

کلونینگ و بهینه‌سازی بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در اشرشیاکلی

محمدرضا حاجی‌زاده^۱، امیر محمد جعفری کاخکی^۲، محبوبه نبوی‌نیا^۳، مریم نبوی‌نیا^{۳*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: افزایش گازهای گلخانه‌ای و گرم شدن زمین باعث توجه جهانی در اصلاح این پدیده گردیده است. آنزیم فورمات دهیدروژناز قادر به کاهش CO₂ در تبدیل آن به فورمات بوده که توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به متانول تبدیل می‌شود. هم‌چنین این آنزیم در فرایند تولید دارو ساکساگلیپتین می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. هدف این تحقیق ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف القا کننده (IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)، زمان القا و محیط کشت بر تولید آنزیم فورمات دهیدروژناز می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه یک مطالعه آزمایشگاهی است. در ابتدا پرایمرهای اختصاصی به منظور تکثیر قطعه ژنی طراحی گردید. قطعه ژنی توسط پرایمرهای اختصاصی و روش PCR تکثیر گردید. ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز داخل وکتور pET28b وارد و به داخل باکتری *E. coli* انتقال یافت. به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین طراحی آزمایش با روش تاکوچی انجام و تاثیر دما، غلظت القاکننده و نوع محیط کشت بر میزان بیان پروتئین در دو سطح متفاوت، بررسی شد.

نتایج: نتایج Colony-PCR تکثیر ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در باکتری *E. coli* را تایید کرد. بررسی اثر زمان القا کننده و غلظت IPTG نشان داد زمان و غلظت القاگر اثر منفی بر تولید دارند. بیشترین میزان تولید پروتئین نو ترکیب در ۲۴ ساعت بعد از القا دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۰/۱ IPTG و حضور سوربیتول می‌باشد. در بررسی اثر محیط کشت بر بیان پروتئین محیط کشت LB بهترین محیط بود.

نتیجه‌گیری: افزایش غلظت IPTG تاثیری در افزایش بیان آنزیم نداشت، در نتیجه می‌توان با غلظت‌های کم IPTG پروتئین را تولید کرد که مقرون به صرفه می‌باشد هم‌چنین کاهش زمان موجب افزایش بیان پروتئین شود. محیط کشت LB (Luriabroth) همراه سوربیتول مناسب‌ترین محیط القای بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز است.

واژه‌های کلیدی: کلونینگ، بهینه‌سازی، سوربیتول، فورمات دهیدروژناز، IPTG

ارجاع: حاجی‌زاده محمد رضا، جعفری کاخکی امیر محمد، محبوبه نبوی‌نیا محمد، نبوی‌نیا مریم. کلونینگ و بهینه‌سازی بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در اشرشیاکلی. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۲): ۱۷-۸۷۰۵.

۱- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۳- مرکز تحقیقات علوم دارویی و داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

۴- کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۴۷۶۴۶۰، پست الکترونیکی: maryamsadatnabavinia@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰

