A New Generation of Cold-shock Vector Derived from pCold I (pCold I-LZ) for Expression of Recombinant Peptides and Proteins

Original Article

Hamid Latifi Navid[1], Saeid Latifi-Navid[2] , Saber Zahri[2]

[1] Researcher, Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2] Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

ABSTRACT

Background:
Finding shows that there were several problems in the treatment of *Helicobacter pylori* infection such as the emergence of resistance to the antibiotics, the risk of recrudescence, and the high cost of treatment. The ineffectiveness of conventional treatment mechanisms against cancer cells reveals the importance of peptides as a novel therapeutic approach. However, the short length of peptides was a restriction factor to realise this approach. As a result, one or more amino acid residues were added during the cloning process that leads to the loss of the original peptide folding. The aim of study was to change the structure of the pCold I vector using site-directed mutagenesis in order to do the directional cloning of each target gene and express/purify the small peptides and native proteins without any additional N-terminus amino acids. .

Materials and Methods:
Site-directed mutagenesis was performed by plasmid amplification in two individual PCR reactions. Two PCR products were mixed and denatured to separate the nascent strands of plasmid DNA from the parental ones. Slow cooling conditions were used to allow reannealing of PCR products. The products were digested with DpnI that digests methylated parental strands, and then transformed into *E.coli* DH5α. The mutant plasmid was identified by digestion with NdeI and PceI and sequencing.

Results:
The mutant plasmids were not digested by NdeI. The presence of mutation was also confirmed by sequencing. In mutant vector the cut sites of both the first restriction enzyme at the multiple cloning site (at the nucleotide level) and factor Xa (at the amino acid level) became the same.

Conclusion:
The modified vector can be widely used for a fast and more convenient cloning and expression of the native proteins and short peptides, including anti-*H.pylori* peptides and anti-angiogenesis, gastric anti-CSCs and anti-metastatic peptides.

Keywords: Cold-shock vector; small peptides; recombinant expression; site-directed mutagenesis

please cite this paper as:
Latifi Navid H, Latifi-Navid S , Zahri S. A New Generation of Cold-shock Vector Derived from pCold I (pCold I-LZ) for Expression of Recombinant Peptides and Proteins. *Govaresh* 2015;20:168-77.

Corresponding author:
Saeid Latifi Navid, Ph.D
Division of Cellular and Molecular Biology, Department of Biology,
University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.Post code: 56199-11367
Telefax: + 98 45 33514701
E-mail: slatifin@yahoo.com
Received: 06 May 2015
Edited: 06 Aug. 2015
Accepted: 07 Aug. 2015

مقاله پژوهشی

نسل جدید وکتور شوک سرمایی مشتق از pCold I (pCold I–LZ) برای بیان پپتیدها و پروتیین های نوترکیب

حمید لطیفی نوید[۱]، سعید لطیفی نوید[۲]، صابر زهری[۲]

[۱] پژوهشگر، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲] گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

زمینه و هدف:
روش های درمانی متداول بر علیه میکروارگانیسم های بیماری زا دارای چندین مشکل از جمله تظاهر مقاومت به آنتی‌بیوتیک ها، خطر بازگشت عفونت و هزینه بالا می باشند. از طرف دیگر ناکارآمدی مکانیسم های درمانی مرسوم بر علیه سلول های سرطانی، ضرورت به کارگیری پپتیدها را به عنوان راهکار نوین درمانی بیش از پیش آشکار می سازد. با این وجود؛ طول کوتاه آن ها، یک عامل محدودکننده در راستای بیان نوترکیب آن ها می باشد . دلیل این امر اضافه شدن یک یا چند آمینواسید به طول پپتید بیانی یا تغییر قالب خواندن باز می باشد. هدف از این مطالعه، تغییر ساختمان وکتور pCold I با استفاده از روش جهش-زایی مختص جایگاه به منظور کلون سازی جهت دار هر ژن هدف و بیان و خالص سازی پپتیدهای کوچک و پروتیین های بکر-دست نخورده- می‌باشد.

روش بررسی:
جهش‌زایی مختص جایگاه با تکثیر پلاسمید در دو واکنش PCR مجزا انجام شد. در واکنش ۱ تنها پرایمر رفتی و در واکنش ۲ تنها پرایمر برگشتی وجود داشت. دو محصول PCR مخلوط شدند. به منظور تفکیک زنجیره DNA تازه سنتز شده از DNA پلاسمیدی الگو، شرایط برای واسرشتگی آن ها فراهم شد. با کاهش تدریجی دما، اتصال مجدد رشته‌های مکمل امکان پذیر شد. با استفاده از آنزیم DpnI رشته های والدی متیله شده هضم شدند. سپس ترانسفورم پلاسمیدها به باکتری Ecoli DH5aX انجام شد و پلاسمیدهای جهش یافته با برش با آنزیم‌های محدودگر NdeI و PceI و تعیین توالی تایید شدند.

یافته‌ها:
آنزیم NdeI قادر به برش پلاسمید های جهش یافته نبود. تعیین توالی نیز وجود جهش در جایگاه خاص را تایید کرد. در وکتور جهش یافته، جایگاه برشی جدید نخستین آنزیم محدودگر که در سطح نوکلئوتیدی برش صاف ایجاد می کرد با جایگاه عملکردی فاکتور Xa در سطح آمینواسیدی یکسان شد.

نتیجه گیری:
این وکتور می تواند برای کلون سازی سریع و بیان اختصاصی انواع پپتیدهای کوتاه دست نخورده از جمله پپتیدهای ضد باکتریایی، پپتیدهای ضد سلول های بنیادی سرطانی و ضد متاستاز و نیز بیان پروتیین‌های دست نخورده استفاده شود.

