

مهندسی و کتور pPICZαA جهت بهینه‌سازی بیان پروتئین‌های نوترکیب در میزبان بیانی *Pichia pastoris* با استفاده از جایگزینی نشانگرهای انتخابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و آکسوتروفی

سلیمه حسنی^{۱#}، الهام بهوندی^{۲#}، قاسم باقرپور^{۳*}

^۱ کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۳ مرکز تحقیقات زیست فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

سلیمه حسنی و الهام بهوندی به طور مساوی در این کار همکاری داشته‌اند.

* نویسنده مسئول: گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران. ایمیل: bagherpour.4631@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۷

چکیده

مقدمه: پلاسمیدها در حوزه علم بیوتکنولوژی یکی نقش مهمی در انتقال و دستکاری DNA هترولوگ موجود در سلول‌های میزبان جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب ایفا می‌کنند. پروموتور پلاسمید pPICZαA با دارا بودن پروموتور AOX1 یکی از بهترین و کتورهای بیانی در سویه‌های پیکیا پاستوریس محسوب می‌شود. اما محصول ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک زئوسین (BleR) می‌تواند در طول رشد پایدار برای میزبان سمی باشد. همچنین گران بودن آنتی‌بیوتیک زئوسین می‌تواند به‌عنوان یک مانع در استفاده از این پلاسمید جهت کارهای مربوط به کلونینگ به‌شمار رود.

اهداف: هدف از این مطالعه کلونینگ ژن‌های مقاومت به کانامایسین (KanR) و هیستیدینول دهیدروژناز (HIS4) جهت راحتی در انتخاب کلون‌ها در باکتری‌های ترانسفورم‌شده با استفاده از ژن KanR و همچنین در مخمرهای آکسوتروف به هیستیدین و کاهش هزینه از طریق حذف آنتی‌بیوتیک زئوسین است.

مواد و روش‌ها: برای هر کدام از ژن‌های مورد نظر مراحل PCR و مراحل کلونینگ در پلاسمید pPICZαA انجام گردید، در مرحله بعدی ژن GFP به‌عنوان ژن کنترل جهت تست کارکرد ژن مقاومت به KanR در باکتری در پلاسمید pPICZαA کلون شد و همچنین تست عملکردی ژن HIS4 و در مخمر پیکیا پاستوریس آکسوتروف GS115 بعد از کلونینگ ژن مورد نظر در محیط YNB (Yeast Nitrogen Base) به همراه آمینواسید هیستیدین و بدون آن انجام شد.

نتایج: مراحل انجام PCR و کلونینگ برای هر دو ژن مورد نظر در پلاسمید pPICZαA با موفقیت به انجام رسید و نتایج مقاومت به آنتی‌بیوتیک KanR و رشد در محیط بدون آمینواسید هیستیدین مثبت بودند و همچنین بیان ژن GFP نیز با وسترن بلات ثابت گردید. **نتیجه‌گیری:** پلاسمید pPICZαA با تغییرات اعمال شده، قابلیت انتخاب در باکتری از طریق ژن مقاومت به کانامایسین (Kan) و همچنین انتخاب در مخمر آکسوتروف پیکیا پاستوریس با استفاده از ژن هیستیدینول دهیدروژناز ۱ (HIS4) را دارا شد، که می‌تواند هزینه‌های کلونینگ و بیان در مخمر را به طور قابل توجهی کاهش دهد.

کلمات کلیدی: پیکیا، پروتئین نوترکیب، بیان ژن، پلاسمید

۱. مقدمه

به‌شدت تنظیم‌شده برای ژن الکل اکسیداز AOX1 موجود در این مخمر است (۱، ۲). در سلول‌های کشت داده شده در حضور متانول، بیان الکل اکسیداز به‌دلیل قدرت مربوط به پروموتور AOX1 به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد، که اساس استفاده از پیکیا پاستوریس به‌عنوان یک سیستم بیان پروتئین هترولوگ است (۳). پلاسمیدها به‌عنوان ناقلینی که توانایی انتقال DNA خارجی به درون سلول را دارند شناخته می‌شوند که در بین

مخمرها به سبب مزایای قابل توجه خود، از جمله توانایی انجام اصلاحات پس از ترجمه مطلوب، رشد سریع، دستکاری ژنتیکی آسان، تخمیر مقیاس‌پذیر، غلظت بالای زیست توده و تولید ایمن و عاری از پاتوژن، به‌عنوان کارخانه‌های پروتئین کارآمد شناخته می‌شوند. یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در استفاده از پیکیا پاستوریس (*Pichia pastoris*) به‌عنوان یک کارخانه سلولی برای تولید پروتئین، پروموتور قوی، القایی و

غزالگری می‌شوند بسیار محتاط باشند (۱۱). اگرچه اندازه ژن مقاومت به زئوسین کوچک است مناسب کلونینگ ژن‌های بزرگ در پلاسמיד است، اما هزینه آنتی‌بیوتیک زئوسین، به‌ویژه برای بیان در مقیاس بزرگ، به‌طور قابل توجهی بالاتر است و آن را به انتخابی نامناسب تبدیل می‌کند (۱۲). زئوسین، با وجود کارایی بالا در انتخاب سلول‌های یوکاریوتی، به‌دلیل هزینه بالای آن می‌تواند به‌عنوان یک عامل محدودکننده در پروژه‌های تحقیقاتی و تولیدی در بیوتکنولوژی در نظر گرفته شود. این هزینه‌های بالا می‌تواند به‌ویژه برای آزمایشگاه‌های کوچک و پروژه‌های مقیاس پایین چالش‌برانگیز باشد (جدول ۱). جهت برطرف کردن مشکلات ناشی از زئوسین، جایگزینی ژن مقاومت به زئوسین با ژن مقاومت به کانامایسین (KanR) از دو جهت می‌تواند مفید باشد: ژن مقاومت به کانامایسین می‌تواند به‌ترتیب در باکتری‌ها و پیکیا پاستوریس به کانامایسین و جنیتیسین مقاومت ایجاد کند. از سوی دیگر، چون جنیتیسین مشابه زئوسین یک آنتی‌بیوتیک گران قیمت در فرایندهای مربوط به کلونینگ است، کلون کردن ژن هیستیدینول‌دهیدروژناز (His4) در پلاسמיד pPICZαA با فراهم کردن امکان انتخاب بدون آنتی‌بیوتیک در سویه GS115 مخمر پیکیا پاستوریس می‌تواند به رفع این مشکل کمک کند. در این مطالعه امکان جایگزینی ژن مقاومت به کانامایسین به‌جای ژن مقاومت به زئوسین و کلون کردن ژن هیستیدینول‌دهیدروژناز در پلاسמיד pPICZαA با هدف حذف استفاده از آنتی‌بیوتیک زئوسین در انتخاب کلونی در باکتری‌ها و مخمرها بررسی شد. به‌علاوه جهشی در جایگاه آنزیم برشی XbaI درون ژن هیستیدینول‌دهیدروژناز با استفاده از یک پرایمر معکوس ایجاد شد.