مقدمه

افزایش غلظت گازهای گلخانه‌ای و عوارض ناشی از آن و به‌ویژه گرم شدن تدریجی زمین باعث توجه جهانی در اصلاح این پدیده و انتقال سیستم‌های انرژی از سوخت‌های فسیلی به منابع قابل تجدید گردیده است. این سوخت‌ها که شامل بیواتانول، بیومتانول، بیوهیدروژن و بیودیزل می‌باشد، می‌تواند به عنوان جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی به کار گرفته شود. هر چند سوختن سوخت‌های زیستی باعث کاهش تولید CO_2 و $Carbon\ dioxide$ و آلودگی کمتر محیط زیست می‌شوند اما در فرآیند تولید آن‌ها حذف فلور میکروبی نرمال از روی پیش ساز این سوخت‌ها ضروری است و همین امر باعث می‌شود در فرایند آماده سازی و تولید آن‌ها مقدار زیادی CO_2 تولید شود. بنابراین یافتن راه‌های جایگزین برای تولید آن‌ها به منظور کاهش تولید CO_2 مهم است (۱-۳). آنزیم فورمات دهیدروژناز قادر به کاهش الکتروشیمیایی CO_2 در تبدیل آن به فورمات بوده که در نهایت توسط آنزیم الکل دهیدروژناز می‌تواند به متانول تبدیل شود. که این امر می‌تواند تولید سوخت‌های زیستی مانند متانول را با کاهش تولید CO_2 و کاهش آلودگی محیط زیست همراه کند (۴). علاوه بر این آنزیم از آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتر داروی ساکساگلیپتین می‌باشد. در طول واکنش انجام شده برای تولید ماده حد واسط داروی ساکساگلیپتین، فورمات‌دهیدروژناز NAD به $NADH$ تبدیل می‌کند تا مجدداً در واکنش بعدی مورد استفاده قرار گیرد، که برای انجام این کار به فورمات آمونیوم و بافر فسفات نیاز دارد (۵،۶). در کلون‌سازی ژن‌ها می‌توان ژن یک پروتئین با اهمیت جانوری یا گیاهی را از میزبان طبیعی جدا کرد، درون یک حامل قرار داد و به درون باکتری فرستاد. اگر مراحل به درستی صورت پذیرفته باشد، پروتئین نوترکیب توسط سلول باکتری ساخته می‌شود. در چنین حالتی می‌توان مقادیر زیادی پروتئین به‌دست آورد (۷). تولید یک پروتئین در شرایط مختلف داخل باکتری متفاوت است. زمانی استفاده از یک آنزیم در فرآیندهای صنعتی از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر است که بتوان این آنزیم را

به مقدار زیاد در محیط کشت تولید و خالص کرد. فاکتورهای مهمی در بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E.coli* نقش دارند از این فاکتورها می‌توان به سرعت هم‌زدن محیط، زمان القا بیان، مدت بیان، غلظت القا کننده، نوع پروموتور، دما، ترکیبات محیط کشت، pH و نوع منبع کربن اشاره کرد، روش‌های سنتی بهینه‌سازی به دلیل اینکه بیان هر فاکتور را جداگانه بررسی می‌کرد اما به دلیل عدم محاسبه تاثیر فاکتورها بر هم معمولاً کار آمد نبوده و بسیار وقت‌گیر می‌باشند. امروزه روش‌های طراحی آزمایش می‌توانند سرعت آزمایش‌های بهینه‌سازی بیان را کاهش داده و تاثیر عوامل مختلف بر یکدیگر را مشخص کنند و شرایط بهینه تولید بیان هر پروتئین را مشخص می‌کند (۸). یکی از روش‌هایی که می‌توان برای طراحی آزمایش استفاده کرد استفاده از روش تاکوچی است مزیت این روش کاهش تعداد آزمایشات، امکان بررسی تاثیر عوامل مختلف بر یکدیگر و تعیین سطوح بهینه آزمایش می‌باشد (۹). هدف این تحقیق کلونینگ و بهینه‌سازی بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در باکتری *E.coli* و همچنین ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف IPGT، اصلاح کننده، زمان القا و محیط کشت بر بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز و بهینه‌سازی می‌باشد.

روش بررسی

پس از انتخاب توالی ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز و بهینه‌سازی کدون، این ژن برای سنتز به شرکت پیشگامان انتقال ژن ارسال و در داخل وکتور pET28a کلون گردید. به منظور مستعد کردن باکتری‌ها برای دریافت وکتور نوترکیب از محلول کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد و ترانسفورم کردن باکتری‌ها با استفاده از شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. و باکتری‌ها به محیط کشت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شد و به مدت ۱۸ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور تایید وجود قطعه ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در کلونی‌های تشکیل شده از روش Colony-PCR استفاده شد. ابتدا کلونی‌هایی به‌دست آمده از مرحله قبل با استفاده از آنس