کلید واژه: وکتور شوک سرمایی، پپتید های کوچک، بیان نوترکیب، جهش زایی مختص جایگاه

گوارش/ دوره ۲۰، شماره ۳/ پاییز ۱۳۹۴/ ۱۷۷-۱۶۹

زمینه و هدف:

یکی از عواملی که در سیستم ایمنی غیراختصاصی مشارکت نموده و مکانیسم دفاعی اصلی برای اکثر ارگانیسم های زنده در طی مراحل اولیه ی عفونت محسوب می گردند، پپتیدهای ضدمیکروبی می باشد.(۳-۱) این پپتیدها از انواع مختلفی از موجودات زنده جداسازی شده اند و دامنه عملکردی آن ها، طیف وسیعی از موجودات نظیر باکتری، قارچ، ویروس و حتی سلول‌های سرطانی را شامل می‌شود.(۲, ۴, ۵) طول این پپتیدها معمولاً کمتر از ۵۰ آمینواسید بوده و به طور تقریبی نیمی از این آمینواسیدهای تشکیل دهنده از نوع هیدروفوب می‌باشند. پپتیدهای ضدمیکروبی به دلیل داشتن اسیدآمینه های بازی زیاد، دارای بار مثبت می‌باشند. این پپتیدها اساساً غشاهای میکروبی را مورد هدف قرار می دهند که مانع از توانایی میکروب ها به منظور توسعه مقاوت نسبت به آن ها می گردد. در نتیجه این پپتیدها به نظر

نویسنده مسئول: سعید لطیفی نوید
اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی، گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، کد پستی: ۱۱۳۶۷-۵۶۱۹۹، صندوق پستی: ۱۷۹
تلفن و نمابر: ۳۳۵۱۴۷۰۱-۰۴۵
پست الکترونیک: slatifin@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۶
تاریخ اصلاح نهایی: ۹۴/۵/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۶

می رسد کاندیدای مناسبی برای آنتی‌بیوتیک های جدید محسوب شوند.(۶) با این وجود، نشان داده شده است که فرایند تأثیرگذاری بر روی نفوذپذیری غشا، تنها راه از بین بردن عوامل میکروبی نبوده و مشاهداتی مبتنی بر توانایی مهار سنتز اسیدهای نوکلئیک، پروتیین و اجزای دیواره سلولی، در صورت انتقال پپتید به داخل سلول هدف وجود دارد. بعلاوه این پپتیدها قادر به مهار فعالیت های آنزیمی ضروری نیز می‌باشند.(۷)

علاوه بر فعالیت علیه میکروارگانیسم ها، پپتیدهای ضدمیکروبی قادر به میانجی‌گری سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی از طریق القای بیان، تغییر یا تولید سیتوکاین ها و کموکاین های پیش‌التهابی، کموتاکسی، آپوپتوز و رونویسی ژنی می‌باشند. این تأثیرات ممکن است در نتیجه مهار پاسخ های التهابی، تحریک تکثیر و فراخوانی ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل ها و لنفوسیت های T صورت گیرد.(۴, ۶, ۸) اگرچه پپتیدهای ضدمیکروبی بخشی از مکانیسم دفاعی سیستم ایمنی ذاتی بسیاری از ارگانیسم ها و جایگزین های بالقوه ای برای مقابله با بیماری های عفونی محسوب می شوند، استفاده از آن ها تحت عنوان پپتید های ضد سرطانی در درمان سرطان (به تنهایی یا در ترکیب با سایر داروهای متداول)، استراتژی درمانی جدیدی محسوب می شود که نیازمند تحقیق و بررسی می باشد. تمامی این فعالیت های توصیف‌شده، پپتیدهای ضدمیکروبی را به عنوان ابزاری جالب در راستای کشف دارو و توسعه آن مطرح می‌سازد.(۹ و ۱۰)

تعدادی از رویکردهای بنیادین نظیر مکانیسم‌های عملکردی، کارآیی و ایمنی آن‌ها می‌بایست قبل از ورود به فازهای بالینی مورد بررسی قرار گیرند. پاسخ به این پرسش ها نیازمند مطالعه های گسترده ساختاری و عملکردی آن ها می‌باشد. پیشرفت این مطالعه‌ها به طور نسبی بستگی به میزان در دسترس بودن پپتیدهای خالص دارد. علاوه بر این، میزان در دسترس بودن پپتید یکی از فاکتورهای اصلی و تعیین کننده استفاده از آن ها به صورت گسترده تحت عنوان آنتی‌بیوتیک می‌باشد. بنابراین هر دو مورد تحقیقات پایه ای و کاربردهای بالینی نیازمند پپتیدهایی با درجه کیفی بالا و تولید شده از طریق یک روش سودمند به لحاظ اقتصادی می باشد. به طور کلی فرایند جداسازی از طریق منابع طبیعی یک فرایند سخت، طاقت فرسا و طولانی بوده و بنابراین روشی کارآمد برای به دست آوردن پپتید در مقیاس وسیع محسوب نمی شود بعلاوه این روش امکان طراحی پپتید های جدید را با تغییر در توالی فراهم نمی‌سازد. از طرف دیگر سنتز پپتید از طریق شیمیایی علی رغم کارآمدی بسیار بالا، یک فرایند پیچیده و پرهزینه‌ای می‌باشد.(۱۱) بنابراین این روش نیز برای تولید پپتید در مقیاس وسیع مناسب نمی باشد. خوشبختانه فناوری DNA نوترکیب یک روشی سودمند برای تولید پروتیین می باشد در واقع پیشرفت های وسیع و گسترده در فناوری DNA نوترکیب، موقعیت را برای تولید پپتیدهای ضدمیکروبی در مقادیر وسیع فراهم می سازد. این فناوری، فرایند کلون‌سازی ژن‌های خارجی(بیگانه) را در وکتورهای اختصاصی به منظور بیان در سلول های میزبانی پروکاریوتی و یا یوکاریوتی امکان پذیر می سازد. فناوری DNA نوترکیب نسبت به دو روش دیگر از نظر مدت زمان مصرفی کوتاه تر بوده و به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می باشد.(۱۲و۱۳)