آن‌ها پلاسמיד pPICZαA، با داشتن ویژگی‌هایی همچون پروموتور قوی AOX1، طول ۳/۶ کیلوبایت و چندین جایگاه برش یکی از بهترین ناقل‌های بیانی در سویه‌های پیکیا پاستوریس محسوب می‌شود. در عین حال، ژن مقاومت به زئوسین که به‌عنوان نشانگر انتخابی در این ناقل استفاده می‌شود، برای انتخاب در هر دو سلول باکتری و پیکیا مناسب است (۷-۴). زئوسین یک آنتی‌بیوتیک گلیکوپپتیدی و عضوی از خانواده بلئومایسین/فلئومایسین است که اولین بار از *Streptomyces verticillus* جداسازی شد. زئوسین پس از فعال شدن می‌تواند رادیکال‌های هیدروکسیل تولید کند، لیپیدها را اکسید کند، پیوندهای آمیدی پروتئین‌ها را هیدرولیز کند و DNA و RNA تکرشته‌ای و دورشته‌ای را بشکند. میزان شکست DNA به غلظت زئوسین و زمان انکوباسیون بستگی دارد (۸). اگرچه زئوسین یک نشانگر انتخابی خوب برای توسعه رده سلولی خصوصاً کشت‌های رده سلولی HT1080 و HEK293 که GFP را به‌عنوان گزارشگر بیان می‌کنند، است (۹)، اما مشخص شده است که زئوسین حتی پس از سم‌زدایی نیز به‌دلیل بیان پایدار ژن Shble (ژن مقاومت به بلئومایسین در باکتری *Streptoalloteichus hindustanus* که پروتئین Sh را که میل ترکیبی شدیدی برای خانواده آنتی‌بیوتیک‌های فلئومایسین دارد کدگذاری می‌کند و باعث مقاومت در برابر زئوسین می‌شود) می‌تواند DNA را در کلون‌های نوترکیب SK-OV-3 تخریب کند (۱۰). قرار گرفتن مداوم سلول‌های در حال تقسیم در مجاورت زئوسین می‌تواند منجر به بروز جهش‌های تجمعی و پاسخ‌های سازگاری با محیط شود که می‌تواند منجر به تغییرات بیولوژیکی قابل توجهی شود. بنابراین، محققان باید در تفسیر داده‌های مربوط به رده‌های سلولی پایدار که با زئوسین

جدول ۱. مقایسه پنج آنتی‌بیوتیک رایج در تحقیقات مولکولی از نظر هزینه، کاربرد و مقاومت ایجادشده در میزبان‌ها

آنتی‌بیوتیک	هزینه	کاربرد	مقاومت	کاربرد
آمپی‌سیلین	کم	معمولاً برای انتخاب پلاسمیدها در <i>E. coli</i> استفاده می‌شود	مؤثر روی بسیاری از باکتری‌های گرم منفی	معمولاً برای انتخاب پلاسمیدها در <i>E. coli</i> استفاده می‌شود
کانامایسین	متوسط	برای انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها استفاده می‌شود	آنتی‌بیوتیک با طیف وسیع، مؤثر روی باکتری‌های مختلف	برای انتخاب سلول‌های ترانسفکت شده در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها استفاده می‌شود
کاربنی‌سیلین	کم	معمولاً برای انتخاب پلاسمیدها به‌ویژه در برابر باکتری‌های تولیدکننده پنی‌سیلیناز استفاده می‌شود	مؤثر روی باکتری‌های تولیدکننده پنی‌سیلیناز	معمولاً برای انتخاب پلاسمیدها به‌ویژه در برابر باکتری‌های تولیدکننده پنی‌سیلیناز استفاده می‌شود
اسپکتینومایسین	متوسط	عمدتاً در سیستم‌های باکتریایی استفاده می‌شود	عمدتاً مؤثر روی باکتری‌های گرم منفی	عمدتاً در سیستم‌های باکتریایی استفاده می‌شود
زئوسین	بالا	برای انتخاب سلول‌های یوکاریوتی استفاده می‌شود	مؤثر روی طیف وسیعی از موجودات	برای انتخاب سلول‌های یوکاریوتی استفاده می‌شود

۲. اهداف

هدف از این مطالعه کلونینگ ژن‌های مقاومت به کانامایسین (KanR) و هیستیدینول دهیدروژناز (HIS4) جهت راحتی در انتخاب کلون‌ها در باکتری‌های ترانسفورم‌شده در باکتری‌ها با استفاده از KanR و همچنین در مخمرهای آکسوتروف به هیستیدین و کاهش هزینه از طریق حذف آنتی‌بیوتیک زئوسین است.