میلی‌مولار (۲ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر بافر لیز) و آنزیم لیزوزیم ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر بافر لیز) ترکیب شده است اضافه شد و رسوب داخل آن کاملاً حل گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شد. پس از لیز کامل نمونه‌ها به روش فریز - دفریز، سانتریفیوژ با دور ۱۶۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه انجام و رسوب از سوپرناتانت جدا شد. در مرحله بعد با استفاده از منحنی استاندارد برادفورد غلظت نمونه‌ها برای بررسی میزان بیان در فاز محلول محاسبه شد. در این مرحله به منظور مقایسه صحیح میزان پروتئین بیانی در فاز محلول باکتری‌ها غلظت یکسان از نمونه‌ها برداشته شد و با بافر نمونه ۲X مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. نمونه‌ها با توجه به حجم‌های محاسبه شده به روش SDS-PAGE الکتروفورز گردید. با توجه به تاثیر دما و غلظت و نوع محیط کشت بر میزان بیان پروتئین، به منظور بررسی دقیق‌تر این ۳ فاکتور بر بیان پروتئین از طراحی آزمایش به روش تاکوچی . با آرایه متعامد ارتوگونال L8 استفاده شده است. فاکتورهای انتخابی شامل زمان، غلظت IPTG، نوع محیط کشت و نوع القا کننده همگی در دو سطح و طبق جدول ۱ بررسی شد.

جدول ۱ طراحی آزمایش. A نشان دهنده محیط کشت LB و B نشان‌دهنده محیط کشت 2YT، عدد ۱ نشان‌دهنده کمترین و عدد ۲ نشان دهنده بیشترین مقدار متغیر که برای زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد القا بیان پروتئین و برای غلظت IPTG برابر ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار می‌باشد. برای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز مراحل فوق به همین شکل انجام شد با این تفاوت که بعد از رسیدن به OD= ۰/۶ نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از رسیدن به این دما القاگر اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور مقایسه بیان پروتئین در نمونه‌های مختلف ژل SDS-PAGE پس از اسکن با استفاده از نسخه چهار نرم‌افزار ImageJ آنالیز گردید. در نهایت آنالیز روی داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار mini tab انجام شد.

استریل در کنار شعله روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین مجدداً کشت داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی که با نرم افزار Gene Runner ورژن ۶ طراحی شده بودند استفاده شد. مخلوط PCR با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر مستقیم (GGATCC (ATGAAAATCGTTCT و معکوس (AAGCTTTCATTAAGCAAC) با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی‌مولار همراه با ۲۰ میکرولیتر آب فاقد DNase تهیه شد. به جای استفاده از DNA الگو سر سمپلر را به کلونی‌های تشکیل شده تماس مختصری داده و در درون مخلوط PCR قرار داده شد. یک کنترل منفی (فاقد باکتری) و یک کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز) تهیه شد. یکی از کلون‌های مثبت کشت داده شد و پلاسمید آن با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید شرکت اینویترژن طبق پروتکل شرکت تخلیص گردید و از این پلاسمید به دست آمده برای ترانسفرم باکتری *E. coli* استفاده شد. به منظور تایید نتیجه Colony-PCR هم‌چنین بررسی پلاسمید تخلیص شده نمونه‌ها داخل ژل اگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. آگارز در بافر TBE 1X حل شد و درون ماگروویو تا انحلال کامل آگارز و شفاف شدن محلول حرارت داده شد. سپس مقدار ۰/۵ میکرولیتر رنگ DNA safe stain داخل آن زده شد و این محلول داخل کاست ژل حاوی شانه ریخته شد. بعد از بستن ژل نمونه‌ها به همراه بافر لودینگ 6x در کنار DNA size marker به مدت یک ساعت با ولتاژ ۸۰ درون بافر 1x TBE الکتروفورز شد. به منظور انتخاب کلونی که بیشترین توانایی تولید پروتئین را دارد، بیان کلی پروتئین در کلونی‌ها باکتری *E. coli* که در تست PCR از نظر وجود ژن فورمات دهیدروژناز مثبت بودند به محیط کشت LB حاوی کانامایسین منتقل و پس از رسیدن OD رشد باکتری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ توسط IPTG القا شدند. و نتایج با استفاده از SDS-PAGE آنالیز شد. به نمونه کلونی‌های مختلف، ۷۰ میکرولیتر بافر لیز که با PMSF ۹۰