در مطالعات مهندسی ژنتیک از وکتورهای بیانی مختلف استفاده می کنند از جمله این وکتورها که در سال های اخیر استفاده از آن بسیار افزایش یافته است وکتور pCold می‌باشد. وکتوری که در این تحقیق به منظور ایجاد سازه اختصاصی برای بیان تمام پپتید های درمانی بدون هیچگونه اسید آمینه اضافی مورد استفاده قرار می‌گیرد، وکتور pCold I می‌باشد چرا که دارای عناصر لازم برای بیان مناسب، کنترل و خالص سازی پپتید مورد نظر می باشد. به دلیل طول کوتاه پپتیدهای ضدمیکروبی، ورود هرگونه آمینواسید اضافی در ساختار آن ها منجر به از دست رفتن فولدینگ مناسب و در نتیجه کاهش میزان عملکرد می‌گردد. بنابراین روش های کلون سازی متداول در بیان پپتیدهای ضدمیکروبی از کارآیی بالایی برخوردار نیست. دلیل این امر اضافه شدن یک یا چند آمینواسید به طول پپتید بیان شده می باشد که در اثر مشکلات ناشی از فرایند کلون سازی قطعه DNA به علت محدودیت های جایگاه برشی ایجاد می شود. از اینرو فولدینگ اصلی پپتید تغییر کرده و تأثیر بسزایی در کاهش میزان عملکرد آن می‌گذارد. از طرف دیگر زمانی که نیاز به تولید پروتیین های نوترکیب بکر (دست نخورده) با توالی آمینواسیدی اصلی بدون آمینواسید اضافی است وکتور های متداول از کارایی پایین برخوردار می‌باشند. در نتیجه نیازمند طراحی استراتژی‌های جدید به منظور ایجاد سازه‌ای می باشیم که تنها توالی مورد نظر را بیان نماید.

در این تحقیق از روش جهش زایی مختص جایگاه استفاده نمودیم. یکی از روش‌هایی که در مهندسی پروتیین به منظور تولید توالی‌های DNA دارای کدون های جهش‌یافته، دخول و یا حذف شدگی به کار می رود، فرایند جهش‌زایی مختص جایگاه می‌باشد. رخداد جهش در این فرایند از طریق یک واکنش PCR با پرایمرهای محتوی نوکلئوتیدهای ناجور در ناحیه میانی آن‌ها صورت می گیرد. در این روش اتصال پرایمر-پرایمر ممکن است از کلون‌سازی cDNA جهش‌یافته ممانعت به عمل آورد. به منظور جلوگیری از این مشکل، در این تحقیق روش جایگزینی را استفاده نمودیم که در آن هر کدام از دو پرایمر، در یک واکنش PCR جداگانه و به صورت مجزا از یکدیگر به کار گرفته شدند.

هدف از این مطالعه، تغییر ساختمان وکتور pCold I با استفاده از روش جهش زایی مختص جایگاه به منظور کلون سازی جهت دار هر ژن هدف و بیان و خالص سازی پپتیدهای کوچک و پروتیین های بکر -دست نخورده- (دارای توالی آمینواسیدی اصلی بدون هیچ گونه آمینواسید اضافی در انتهای آمینی) می‌باشد.

روش بررسی:

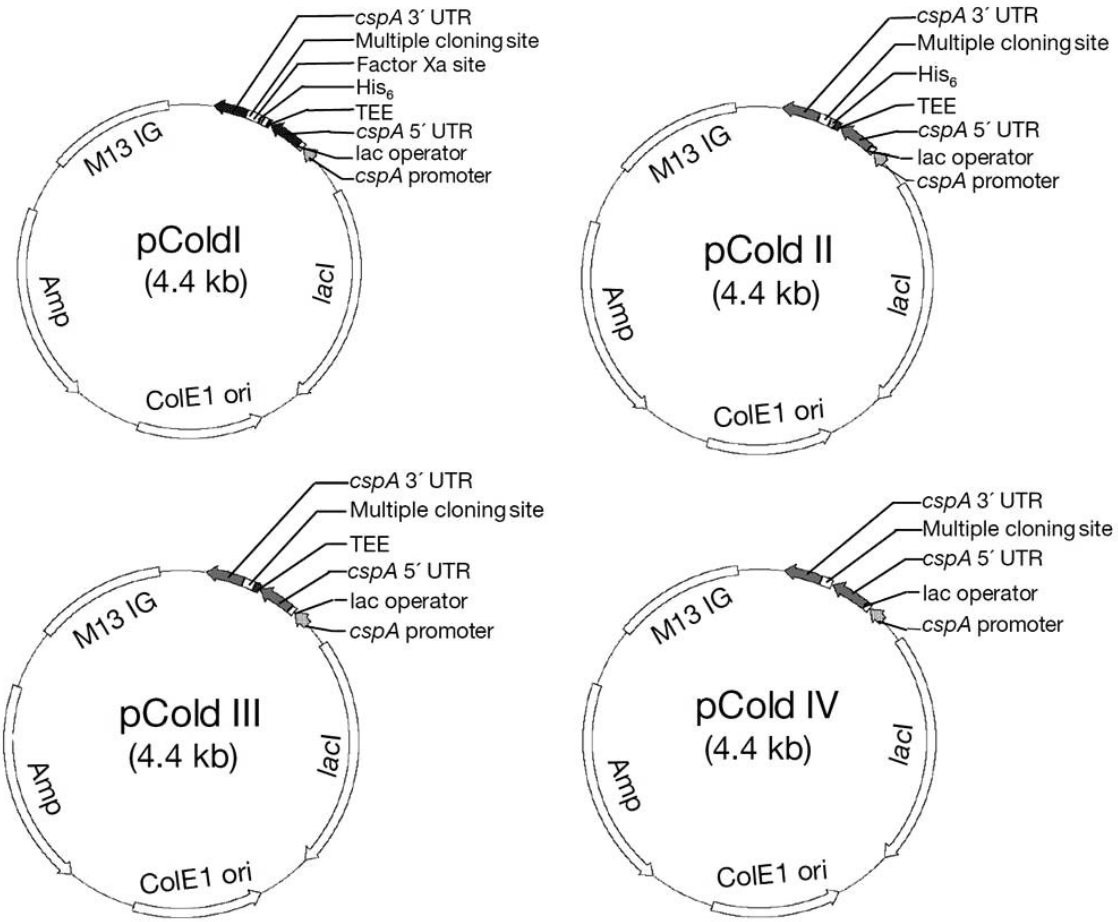
ویژگی های وکتور pCold

وکتورهای بیانی تحت شوک سرما، pCold، در درجه حرارت پایین، قادر به بیان حداکثری پروتیین های نوترکیب به صورت محلول می باشند. به منظور بیان کارآمد و موثر، این وکتورها به‌گونه‌ای طراحی شده‌اند که