۳. مواد و روش‌ها

۱.۳. کشت سوبه باکتریایی و مخمري

برای تکثیر پلاسمیدهای نو ترکیب از سوبه TOP10 (Invitrogen) باکتری *اشریشیا کلی* استفاده شد. باکتری‌های ترانسفورم‌شده روی محیط آگار LB (Luria-Bertani) غنی‌شده با کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انتخاب شدند. سوبه GS115 (Invitrogen) مخمر *پیکیا پاستوریس* در

محیط کشت YPD که شامل ۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد پپتون و ۲ درصد گلوکز است، تکثیر شد و مخمرهای ترانسفورم‌شده نیز روی پلیت‌های YNB AGAR حاوی ۲ درصد آگار، ۲ درصد دکستروز و ۰/۶۷ درصد YNB انتخاب شدند.

۲.۳. طراحی پرایمر و PCR

توالی ژن‌های مقاومت به کانامایسین و هیستیدینول دهیدروژناز از سایت NCBI به دست آمد و پرایمرها با جایگاه‌های برش مورد نیاز طراحی (جدول ۲) و توسط شرکت متابیون (آلمان) ساخته شدند. از پلاسمید pPIC9K به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن‌های مقاومت به کانامایسین و هیستیدینول دهیدروژناز با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آن‌ها استفاده گردید (جدول ۳ و ۴). علاوه بر این، پلاسمید pTracer-CMV2 (Invitrogen) برای تکثیر ژن GFP با پرایمرهای اختصاصی آن استفاده شد. اندازه محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد و در ادامه محصولات PCR با استفاده از کیت استخراج از ژل DNA (Fermentas) خالص‌سازی و برای کلونینگ استفاده شدند.

جدول ۲. لیست پرایمرهای استفاده شده، جایگاه‌های آنزیم برش و طول محصول PCR الف

اندازه محصول (bp)	Cut site	دما (°C)	پرایمرها توالی
۸۳۴	NcoI	۷۲	TATCCATGGATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCCAGGCCGCGATTAAT TCC F G418
	EcoRV	۵۸	TATGATAICTTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG R G418
۲۹۶۶	BglII	۶۲	TATAATGGTTAATTGGTTGTAACACTGG His F
	BglII	۷۲	TATAGATCITTAATAAGTCCCAGTTTCTCCATACGAACCTTAACAGCATTGCGGTGA GCATCAAGACCTTCAACAG His R
۷۰۵	EcoRI	۵۹	ATAGAATTCAAAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG GFP R
	XbaI	۶۴	ATATCTAGAGCCATGTGTAATCCCAGCAGC GFP F

الف جایگاه‌های برش با حروف پررنگ و زیرخط‌دار نشان داده شده‌اند. برای حذف جایگاه *XbaI* موجود در ژن مقاومت به کانامایسین (Kan) و جایگاه *XbaI* موجود در ژن هیستیدینول دهیدروژناز (HIS4)، به ترتیب باز G در پرایمر FG418 به C و باز T در پرایمر His R به A تغییر داده شد، که با حروف پررنگ و با خط در زیر آن‌ها نشان داده شده‌اند.

جدول ۳. برنامه انجام واکنش PCR و زمان‌های مربوط به هر مرحله برای ژن مقاومت کانامایسین (۸۳۴ جفت باز) با استفاده از آنزیم Pfu Mastermix 2X مربوط به شرکت یکتا تجهیز آزما

مراحل	دما (°C)	زمان	چرخه
واسرشت‌سازی اولیه (Initial denaturation)	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشت‌سازی (Denaturation)	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگر / اتصال پرایمر (Annealing)	۵۸	۳۰ ثانیه	۳۵
طول‌سازی (Extension)	۷۲	۱ دقیقه	۳۵
طول‌سازی نهایی (Final extension)	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۴. برنامه انجام واکنش PCR و زمان‌های مربوط به هر مرحله برای ژن هیستیدینول دهیدروژناز (۲۹۶۶ جفت باز) با استفاده از آنزیم Pfu Mastermix 2X مربوط به شرکت یکتا تجهیز آزما

مراحل	دما (C°)	زمان	چرخه
واشرشت‌سازی اولیه (Initial denaturation)	۹۴	۵ دقیقه	۱
واشرشت‌سازی (Denaturation)	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگر / اتصال پرایمر (Annealing)	۶۰	۳۰ ثانیه	۳۵
طول‌سازی (Extension)	۷۲	۲ دقیقه	۳۵
طول‌سازی نهایی (Final extension)	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