برای تعیین غلظت پروتئین یک محلول به روش برادفورد، ابتدا باید منحنی استاندارد رسم شود. برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا ۱ میلی‌گرم BSA در یک میلی‌لیتر آب مقطر

حل گردید سپس به صورت سریالی غلظت‌های مختلف از این استوک ساخته شد. برای تخلیص پروتئین از محیط کشت از ستون رزین کروماتوگرافی Ni-NTA استفاده شد.

جدول ۱: طراحی آزمایش به روش تاکوچی

| تعداد آزمایشات r | نوع محیط | غلظت IPTG | زمان |
|------------------|----------|-----------|------|
| ۱ | A | ۱ | ۱ |
| ۲ | A | ۱ | 1 |
| ۳ | A | ۲ | ۲ |
| ۴ | A | ۲ | ۲ |
| ۵ | B | ۱ | ۱ |
| ۶ | B | ۱ | ۱ |
| ۷ | B | ۲ | ۲ |
| ۸ | B | ۲ | ۲ |

نتایج

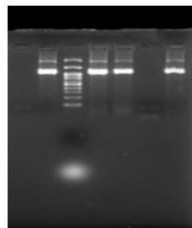
نتایج حاصل از Colony-PCR کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین نشان داد کلنی‌های شماره ۱، ۲ و ۴ حاوی ژن فورمات دهیدروژناز می‌باشند (شکل ۱). شکل ۱ نتایج Colony-PCR وکتور نو ترکیب را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط کانامایسین از نظر وجود ژن فورمات دهیدروژناز مثبت هستند. چاهک‌ها به ترتیب از راست به چپ شامل. کنترل منفی، کنترل مثبت، سایز مارکر DNA، ۴ کلنی بعد ترانسفرم

بررسی بیان پروتئین در دمای ۱۵، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد آنزیم فرمات دهیدروژناز بیان نشد (داده‌ها نشان داده نشده است). (در شکل ۲) بررسی بیان در دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی ژل SDS PAGE نشان می‌دهد در مقایسه با نمونه کنترل (نمونه حاوی پلاسمید فاقد القاکننده IPTG) حاوی باند پروتئین کمتر از ۶۰ کیلو دالتن در مقایسه با پروتئین آلبومین می‌باشد. بنابراین دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای طراحی آزمایش در نظر گرفته شد.

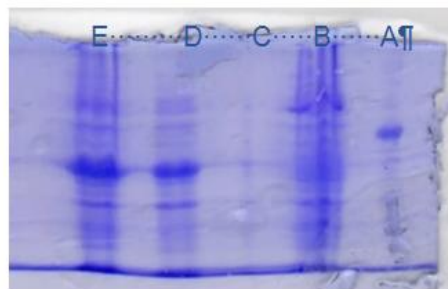
پس از بررسی‌های انجام شده با توجه به اینکه بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت نامحلول بود از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای بهینه‌سازی بیان استفاده شد. برای تعیین غلظت ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز از تست برادفورد استفاده شد. ابتدا نمودار استاندارد با استفاده از سریال رقت پروتئین BSA رسم شد. معادله به دست آمده از این نمودار برای محاسبه غلظت نمونه‌ها استفاده شد نمودار ۱. به منظور بررسی و بهینه‌سازی بیان پروتئین طراحی آزمایش به روش فول فاکتوریل انجام شد. چهار فاکتور به عنوان متغیرهای موثر در بیان پروتئین در نظر گرفته شد. متغیر غلظت IPTG با دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار، متغیر زمان در ۲۴ و ۴۸ ساعت، متغیر محیط کشت با استفاده از ۲ محیط کشت 2YT و LB و متغیر اصلاح‌کننده سوربیتول بود که مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تولید پروتئین طبق مدل‌های آزمایش در جدول ۲ آورده شده است. مدت زمان انکوباسیون پس القا به عنوان یک فاکتور مهم در تولید ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه بیان در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (در غلظت‌های متفاوت القاگر) جهت تولید پروتئین نو ترکیب در فاز محلول بررسی شد.