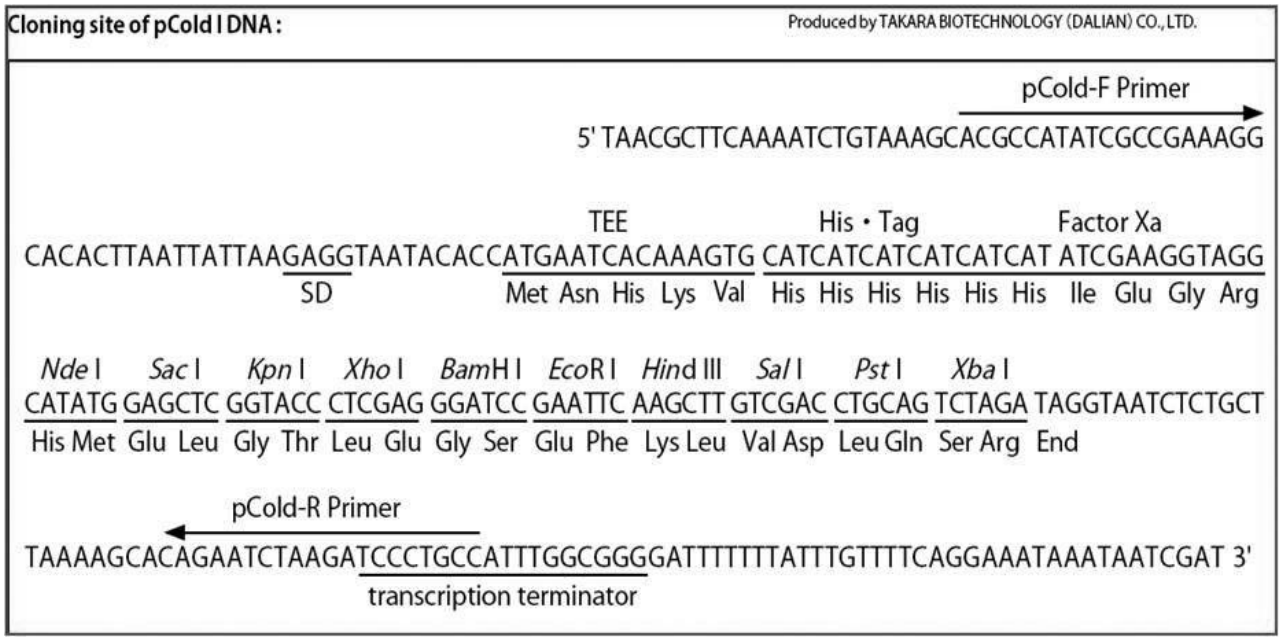
از یک پروموتر مشـتق شـده از ژن CSPA (یکی از ژن‌های تحت شـوک سرمایی) اسـتفاده می نمایند. در پایین دست پروموتر cspA، اپراتور lac قرار دارد که باعث می‌شـود بیان به طور دقیق و کنترل شده صورت گیرد. عـلاوه بر آن ها، ناحیه ۵' غیر ترجمه‌شـونده یا 5 'UTR عناصر افزاینده ترجمه(TEE)، توالیHis_tag ، جایگاه برشی فاکتور Xa و جایگاه کلون سـازی چندگانه وجود دارد که در پایین دست پروموتر cspA قرار گرفته اند. به دلیل اینکه این وکتور، پروموتر مشـتق شده از E.coli را به کار می گیرد، بسـیاری از رده‌های E.coli می‌توانند به عنوان میزبان بیانی به کار گرفته شوند. آرایش ۴ نوع وکتور pCold بسیار متنوع می‌باشد و در حضور یـا عدم حضور TEE، توالـی His tag و جایگاه بـرش فاکتور Xa با هم تفاوت دارند. نوع یک pCold دارای هر ۳ مورد می باشد(شکل ۱).

طراحی اسـتراتژی تغییـر وکتور با تحلیل سـاختاری و عملکردی وکتور pCold نوع ۱

در سـاختار وکتور ۲ بخش به نام فاکتور Xa و His_tag وجود دارد. وجود His_tag که از ۶ اسیدآمینه هیستیدین تشکیل شده است منجر به جداسازی پپتید مذکور از بقیه عوامل در یک ستون کروماتوگرافی می شود که دیواره آن آغشته به نیکل می باشد. بعد از اینکه پپتید متصل به His_tag از بقیه جدا شـد، نیازمند جداسازی پپتید ازHis_tag نیز می‌باشیم چرا که هدف تنها خالص‌سـازی پپتید می باشـد. این فرایند توسط فاکتور Xa صـورت می گیرد به عبارت دیگر این فاکتـور بعد از His_tag و قبل از MCS قرار گرفته اسـت. جایگاه برش ترجیحی فاکتور Xa، توالی Ile Glu Gly Arg اسـت و این فاکتور درسـت بعد از Arg را مورد برش قرار می‌دهد. در سـطح نوکلئوتیدی، اگر بعد از برش جایگاه MCS (صرف نظر از صاف یا چسبنده بودن آن)، یک یا دو نوکلئوتید به ابتدای توالی کدکننده پپتید اضافه شـود، احتمال آن وجود دارد که ترتیب خوانده شدن توالی به هـم بریزد. اگر هم جایگاه برش به گونه ای انتخاب شـود که ۳ نوکلئوتید یا مضربی از آن به ابتدای پپتید اضافه شـود در نتیجه یک اسـیدآمینه یا



شکل ۱: آرایش ۴ نوع وکتور pCold. این وکتورها به لحاظ حضور یا عدم حضور TEE، توالی His tag و جایگاه برش فاکتور Xa با هم تفاوت دارند. نوع یک pCold همه عناصر را دارد.

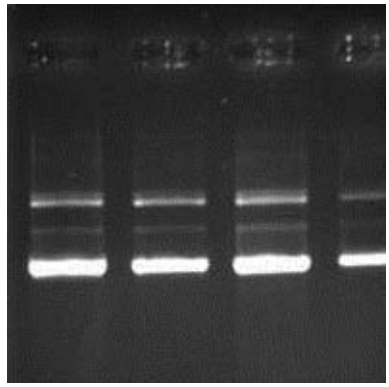


شکل ۲: نقشه وکتور pCold I. توالیHis_tag ، جایگاه برشی فاکتور Xa و جایگاه کلون سازی چندگانه که در پایین دست پروموتر cspA واقع شده اند در نقشه نشان داده شده است.