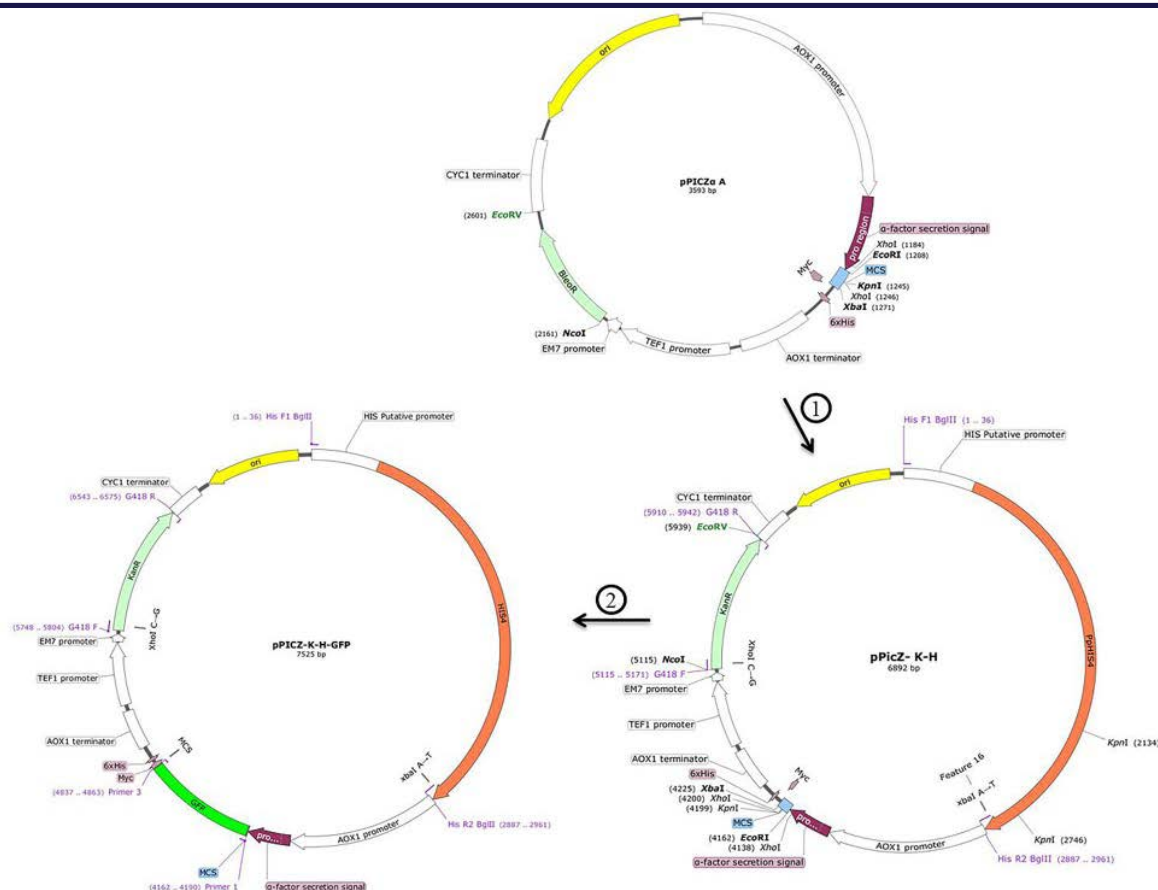
۳.۳. ساخت و تأیید سازه بیانی

برای ساخت پلاسمید pPICZαA-KanR، در ابتدا ژن مقاومت به کانامایسین (۸۱۶ جفت باز) از پلاسمید pPIC9K (Invitrogen) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی G418 F و G418 R (جدول ۱) به روش PCR تکثیر شد. برای حذف محل برش XbaI در این ژن، نوکلئوتید G بدون تغییر بدون سرین به نوکلئوتید C در پرایمر معکوس تغییر یافت. سپس محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های EcoRV و NcoI برش داده شد و توسط آنزیم لیگاز به ناقل pPICZαA برش خورده با همان آنزیم‌ها متصل گردید و بدین ترتیب این ژن جایگزین ژن مقاومت به بلنومایسین گردید. سپس باکتری‌های ترانسفورم شده که پلاسمید pPICZαA-KanR وارد آن‌ها شده به وسیله پلیت‌های آگار LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن مقاومت به کانامایسین توسط Colony PCR غربالگری شدند و در ادامه نیز کلونی‌های انتخاب شده با روش‌های برش با آنزیم‌های محدودکننده و تعیین توالی پلاسمید تأیید شدند. به همین ترتیب، از پلاسمید pPIC9K و پرایمرهای اختصاصی His F و His R برای تکثیر ژن هیستیدینول دهیدروژناز (۲۹۶۷ جفت باز) استفاده شد (جدول ۱). برای ساخت پلاسمید pPICZαA-Kan-His4، محصول PCR ژن هیستیدینول دهیدروژناز پس از برش توسط آنزیم محدودکننده BglIII توسط آنزیم لیگاز به پلاسمید pPICZαA-Kan خطی شده توسط همان آنزیم [پس از تیمار با آلکالین فسفاتاز (Fermentas)] متصل شد و مانند مرحله قبل Colony PCR و برش با آنزیم‌های محدودکننده برای تأیید کلونینگ انجام شد. علاوه بر این، برای سنجش عملکردی ژن هیستیدینول دهیدروژناز، پلاسمید pPICZαA-Kan-His4 (pPIC-K-H) با آنزیم SacI خطی شد و سپس

با روش الکتروپوریشن به سویه GS115 پیکیا پاستوریس وارد شد. مخلوط ترانسفورماسیون روی پلیت‌های آگار YNB بدون هیستیدین کشت داده شد و به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شد تا گونه‌های ترانسفورم شده، انتخاب شوند. گونه‌های ترانسفورم شده His+ که ژن هیستیدینول دهیدروژناز را از طریق ادغام پلاسمید در ژنوم خود دریافت کرده‌اند می‌توانند ژن جهش یافته هیستیدینول دهیدروژناز موجود در مخمر را تکمیل و پروتئین هیستیدینول دهیدروژناز را کد کنند و در محیط رشد فاقد هیستیدین رشد کنند. به علاوه، برای غربالگری عملکردی در خصوص ژن مقاومت به کانامایسین، مخمرهای GS115 حاوی پلاسمید pPIC-K-H در محیط YNB حاوی آنتی‌بیوتیک GS418 کشت داده شد.

۴.۳. ساخت و بیان کاست GFP

برای ساخت پلاسمید pPIC-H-K-GFP، از آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و XbaI برای برش محصول PCR ژن GFP و پلاسمید pPIC-H-K خطی شده استفاده شد (تصویر ۱). ۱۰۰ میکرولیتر از محصول پلاسمید ساخته شده پس از استخراج از طریق روش الکتروپوریشن به مخمرهای GS115 وارد شد و سلول‌های ترانسفورم شده روی پلیت‌های حاوی محیط کشت YNB آگار پخش شدند. از Colony PCR برای تأیید ادغام پلاسمید جدید در ژنوم مخمر استفاده شد. سپس کلونی‌های مثبت در محیط کشت YPDS در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰ RPM تا رسیدن به OD600 تقریباً ۱/۵ رشد داده شدند. متعاقباً، ۲۰۰ میکرولیتر از این پیش کشت برای تلقیح ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت BMGY استفاده شد که سپس به مدت یک شب (۱۶ ساعت) آنکوبه شد.



تصویر ۱. نمایش شماتیک پلاسمید pPIC2-Kan-His ساخته شده. این تصویر، نمایش شماتیک پلاسمید pPIC2-Kan-His ساخته شده با استفاده از KanR را نشان می‌دهد. در مرحله اول، ژن مقاومت به کانامایسین با استفاده از آنزیم برشی BglII به پلاسمید وارد شد. همچنین ژن هیستیدین دهیدروژناز (His4) با استفاده از آنزیم‌های برشی NcoI و EcoRV وارد گردید. در مرحله دوم، برای تأیید صحت پلاسمید جدید، ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP) در پلاسمید pPIC2-Kan-His کلون شد.