به وسیله ستون رزین Ni NTA برای محیط کشت و بیدهای مگنتی Ni NTA برای لیز باکتری، نمونه پروتئین خالص شده توسط PAGE-SDS ارزیابی شد (شکل ۷). تخلیص پروتئین در دمای به منظور تایید بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز، نمونه‌های کنترل مثبت و منفی بعد از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید به کاغذ نیتروسولوز منتقل شدند و با استفاده از آنتی‌بادی آنتی‌هیستیدین بیان پروتئین بیان پروتئین به اثبات رسید (شکل ۸).

(شکل‌های ۳ تا ۶). بیان پروتئین نوترکیب در هر ۲ زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از القا تفاوت ندارد. نوع محیط کشت تاثیر چندانی در بیان پروتئین ندارد. حضور سوربیتول بیان در فاز مایع را افزایش می‌دهد. کاهش غلظت IPTG باعث کاهش تولید پروتئین می‌شود (نمودار ۲ و ۳). تخلیص پروتئین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در محیط کشت LB به همراه ۰/۱ میکرومولار IPTG و یک سی‌سی سوربیتول طی ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. پس از انجام فرایند تخلیص پروتئین نوترکیب

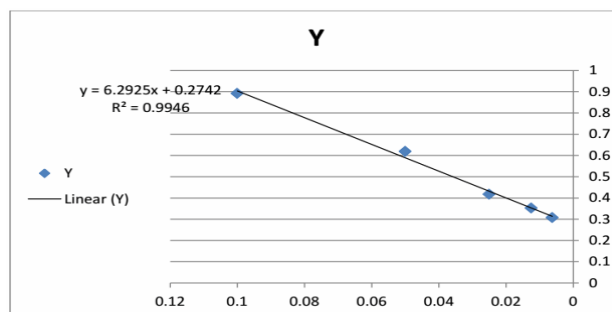


شکل ۱ نتایج Colony-PCR کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی کانامایسین



شکل ۲: بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در محیط کشت LB در دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد

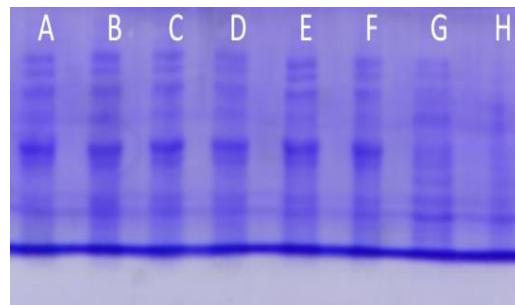
A. سایز مارکر پروتئین آلبومین. B. کنترل منفی. C. محیط کشت باکتری. D. بیان باکتری دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. E. بیان باکتری دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد



نمودار ۱: بررسی اثر محیط کشت، زمان القا، اصلاح کننده و غلظت القاگر بر بیان پروتئین نوترکیب

جدول ۲: نتایج حاصل از تولید پروتئین طبق مدل‌های مختلف طراحی آزمایشات بهینه‌سازی تولید پروتئین