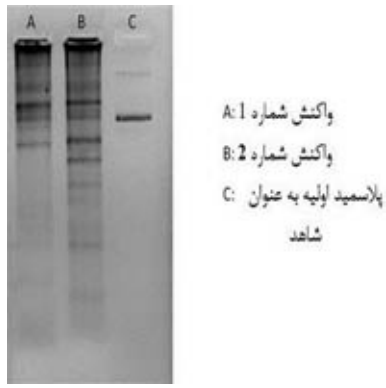
بیشتر به ساختار پپتید اضافه می شود. این فرایند منجر به تغییر فولدینگ و عملکرد آن می شود. برای حل این مشکل جایگاه برشی آنزیم محدودگر به گونه ای طراحی شد که همانند فاکتور Xa منتها در سطح نوکلئوتیدی درست بعد از توالیAGG که متعلق به اسیدآمینه آرژینین می‌باشد را برش دهد(شکل ۲). در وکتور تغییر یافته، جایگاه برشی جدید نخستین آنزیم محدودگر که در ناحیه MCS در سطح نوکلئوتیدی برش صاف ایجاد می کند با جایگاه عملکردی فاکتور Xa در سطح آمینواسیدی یکسان شد. با این راهکار، مشکل اسیدآمینه اضافی در ابتدای پپتید برطرف شده و توالی پپتید مورد نظر درست بعد از جایگاه اثر فاکتور Xa قرار گرفت. از طرفی در زمان بیان پپتید باید یک کدون پایان درست بعد از توالی پپتید مورد نظر قرار گیرد تا بدین طریق مشکل انتها نیز برطرف گردد.

جهش زایی مختص جایگاه

استخراج پلاسمید pCold I از باکتری اشریشیاکلی DH5α با استفاده از کیت استخراج پلاسمید با درجه‌ی خلوص بالا (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) صورت گرفت (شکل ۳). برای انجام فرایند جهش‌زایی مختص جایگاه، جفت پرایمرهای SDM-F1، `5-CATATCGAAGGTAGGCCTATGGAGCTCGGTACC-3` و SDM-R1، `5-GGTACCGAGCTCCATAGGCCTACCTTCGATATG-3` با استفاده از نرم افزار الیگو (Oligo Primer Analysis Software v. 7) طراحی شدند. توالی های پرایمرها مکمل یکدیگر بودند. طول توالی تغییرنیافته در دو سمت ناحیه مورد نظر (دارای جهش)، ۱۶ نوکلئوتید بود. باز تغییریافته در بخش مرکزی هر دو پرایمر قرار گرفته بود. آغاز و خاتمه پرایمر حداقل در یک G یا C بود. محتوای GC پرایمر طراحی شده ۵۴/۵٪ درصد بود. دو باز C و G مشخص شده در توالی پرایمر، موارد تغییریافته جهت القای تغییرات مورد نظر در توالی اولیه وکتور بودند. مرحله بعد، انجام واکنش PCR با یک پرایمر منفرد به منظور تحقق فرایند جهش زایی مختص جایگاه می باشد. تکثیر پلاسمید اصلی در دو واکنش PCR مجزا انجام شد. در واکنش اول تنها پرایمر رفتی (forward) و در واکنش دوم تنها پرایمر برگشتی (reverse) وجود داشت. اجزای واکنش PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۳ میکرولیتر DNA پلاسمیدی الگو، ۵ میکرولیتر پرایمر ۱۰ پیکومولار، ۴ میکرولیتر MgCl۲، ۴ میکرولیتر dNTPS، ۵/۰ میکرولیتر Pfu پلیمراز و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه بود (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر). برنامه PCR تعریف شده برای دستگاه ترموسایکلر شامل ۲ دقیقه در ۹۴°C و ۳۰ چرخه: ۴۰ ثانیه در ۹۴°C، ۴۰ ثانیه در ۵۵°C و ۵ دقیقه در ۶۸°C و در آخر ۱ ساعت در ۶۸°C بود. در این مرحله دو محصول PCR ایجاد شده با تک-پرایمر رفتی یا برگشتی (شکل ۴) با یکدیگر و در یک میکروتیوب مخلوط شدند. به منظور تفکیک رشته DNA تازه سنتزشده از رشته DNA پلاسمیدی الگو، شرایط برای واسرشتگی آن ها فراهم شد. با کاهش تدریجی دما، اتصال مجدد رشته‌های مکمل امکان پذیر شد. شیب دمایی استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است. به منظور جداسازی پلاسمیدهای جهش یافته از پلاسمید اولیه موجود در محیط، از آنزیم DpnI استفاده شد. این آنزیم توانایی برش پلاسمیدهای متیله غیرجهش‌یافته را داشت. پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری



شکل ۳: وکتور pCold I در ژل آگارز ۱٪



شکل ۴: محصولات PCR حاصل از تکثیر پلاسمید با پرایمر رفتی (واکنش ۱) یا برگشتی (واکنش ۲). به دلیل این که واکنش PCR با یک پرایمر صورت می گیرد، به هنگام بارگذاری آن بر روی ژل الکتروفورز، به خاطر کنفورماسیون های مختلف DNA پلاسمیدی تک رشته ای، باند های متعدد در جایگاه¬های مختلف بر روی ژل آگارز ۱٪ ایجاد می شود.

متیله بوده اما محصولاتی که از واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده ایجاد می شوند، فاقد گروه متیل می باشند. در نتیجه این امر منجر به عملکرد اختصاصی آنزیم مذکور گردید. در مرحله آخر، ترانسفورم پلاسمیدها به سلول های مستعد باکتری E.coli از نوع DH5α انجام شد (شکل ۵) و پس از انتقال آن به محیط کشت جامد SOB (Super Optimal Broth; Merck, Frankfurt, Germany)، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند. از کلنی‌های رشد کرده ۵ مورد به طور تصادفی و جهت بررسی های بیشتر انتخاب گردید. هر کدام از آن ها در یک محیط مایع لوریا برتانی (Luria Bertani Broth; Merck, Frankfurt, Germany) حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد و پلاسمید آن ها استخراج گردید.

