Cutaneous lesihmahiasis (L) is a world wide infectious disease. Several approach toward vaccine have been taken around the world. Recombinant vaccines using gp63 in coctail form is one of the candidates. Because, a significant protection against a challeng with L. major was elicited in senssitive BALB/C mice after vaccination with recombinant BCG producing gp63, as well as, gp63 delivered orally by salmonella typhimurium C an preferably induce the development of Th-1 subset of CD4+ T cells. Since expression of eukaryotic genes are similar to Pichia pastoris as a eukaryotic cell, refolding and glycosylation may be analogous to native form. GP63 gene from L. major (NIH strain) cloned and expressed in Pichia pastoris.

Materials and Methods: Modified gp63 gene that encoded mature protein only (478 aa) cloned in shuttle vector pHIL-S1. Under control of alcohol oxidase 1 gene promotor (pAOX1) with yeast acid phosphatase signal sequence (PHO1). KM71 and GS115 strains of Pichia pastoris transformed with it and selected on histidine minus medium. PCR and Southerbn blotting were done on chromosomal DNA of transformants yeast. Expression of rgp63 was evaluated by using Northern blotting, SDS-PAGE, Western-blotting and immunoelectron microscopy. Its activity was evaluated by using SDS-PAGE gelatin gel.

Results: PCR and Southern blotting analysis on chromosomal DNA of trnsformants have been demonstrated that gp63 gene integrated into chromosomal DNA of yeast. Expression of rgp63 in transformants of Pichia pastoris confirmed by using Northern blotting and SDS-PAGE. The findings were cinfirmed by Western blotting analysis and immunoelectron microscopy too.

Conclusion: Rgp63 expressed in Pichia pastoris had glcosylated form too. It was active on SDS-PAGE gelatin gel. Thus, it was more similar to native gp63.

Keywords: Expression; gp63; Leishmania; Yeast; Pichia pastoris

* Corresponding author. Fax: 0231-3331551; Tel: 0231-3332080

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]