| زمان | الفاکننده | محیط کشت | اصلاح کننده | تکرار ۱ | تکرار ۲ | میانگین |
|------|-----------|----------|-------------|---------|---------|---------|
| ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۲/۷۳ | ۳/۹۱ | ۲/۷۳ |
| ۱ | ۱ | ۲ | ۲ | ۳/۳۱ | ۲/۸۴ | ۳/۳۱ |
| ۱ | ۲ | ۱ | ۲ | ۲/۱۷ | ۴/۰۴ | ۲/۱۷ |
| ۱ | ۲ | ۲ | ۱ | ۳/۴۴ | ۳/۰۷ | ۳/۴۴ |
| ۲ | ۱ | ۱ | ۲ | ۴/۰۹ | ۴/۰۳ | ۴/۰۹ |
| ۲ | ۱ | ۲ | ۱ | ۲/۰۵ | ۲/۲۲ | ۲/۰۵ |
| ۲ | ۲ | ۱ | ۱ | ۲/۶۲ | ۲/۵۵ | ۲/۶۲ |
| ۲ | ۲ | ۲ | ۲ | ۲/۷۵ | ۲/۲۴ | ۲/۷۵ |



شکل ۳: بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در محیط کشت 2YT در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار از IPTG پس از ۲۴ ساعت از القا

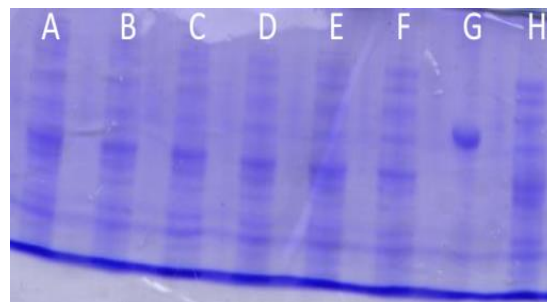
A و E: محیط کشت 2YT و غلظت μM IPTG پس از ۲۴ ساعت از القا

B و F: محیط کشت 2YT و غلظت $0/\mu\text{M}$ IPTG پس از ۲۴ ساعت از القا

C: محیط کشت 2YT و غلظت μM IPTG به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

D: محیط کشت 2YT و غلظت $0/\mu\text{M}$ IPTG به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

G: محیط کشت 2YT (کنترل منفی) پس از ۲۴ ساعت از القا - H: سایز مارکر پروتئین



شکل ۴: بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در محیط کشت 2YT در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار از IPTG پس از ۴۸ ساعت از القا

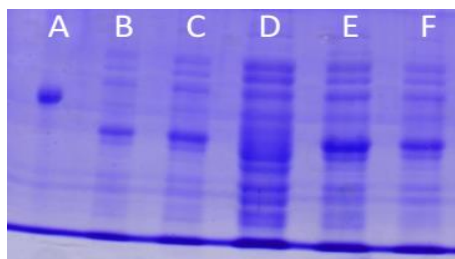
A و E: محیط کشت 2YT و غلظت μM IPTG پس از ۴۸ ساعت از القا

B و F: محیط کشت 2YT و غلظت $0/\mu\text{M}$ IPTG پس از ۴۸ ساعت از القا

C: محیط کشت 2YT و غلظت μM IPTG به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

D: محیط کشت 2YT و غلظت $0/\mu\text{M}$ IPTG به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

G: پروتئین آلبومین به عنوان. H: محیط کشت 2YT (کنترل منفی) پس از ۴۸ ساعت از القا



شکل ۵: بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در محیط کشت LB در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار از IPTG پس از ۲۴ ساعت از القا

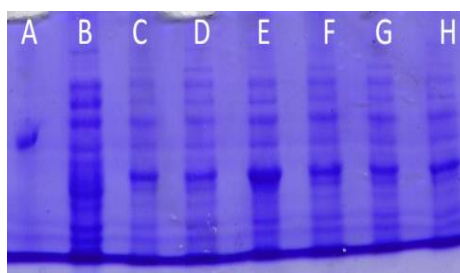
A: پروتئین آلبومین به عنوان سایز مارکر پروتئین

B: محیط کشت LB و غلظت IPTG $1 \mu\text{M}$ به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

C و F: محیط کشت LB و غلظت IPTG $0/1 \mu\text{M}$ به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

D: محیط کشت LB (کنترل منفی) پس از ۲۴ ساعت از القا

E: محیط کشت LB و غلظت IPTG $1 \mu\text{M}$ پس از ۲۴ ساعت از القا



شکل ۶: بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در محیط کشت LB در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار از IPTG پس از ۴۸ ساعت از القا