جدول ۱: شیب دمایی

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان(دقیقه)
۱	۹۵	۵
۲	۹۰	۱
۳	۸۰	۱
۴	۷۰	۰/۵
۵	۶۰	۰/۵
۶	۵۰	۰/۵
۷	۴۰	۰/۵
۸	۳۷	Holding

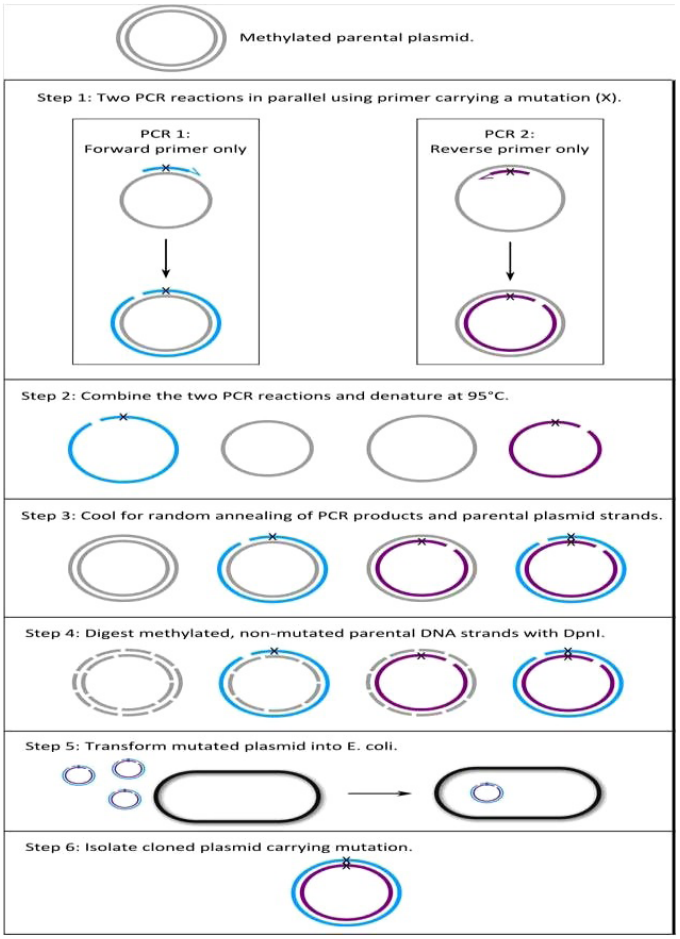
شناسایی کلنی های صحیح حاوی پلاسمیدهای جهش یافته

به منظور شناسایی کلنی های صحیح حاوی وکتور جهش یافته، کشت کلنی ها در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انجام شد و سپس پلاسمید استخراج شد. برای تایید تغییر ایجاد شده در پلاسمید جهش یافته، برش با آنزیم های محدودگر NdeI و PceI انجام شد. برای تایید نهایی از واکنش تعیین توالی با هر دو پرایمر رفتی و برگشتی با استفاده از فناوری BigDye و از طریق دستگاه تعیین توالی ABI۳۷۰۰XL DNA Applied Biosystems استفاده شد.

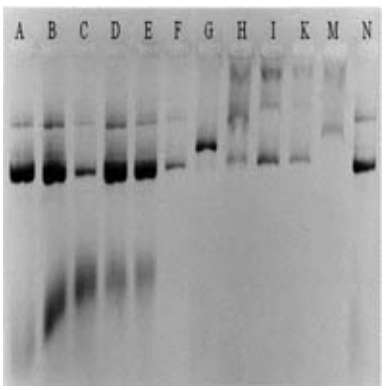
یافته ها:

نخستین آنزیم محدودگر موجود در جایگاه MCS وکتور pCold I، آنزیم NdeI بود. در طی واکنش جهش‌زایی مختص جایگاه توالی مورد شناسایی این آنزیم (CATATG) به گونه ای تغییر یافت که دیگر توسط این آنزیم تشخیص داده نشد. در واقع توالی فوق به توالی CCTATG تغییر یافت. بالادست توالی CCTATG، توالی AGG در وکتور pCold I وجود دارد. از این رو آنزیم PceI توالی جدید AGGCCT را شناسایی کرده و برش صاف بعد از توالی AGG ایجاد کرد. جایگاه عملکردی فاکتور Xa نیز در سطح آمینواسیدی درست بعد از آرژنین کد شده توسط AGG می باشد. بر این اساس نتایج حاصل از برش پلاسمید pCold I تغییر نیافته با آنزیم NdeI و PceI متفاوت از نتایج به دست آمده در اثر برش پلاسمید جهش یافته با این دو آنزیم به صورت جداگانه بود (شکل ۶). پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره یک (که دچار تغییر شده است)، با آنزیم PceI بریده شد (M) اما آنزیم NdeI بر روی آن تاثیری نداشت (K). این در حالی است که برش پلاسمید pCold I تغییرنیافته، با آنزیم NdeI صورت گرفت (G) اما آنزیم PceI بر روی آن تاثیری نداشت (H,I) (شکل ۶).