قرار گرفتند. بیان GFP نو ترکیب از طریق روش وسترن بلات و با استفاده از رقت ۱:۵۰۰ آنتی‌بادی ضد His متصل به HRP (Sigma-Aldrich، ایالات متحده) برای تشخیص باندهای ایمونواکتیو و نیز از طریق معرف کمیلومینسانس (Amersham، ایالات متحده) تأیید شد.

۴. نتایج

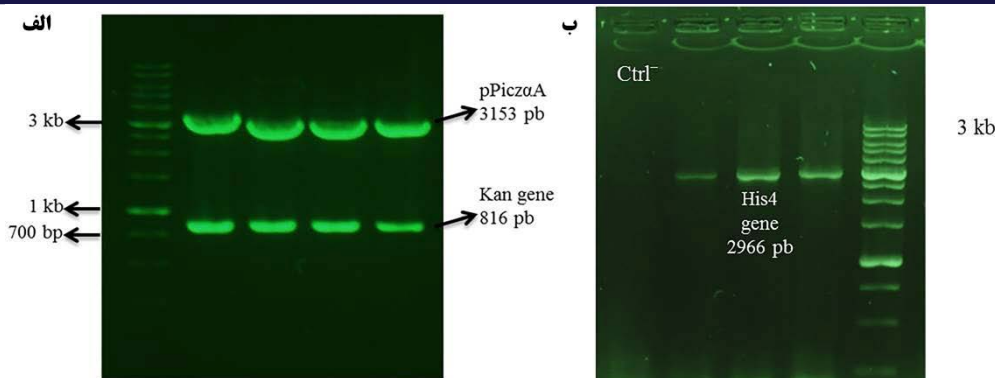
۱.۴. تأیید کاست pPIC-K-H

جهت تأیید کلونینگ، هضم آنزیمی پلاسمیدهای pPIC2α A-KanR با آنزیم‌های NcoI و EcoRV پس از استخراج پلاسمید از کشت شبانه برخی از کلونی‌های مثبت رشد یافته روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام شد. سپس پلاسمید استخراج شده با مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که همانطور که در **تصویر ۲** نشان داده شده است منجر به جدا شدن قطعه‌ای (۸۱۶ جفت بازی) از پلاسمید جدید شد.

۵.۳. بیان GFP در pPIC-H-K

برای بیان GFP تحت کنترل پروموتور AOX1، سلول‌های ترانسفورم شده با پلاسمید pPIC-K-H-GFP در فلاسک‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت BMGY در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس سلول‌های مخمر با استفاده از سانتریفیوژ (۵ دقیقه، گرم ۳۰۰۰، ۴ درجه سانتی‌گراد) جمع‌آوری و به محیط کشت القایی BMMY منتقل شدند تا زمانی که OD600 به عدد ۱ برسد. القا با افزودن مقدار مشخصی (۱ درصد، حجم/حجم) متانول حفظ شد. پس از ۷۲ ساعت القا، مایع رویی کشت و سلول‌ها برای تجزیه و تحلیل جمع‌آوری شدند.

محیط‌های کشت با روش سانتریفیوژ جمع‌آوری و به میزان ۵۰ برابر با استفاده از ستون‌های فیلتراسیون سانتریفیوژی Amicon Ultra-15 (Merck Millipore، آلمان) تغلیظ شدند و در مرحله بعد با روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) مورد تجزیه و تحلیل

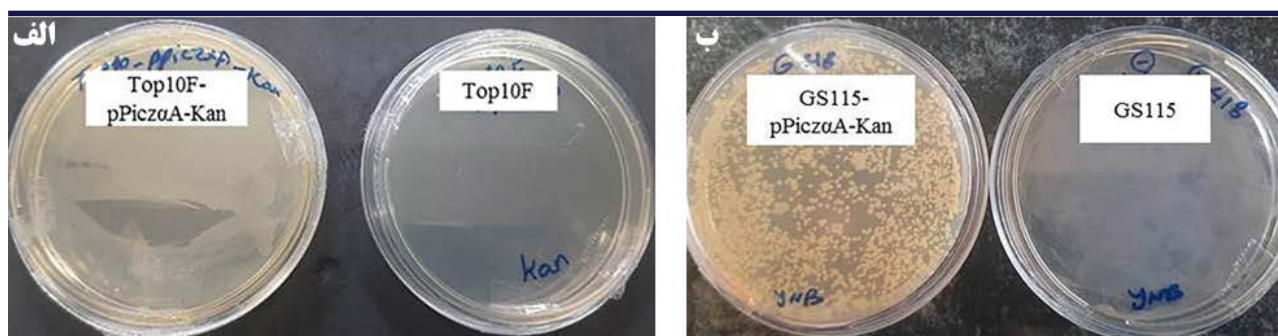


تصویر ۲. تأیید ساخت پلاسمید pPIC-K-H با استفاده از آنالیز برشی و PCR (الف). آنالیز برشی پلاسمید pPICZαA-KanR با استفاده از آنزیم‌های برشی NcoI و EcoRV، قطعه‌ای مربوط به ژن مقاومت به کانامایسین با اندازه ۸۱۶ جفت‌باز را نشان داد. (ب) تأیید ساخت پلاسمید pPIC-K-H با استفاده از Colony PCR؛ با اندازه ۳۱۶۳ جفت‌باز مربوط به کل پلاسمید pPICZαA و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن هیستیدین دهیدروژناز. پس از الکتروفورز، قطعه‌ای به طول ۲۹۶۶ جفت‌باز روی ژل آگارز مشاهده شد که وجود ژن هیستیدین دهیدروژناز را در پلاسمید ساخته شده تأیید کرد.