A: پروتئین آلبومین به عنوان سایز مارکر پروتئین

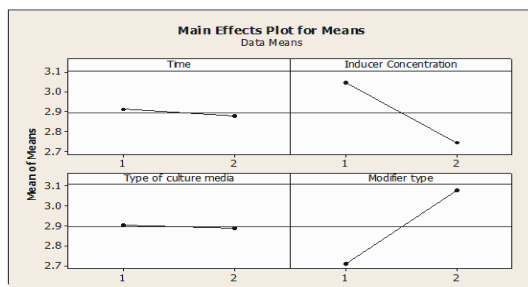
B: محیط کشت LB (کنترل منفی) پس از ۴۸ ساعت از القا

C و G: محیط کشت LB و غلظت IPTG $0/1 \mu\text{M}$ پس از ۴۸ ساعت از القا

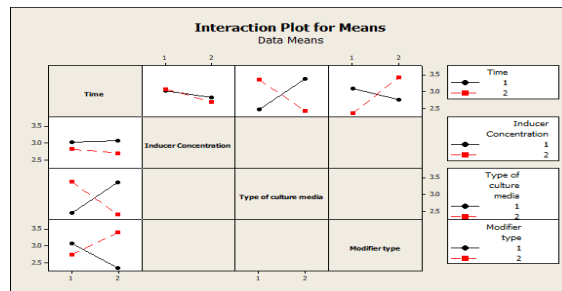
D و H: محیط کشت LB و غلظت IPTG $1 \mu\text{M}$ پس از ۴۸ ساعت از القا

E: محیط کشت LB و غلظت IPTG $1 \mu\text{M}$ به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

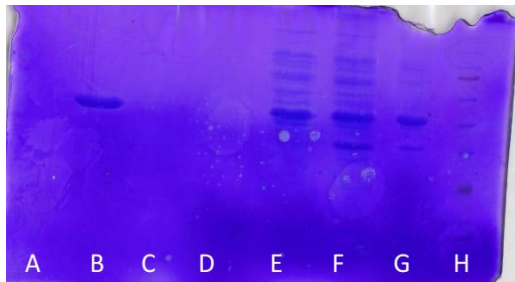
F: محیط کشت LB و غلظت IPTG $0/1 \mu\text{M}$ به همراه $4/39$ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا



نمودار ۲: بررسی اثر محیط کشت، زمان القا، اصلاح کننده و غلظت القاگر بر بیان پروتئین نوترکیب



نمودار ۳: بررسی اثر اصلاح کننده، زمان، غلظت القاگر و محیط کشت بر یک دیگر



شکل ۷: مراحل تخلیص پروتئین محیط کشت

- A

B. نمونه Elusoin

C. نمونه شست و شو بار دوم

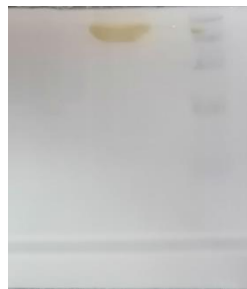
D. نمونه شست و شو بار اول

E. نمونه مرحله اتصال

F. نمونه بعد لیز باکتری

G. نمونه جمع آوری شده قبل از لیز باکتری

H. سایز مارکر پروتئین



شکل ۸: تایید اختصاصیت پروتئین با استفاده از وسترن بلات

A. سایز مارکر پروتئینی B. نمونه لیز باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب C. کنترل منفی

مشکل مهمی در تولید پروتئین نوترکیب در باکتری می باشد. پلی پپتیدهای خارجی مخصوصاً وقتی که به میزان زیاد تولید می شوند به صورت اینکلوزن بادی ها در سلول تجمع می یابند به همین دلیل از طریق مهندسی پروتئین و شرایط استراتژی هایی برای افزایش محلولیت پروتئین ها در باکتری *E. coli* معرفی