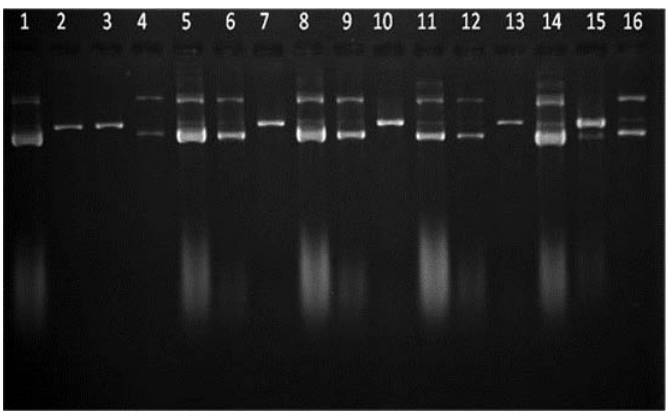
واکنش برش آنزیمی برای پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های مختلف نیز انجام شد (شکل ۷). وکتور در جایگاه مورد نظر دچار تغییر شده



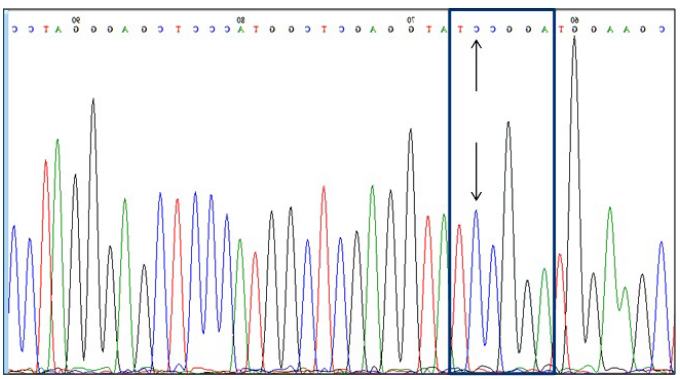
شکل ۵: مراحل انجام جهش زایی مختص جایگاه (۱۶)



شکل ۶: بارگذاری پلاسمیدهای استخراج شده از ۵ کلنی و انجام برش آنزیمی. A. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۲، B. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۳، C. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۴، D. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۵، E. پلاسمید شاهد ترانسفورم شده، F. پلاسمید شاهد اصلی، G. برش شاهد ترانسفورم شده با NdeI، H,I. برش شاهد ترانسفورم با PceI، K. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۱ با آنزیم NdeI، M. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۱ با آنزیم PceI. N. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۱ به عنوان شاهد. پلاسمیدهای بریده شده به شکل یک باند منفرد بین دو باند پلاسمید اصلی دیده می شوند.



شکل ۷: واکنش برش آنزیمی برای پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های مختلف. ۱.پلاسمید شاهد اصلی، ۲و۳. برش شاهد اصلی با NdeI، ۴. برش شاهد اصلی با PceI، ۵. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۲، ۶. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۲ با NdeI، ۷. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۲ با PceI، ۸. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۳، ۹. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۳ با NdeI، ۱۰. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۳ با PceI، ۱۱. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۴، ۱۲. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی ۴ با NdeI، ۱۳. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی ۴ با PceI، ۱۴. پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۵، ۱۵. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۲ با PceI، ۱۶. برش پلاسمید استخراج شده از کلنی شماره ۵ با NdeI



شکل ۸: کروماتوگرام حاصل از توالی یابی پلاسمید های تغییر یافته با پرایمرهای عمومی وکتور. باز تغییر یافته با فلش نشان داده شده است.

استخراج شده از کلنی های تغییر یافته نیز وجود جهش در جایگاه خاص را تایید کرد (شکل ۸). در وکتور جهش یافته، جایگاه برشی جدید نخستین آنزیم محدودگر که در سطح نوکلئوتیدی برش صاف ایجاد می کرد با جایگاه عملکردی فاکتور Xa در سطح آمینواسیدی یکسان شد.

بحث:

در این مطالعه وکتور جهش یافته pCold I-LZ با استفاده از روش جهش زایی مختص جایگاه، بدست آمد که می تواند برای کلون سازی سریع و جهت دار هر ژن هدف و بیان و خالص سازی پپتیدهای کوچک و پروتیین های بکر -دست نخورده- (دارای توالی آمینواسیدی اصلی بدون هیچ گونه آمینواسید اضافی در انتهای آمینی) از جمله پپتیدهای ضد

میکروبی و پپتیدهای ضد آنژیوژنز، ضد سلول های بنیادی سرطانی و ضد سلول های متاستازی استفاده شود.

طراحی مکانیسمی در راستای تغییر وکتور pCold I به گونه ای که توانایی بیان مستقیم و بدون هیچ گونه اسیدآمینه ی اضافی را دارا باشد، از اهداف این تحقیق بود. از آن جایی که هدف تغییر در جایگاه برشی آنزیم NdeI بود، روند طراحی پرایمر می بایست به‌گونه‌ای صورت می گرفت که باز تغییریافته در این ناحیه قرار گیرد. دو باز C وG نشان داده شده در توالی پرایمر، موارد تغییریافته جهت القای تغییرات مورد نظر در توالی اولیه وکتور می باشند. این تغییر در دومین باز از جایگاه شناسایی آنزیم NdeI صورت می گیرد. به منظور ایجاد این تغییر از طریق جهش زایی مختص جایگاه، ما با دو مشکل اصلی مواجه بودیم. مورد نخست، از آن جایی که هدف تغییر یک جفت باز مکمل واقع در هر دو رشته وکتور pCold I بود، بنابراین فرایند طراحی هر دو نوع پرایمر می بایست برای یک ناحیه مشخصی از وکتور صورت می گرفت. همین عامل زمینه را برای مکمل بودن توالی های پرایمرهای طراحی شده و تشکیل دایمر پرایمر- پرایمر فراهم می نماید که این امر منجر به کاهش شدید بازده در فرایند PCR و در ایجاد تغییر در وکتور می‌گردد. استراتژی طراحی شده برای رفع این مشکل، انجام واکنش PCR با هرکدام از پرایمرهای رفتی و برگشتی و به صورت جداگانه بود. در واقع تکثیر پلاسمید اصلی در دو واکنش PCR مجزا به‌گونه ای انجام شد که یا پرایمر رفتی در سیستم واکنش وجود داشته باشد یا این که واکنش تنها از طریق یک پرایمر برگشتی صورت گیرد. مشکل دومی که در راستای ایجاد این تغییر در وکتور pCold I ایجاد شد، بحث جداسازی وکتور تغییریافته به لحاظ نوکلئوتیدی از وکتور تغییرنیافته بود. از آن جایی که روند استراتژی طراحی شده به گونه‌ای بود که منجر به تغییر در جایگاه کلون سازی چندگانه و نه در ژن مقاومت به آنتی بیوتیک می گردید، بنابراین امکان استفاده از روش های متداول مبتنی بر حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک به منظور تمایز و تفکیک بین وکتور تغییر یافته و فاقد تغییر وجود نداشت. به عبارت دیگر هر دو نوع وکتور ایجاد شده بعد از انجام فرایند PCR، قابلیت رشد در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک را برای میزبان خود فراهم می نمودند. در این مرحله برای غلبه بر این مشکل از آنزیم DpnI استفاده نمودیم. این آنزیم توانایی برش پلاسمیدهای متیله غیرجهش‌یافته را دارا می باشد. از طرف دیگر توجه به این نکته ضروری است که پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری متیله بوده اما محصولاتی که از واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده ایجاد می شوند، فاقد گروه متیل می باشند. در نتیجه این امر منجر به عملکرد اختصاصی آنزیم مذکور می‌گردد. تستی که برای تأیید اولیه ایجاد تغییر مورد نظر در وکتور بعد از ترانسفورم به باکتری و استخراج مجدد آن طراحی شد، استفاده از هضم آنزیمی با NdeI و PceI بود. در صورت ایجاد تغییر، آنزیم PceI دارای توانایی برش پلاسمید تغییر یافته بود در حالی که امکان هضم آنزیمی برای آنزیم NdeI در پلاسمید تغییریافته وجود نداشت.