۲.۴. سنجش عملکردی

مخمر GS115 (تصویر ۳ ب) روی محیط کشت اختصاصی خود بود. سنجش عملکرد ژن هیستیدینول دهیدروژناز با کشت مخمرهای GS115 ترانسفورم شده روی YNB بدون اسید آمینه هیستیدین، همانطور که در تصویر ۴ نشان داده شده است، مورد ارزیابی قرار گرفت و رشد مخمرهای تغییر ژنتیکی یافته با pPICZαA-K-H مشاهده شد.

به‌عنوان اولین گام برای غربالگری عملکردی پلاسمید pPIC-K، هر دو باکتری Top10F و مخمر GS115 توسط این پلاسمید ترانسفورم شدند و سپس به ترتیب روی آنتی‌بیوتیک‌های LB-Kan و YNB-G418 کشت داده شدند. نتایج نشان‌دهنده رشد باکتری Top10F (تصویر ۳ الف) و



تصویر ۳. سنجش عملکرد پلاسمید pPICZαA-KanR در باکتری Top10F و مخمر GS115 (الف). ترانسفورماسیون پلاسمید pPICZαA-KanR در باکتری‌های Top10F و رشد آن‌ها روی محیط کشت LB-agar-Kan نشان داده شده است. عدم رشد در کنترل منفی نیز تأییدکننده اختصاصی بودن رشد کلنی‌ها بود. (ب) کشت پلاسمید pPICZαA-KanR ترانسفورم شده در مخمر GS115 روی محیط YNB نشان داده شده است. عدم رشد در کنترل منفی، صحت ترانسفورماسیون را تأیید کرد.

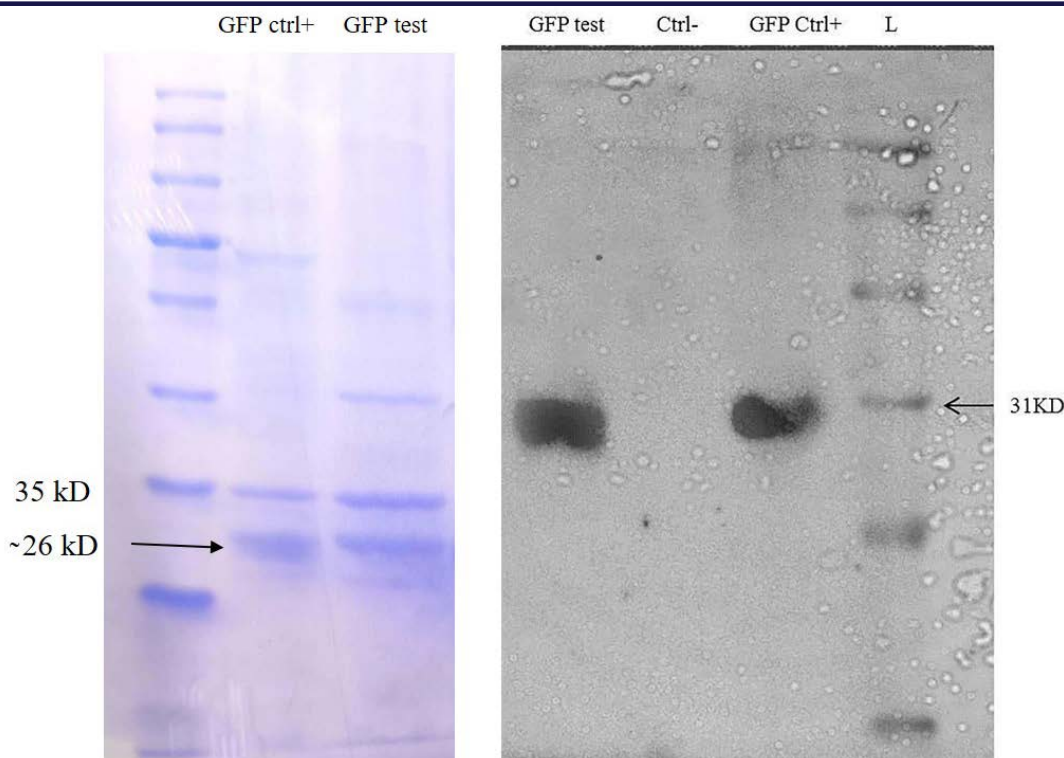


تصویر ۴. سنجش عملکرد پلاسمید pPICZαA-Kan-His در مخمر GS115. رشد مخمرهای GS115 ترانسفورم شده با پلاسمید pPICZαA-Kan-His روی محیط کشت YNB بدون هیستیدین، در کنار کنترل منفی نشان داده شده است. مشاهده رشد در این محیط، عملکرد صحیح پلاسمید ساخته شده را تأیید می‌کند.

۳.۴. تایید بیان ژن توسط کاست جدید

پروتئین فلورسنت سبز (GFP) به‌عنوان یک مدل پروتئینی برای اثبات بیان ژن در کاست جدید (pPICZ-K-H) استفاده شد. پس از کلون کردن ژن GFP در پلاسمید pPICZ-K-H

مخمرهای GS115 توسط پلاسمید pPICZ-K-H-GFP ترانسفورم شدند و ورود این پلاسمید با Colony PCR بررسی شد. ترشح GFP به داخل محیط کشت پس از تغلیظ با آنالیز وسترن بلات تأیید شد (تصویر ۵).



تصویر ۵. آنالیز بیان پروتئین GFP با استفاده از SDS-PAGE و وسترن بلات. در سمت چپ، آنالیز SDS-PAGE از مایع رویی کشت مخمرهای حاوی پلاسمید نوتر کیب pPICZ-K-H-GFP نشان داده شده است. در سمت راست، نتیجه وسترن بلات با استفاده از روش ECL برای تأیید بیان پروتئین GFP در مخمرهای حاوی پلاسمید نوتر کیب نمایش داده شده است.

۵. بحث

می‌تواند در هزینه‌ها صرفه‌جویی کند.