پپتیدهای ضد باکتریایی و ضد سرطانی به عنوان عوامل درمانی بیولوژیک نسل آینده مورد توجه بوده و دارای توانایی بالا در میانکنش اختصاصی با اهداف بیولوژیک و اثرات جانبی نسبتا پایین می باشند. تجارت داروهای بر پایه پپتید-پروتیین در حدود ۴۰ بیلیون دلار در سال می باشد که حدود ۱۰٪ تجارت قانونی دارو را دربرمی گیرد. تجارت این دسته از داروها بسیار سریعتر از موارد دیگر در حال گسترش می باشد. در سال های اخیر توسعه پپتیدهای ضد میکروبی، یا ضد آنژیوژنز (مانند آنژینکس) و متاستاز و سرطان معده و نیز نانوساختار های پپتیدی که قدرت ترمیم و بازسازی بافت ها و اندام ها را دارند، بسیار مورد توجه بوده و برخی در مراحل آزمایشگاهی بوده و برخی دیگر نیز در مرحله کارآزمایی های بالینی می باشند.(۱۴) از اینرو PEPTIDE NANOMEDICINE در سال های اخیر مطرح شده و آینده روشنی برای آن پیش بینی می شود. بیان نوترکیب این نانوساختارها می تواند امکان استفاده از آن ها را برای درمان بیماران فراهم کند. بسیاری از مولکول های آنتی آنژیوژنیک گزارش شده دارای ماهیت پپتیدی می باشند. تعدادی از این پپتیدها به گونه ای تکامل یافته اند که منجر به مهار عملکرد گیرنده های بیان شده بر روی سلول های اندوتلیال آنژیوژنیک می‌گردند. از جمله موارد بسیار موفق در این دسته می توان به پپتیدهای مهارکننده مولکول های چسبندگی به ویژه اینتگرین اشاره نمود. نمونه ای از این پپتیدهای مهارکننده عملکرد تحت عنوان آنژینکس (Anginex) نام دارد که مانع از تکثیر، اتصال و مهاجرت شده و منجر به القای آپوپتوز سلول های اندوتلیال عروقی در محیط in vitro و مهار آنژیوژنز در محیط in vivo می گردد. پپتید های ضد سرطانی به ویژه پپتیدهای ضد آنژیوژنز به نظر می‌رسد جزء استراتژی های درمانی جدید در سال های آینده محسوب می‌شوند بطوریکه طراحی پپتیدهایی با پایداری زیاد و بیان تحت وکتوری آن ها چشم انداز روشنی در حیطه ی درمان بیماری سرطان فراهم می آورد.(۱۵)

نتیجه گیری:

در این مطالعه با استفاده از روش جهش زایی مختص جایگاه، وکتور جهش یافته pCold I-LZ با قابلیت کلون سازی سریع و جهت دار هر ژن هدف و بیان و خالص سازی پپتیدهای کوچک و پروتیین های بکر -دست نخورده- به دست آمد. استفاده از هضم آنزیمی با دو آنزیم مختلف و در نهایت توالی یابی، مراحلی بودند که در راستای تأیید نتایج و شکل گیری تغییر در نوکلئوتید مورد نظر انجام شدند. بیان تحت وکتوری پپتیدهایی با اثرات ضد میکروبی، ضد آنژیوژنز، ضد سلول های بنیادی سرطانی و ضد سلول های متاستازی تأیید شده از طریق وکتور جهش یافته (سنتز شده در این تحقیق)، شرایط را برای گسترش کاربردهای بالینی آن ها فراهم می سازد.

REFERENCES

1. Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6:35-51.
2. Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:357-75.
3. Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002;66:236-48.
4. Silva ON, Mulder KC, Barbosa AE, Otero-Gonzalez AJ, Lopez-Abarrategui C, Rezende TM, et al. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications. *Front Microbiol* 2011;2:232.
5. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415:389-95.
6. Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006;24:1551-7.
7. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 2011;29:464-72.
8. Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerg Health Threats J* 2009;2:e1.
9. Suttmann H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, et al. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol* 2008;8:5.
10. Gaspar D, Veiga AS, Castanho MA. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol* 2013;4:294.
11. Andersson L, Blomberg L, Flegel M, Lepsa L, Nilsson B, Verlander M. Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* 2000;55:227-50.
12. Rao X, Hu J, Li S, Jin X, Zhang C, Cong Y, et al. Design and expression of peptide antibiotic hPAB-beta as tandem multimers in Escherichia coli. *Peptides* 2005;26:721-9.
13. Xu X, Jin F, Yu X, Ji S, Wang J, Cheng H, et al. Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2007;53:293-301.
14. Craik DJ, Fairlie DP, Liras S, Price D. The future of peptide-based drugs. *Chem Biol Drug Des* 2013;81:136-47.
15. Wang JB, Wang MD, Li EX, Dong DF. Advances and prospects of anginex as a promising anti-angiogenesis and anti-tumor agent. *Peptides* 2012;38:457-62.
16. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. *BMC Biotechnol* 2009;9:61.