عبدالامامی بند و همکارانش یک ژن مقاومت به آمپی‌سیلین را به‌عنوان یک نشانگر انتخابی باکتریایی ارزان قیمت به وکتور pPICZαA وارد کردند و ژن مقاومت به زئوسین را با یک ژن مقاوم به هیگرومایسین جایگزین کردند تا دو وکتور شاتل مخمر حاوی کاست‌های بیانی COL1A1 و COL1A2 انسانی بسازند (۱۳). در یک مطالعه، ژن HIS6 از پلاسمید pRD643 (۱۴) در یک وکتور بیان مخمر pPICZαA (۱۵) کلون شد و پلاسمید نوتر کیب حاصل به یک سویه مخمر *S. cerevisiae* که فاقد ژن HIS6 درون‌زاد عملکردی بود، وارد شد (۱۶). در مطالعه‌ای نیز نشان داده شده است که آنتی‌بیوتیک G418 مستقیماً به کمپلکس ریبوزومی یوکاریوتی 80S متصل می‌شود (۱۷) و با وجود اینکه کانامایسین از نظر ساختاری شبیه G418 است، به دلیل عدم سمیت برای مخمر، نمی‌توان از آن برای انتخاب در مخمرهای پیکیا پاستوریس استفاده کرد. با این وجود، می‌توان از

در کار اخیر، جایگاه‌های برش XbaI و XhoI به ترتیب با وارد کردن جهش در پرایمرهای معکوس ژن‌های مقاومت به کانامایسین و هیستیدینول‌دهیدروژناز حذف شدند. این جایگاه‌های برش در جایگاه کلونینگ چندگانه ناقل pPICZαA نیز قرار دارند. ما ناقل‌های جدیدی با شاخص‌های هیستیدینول‌دهیدروژناز و مقاومت به کانامایسین (جنتیسین) را شرح دادیم که برای انتخاب مستقیم سویه‌های بیانی GS115 طراحی شده‌اند. ژن مقاومت به کانامایسین قرار داده شده در این پلاسمیدها می‌تواند برای انتخاب در هر دو باکتری و مخمر پیکیا پاستوریس استفاده شود و در مقایسه با وکتور pPIC9، ناقل‌های کلونینگ را ارائه می‌دهد که کوچک‌تر و دستکاری آن‌ها آسان‌تر است. علاوه بر این، از آنجایی که آنتی‌بیوتیک جنتیسین در مقایسه با زئوسین بسیار کم‌هزینه‌تر است، استفاده از این وکتورهای جدید

بازیابی داده‌ها:

مجموعه داده ارائه شده در این مطالعه، در زمان ارسال مقاله یا پس از انتشار، بنا به درخواست از نویسنده مسئول قابل دریافت است.

References

1. Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, Gingeras TR. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(9):3859-76. [PubMed ID:3108861]. [PubMed Central ID:PMC340787]. <https://doi.org/10.1093/nar/15.9.3859>.
2. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45-66. [PubMed ID:10640598]. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.
3. Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 1989;9(3):1316-23. [PubMed ID:2657390]. [PubMed Central ID:PMC362724]. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1316-1323.1989>.
4. Baron M, Reynes JP, Stassi D, Tiraby G. A selectable bifunctional beta-galactosidase::phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene.* 1992;114(2):239-43. [PubMed ID:1601306]. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90581-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90581-9).
5. Drocourt D, Calmels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(13):4009. [PubMed ID:1695734]. [PubMed Central ID:PMC331125]. <https://doi.org/10.1093/nar/18.13.4009>.
6. Behvandi E, Bagherpour G, Nedaei K, Kaboli S, Johari B. [Expression of Receptor Binding Domain (RBD) from Coronavirus Spike Protein Fused to Carboxylic Terminal of Clostridium perfringens Enterotoxin (c-CPE) in *Pichia pastoris*]. *Koomesh.* 2024;26(2):e149316. Persian. <https://doi.org/10.69107/koomesh-149316>.
7. Mohammadgholizad F, Hashemi A. Construction of recombinant *Pichia pastoris* expressing single-chain antibody fragment against extracellular domain of EpCAM. *Koomesh.* 2019;21(4):743-50. Persian.
8. Chen J, Stubbe J. Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(2):102-12. [PubMed ID:15685195]. <https://doi.org/10.1038/nrc1547>.
9. Lanza AM, Kim DS, Alper HS. Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells. *Biotechnol J.* 2013;8(7):811-21. [PubMed ID:23450727]. <https://doi.org/10.1002/biot.201200364>.
10. Oliva-Trastoy M, Defais M, Larminat F. Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the Sh ble gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis.* 2005;20(2):111-4. [PubMed

کانامایسین برای انتخاب باکتری‌هایی کلای ترانسفورم‌شده در مراحل اولیه ساخت این ناقل‌ها استفاده کرد (۱۸). از سوی دیگر، مقامات بهداشتی به‌درستی تشخیص داده‌اند که وجود ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک در اسکلت پلاسمید، یک اتفاق نامطلوب است. نگرانی اصلی، احتمال انتقال افقی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به جمعیت میکروبی در گردش است (۱۹). برای توسعه میزبان‌های بیان بدون نشانگر یا تولید ناقل‌های انتقال ژن ایمن‌تر، سیستم‌های انتخاب بدون آنتی‌بیوتیک و مکانیسم‌های مبتنی به پلاسمید توسعه یافته‌اند. یکی از این سیستم‌ها، مکمل‌سازی یک نشانگر اکسوتروفیک است که از یک سویه پیکیا پاستوریس جهش‌یافته در مسیر سنتز هیستیدینول دهیدروژناز استفاده می‌کند (۲۰). بنابراین قرار دادن یک تکمیل‌کننده رشد اکسوتروفی می‌تواند راهی مناسب برای بیان ژن مورد نظر در سویه‌هایی باشد که اکسوتروف شده‌اند. این میزبان‌ها تنها زمانی توان رشد را خواهند داشت که پلاسمید انتقالی حامل ژن اکسوتروفی باشد. از این نظر آلودگی محیطی با میزبان اکسوتروف نیز به حداقل خود می‌رسد که نشانگر ارجح بودن استفاده از این نوع سیستم اکسوتروفی است. نتیجه کلی در این مطالعه نشان داد که می‌توان پلاسمیدهایی را طراحی کرد که هم از طریق انتخاب‌های مختلف مانند مقاومت به آنتی‌بیوتیک و نیز اکسوتروفی داری عملکرد مناسب در بیان پروتئین بوده و بدین ترتیب به کاهش هزینه‌ها و کاهش آلودگی محیطی ناشی از میزبان‌ها کمک کند.

مشارکت نویسندگان:

س.ح. و ا.ب.: جمع‌آوری داده‌ها، نگارش نسخه اول مقاله؛ ق.ب.: مسئول ایده و طراحی، جمع‌آوری داده‌ها، نگارش نسخه اول مقاله، آنالیز و تفسیر نتایج و آماده نمودن مقاله جهت ارسال به مجله. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

تضاد منافع:

نویسندگان اظهار داشتند که فاقد هر گونه تضاد منافع هستند.

کد اخلاق:

IR.ZUMS.REC.1400.409

حمایت مالی/معنوی:

این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی زنجان حمایت مالی شده است.

- ID:15755800]. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei016>.
11. Hagen L, Sharma A, Aas PA, Slupphaug G. Off-target responses in the HeLa proteome subsequent to transient plasmid-mediated transfection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins Proteomics*. 2015;**1854**(1):84-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.016>.
 12. Li Cc, Hu R, Hua Xm, Ni Yx, Ge L, Zhang L, et al. Construction and functional verification of size-reduced plasmids based on TMP resistance gene dfrB10. *Microbiol Spectr*. 2023;**11**(6):e0120623. [PubMed ID:37905802]. [PubMed Central ID:PMC10714783]. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01206-23>.
 13. Abdemami B, Shokrgozar MA, Shahreza HK, Ghavami M. Design and construction of two yeast shuttle vectors containing human procollagen genes expression cassette for expression in yeast. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011;**3**(1):11.
 14. Fani R, Tamburini E, Mori E, Lazcano A, Lio P, Barberio C, et al. Paralogous histidine biosynthetic genes: evolutionary analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* HIS6 and HIS7 genes. *Gene*. 1997;**197**(1-2):9-17. [PubMed ID:9332345]. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00146-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00146-7).
 15. Gietz RD, Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*. 1988;**74**(2):527-34. [PubMed ID:3073106]. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90185-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90185-0).
 16. Imadartika. The Use of HIS6 Gene as a Selectable Marker for Yeast Vector. *HAYATI J Biosciences*. 2009;**16**(1):40-2. <https://doi.org/10.4308/hjb.16.1.40>.
 17. Bar-Nun S, Shneyour Y, Beckmann JS. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure Expression*. 1983;**741**(1):123-7. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(83\)90018-0](https://doi.org/10.1016/0167-4781(83)90018-0).
 18. Lin-Cereghino J, Hashimoto MD, Moy A, Castelo J, Orazem CC, Kuo P, et al. Direct selection of *Pichia pastoris* expression strains using new G418 resistance vectors. *Yeast*. 2008;**25**(4):293-9. [PubMed ID:18327886]. [PubMed Central ID:PMC2504081]. <https://doi.org/10.1002/yea.1587>.
 19. Mignon C, Sodoyer R, Werle B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens*. 2015;**4**(2):157-81. [PubMed ID:25854922]. [PubMed Central ID:PMC4493468]. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020157>.
 20. Raiford DW, Heizer EM, Jr., Miller RV, Doom TE, Raymer ML, Krane DE. Metabolic and translational efficiency in microbial organisms. *J Mol Evol*. 2012;**74**(3-4):206-16. [PubMed ID:22538926]. <https://doi.org/10.1007/s00239-012-9500-9>.

Research Article

Engineering the pPICZ α A Vector for Optimized Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*: Substitution of Antibiotic Resistance and Auxotrophic Selection Markers

Salimeh Hassani ^{1#}, Elham Behvandi ^{2#}, Ghasem Bagherpour ^{3,*}

¹Student research committee of zanjan university of medical sciences, Zanjan, Iran.

²Department of Medical Biotechnology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

³Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Salimeh Hassani and Elham Behvandi contributed equally to this work.

*Corresponding Author: Department of Medical Biotechnology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran. Email: bagherpour.4631@gmail.com

Received 18/01/2025; Accepted 06/04/2025

Abstract

Background: Plasmids play a crucial role in biotechnology by facilitating the transfer and manipulation of heterologous DNA in host cells for the production of recombinant proteins. The pPICZ α A plasmid, featuring the AOX1 promoter, is regarded as one of the best expression vectors in *Pichia pastoris* strains. However, the product of the zeocin antibiotic resistance gene (BleR) can be toxic to the host during stable growth, and the high cost of this antibiotic presents a significant barrier to the use of this plasmid.

Objectives: This study aims to clone the kanamycin resistance gene (KanR) and the histidinol dehydrogenase gene (HIS4) to facilitate the selection of clones in transformed bacteria using the KanR gene and in histidine auxotrophic yeasts, while also reducing costs by eliminating the need for zeocin.

Methods: PCR and cloning steps were performed for each of the target genes in the pPICZ α A plasmid. Subsequently, the GFP gene was cloned as a control to test the functionality of the KanR resistance gene in bacteria within the pPICZ α A plasmid. Functional testing of the his4 gene in the histidine auxotrophic *Pichia pastoris* GS115 was conducted after cloning the target gene in YNB medium, both with and without histidine amino acid.

Results: The PCR and cloning steps for both target genes in the pPICZ α A plasmid were successfully completed, demonstrating positive antibiotic resistance to KanR and growth in a medium lacking histidine amino acids. The expression of the GFP gene was confirmed through Western blotting.

Conclusion: The modified pPICZ α A plasmid enabled selection in bacteria using the kanamycin resistance gene and in histidine auxotrophic yeast *Pichia pastoris* using the histidinol dehydrogenase gene (HIS4). This approach can significantly reduce cloning and expression costs in yeast.

Keywords: *Pichia*, Recombinant Protein, Gene Expression, Plasmid.