بحث

یکی از مهم ترین مراحل در تولید آنزیم ها برای استفاده در شرایط صنعتی مقدار تولید و تولید آنزیم با تاخوردگی مناسب داخل میزبان می باشد. تاخوردگی و پیش نادرست پروتئین ها

مناسب برای تولید یک پروتئین نوترکیب توسط میزبان باید به‌دست آید. از این رو مطالعه حاضر نشان داد بیشترین بیان پروتئین در فاز محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان القا اتفاق می‌افتد. القا معمولاً در فاز اولیه یا میانه فاز لگاریتمی اتفاق می‌افتد. هرچند گزارشها نشان می‌دهند که القا در انتهای فاز لگاریتمی یا حتی در فاز سکون نیز می‌تواند بر محلولیت پروتئین و بیان کلی پروتئین تاثیرگذار باشد. به‌طورکلی القا در زمان ابتدای فاز لگاریتمی بهترین نتیجه را دارد. القا در فاز سکون کاملاً اثر منفی دارد و موجب از دست رفتن بیان کلی برای بسیاری از پروتئین‌ها می‌شود. همچنین بر محلولیت پروتئین نیز تاثیر منفی دارد (۱۷). در این مطالعه زمان القا با توجه به بررسی‌های اولیه ثابت در نظر گرفته شد. غلظت معمول IPTG برای بیان پروتئین نوترکیب بطور معمول بین ۰/۱-۱ میلی‌مولار است. هرچند غلظت IPTG بین ۰ تا ۱ میلی‌مولار بر سرعت رشد خاص باکتری *E. coli* تاثیر نمی‌گذارد اما مقدار بیشتر القا کننده در محیط منجر به بیان مقادیر بالاتری از پروتئین نوترکیب می‌شود (۱۵، ۱۸). در مطالعه حاضر کاهش غلظت IPTG باعث افزایش تولید پروتئین در فاز محلول شد و غلظت ۰/۱ میلی‌مولار IPTG تاثیر بیشتری در بیان پروتئین به صورت محلول داشت که نشان می‌دهد برای هر نوع پروتئین نیاز به بررسی غلظت بهینه IPTG داریم. غلظت برخی نمک‌ها، پپتون و مخمر عصاره می‌تواند غلظت پروتئین نوترکیب موردنظر را افزایش دهد. محیط‌های مختلف نظیر LB، TB و 2YT می‌توانند جهت بهینه‌سازی بیان پروتئین مورد استفاده قرار بگیرد (۱۹، ۲۰). مطالعات نشان می‌دهد هر دو ترکیب محیط کشت و شرایط کشت برای بیان پروتئین مهم هستند. محیط Luria broth (LB) به راحتی ساخته می‌شود و حاوی بیشترین ماده مورد نیاز برای کشت باکتری *E. coli* است. با این حال، رشد باکتری *E. coli* در LB با تراکم نسبتاً کمی متوقف می‌شود، زیرا حاوی مقادیر کم کربوهیدرات و کاتیون‌های دو ظرفیتی است (۱۰). در این مطالعه برای بررسی اثر نوع محیط کشت بر بیان پروتئین نوترکیب از دو محیط LB و 2YT

شده‌اند (۱۰). یکی از استراتژی‌های افزایش بیان پروتئین تغییر وکتور می‌باشد و به معنی تغییر پروموتور همراه ژن مدنظری که کون می‌شود و یا تغییر فیوژن تگ fusion tag که بر محلولیت پروتئین نوترکیب بیانی تاثیر می‌گذارد می‌باشد (۱۱). بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین نوترکیب تولید آن را از لحاظ اقتصادی به صرفه می‌کند؛ پارامترهایی نظیر نوع میزبان، نوع محیط کشت، pH، دمای محیط کشت، مدت زمان انکوباسیون پس از القا و غلظت IPTG در آن دخیل می‌باشد و تاکنون بررسی‌های قابل توجهی در زمینه افزایش بیان و حلالیت پروتئین نوترکیب صورت گرفته است (۱۲). اکثر روش‌هایی که در بیوتکنولوژی پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود با استفاده از رویکرد یک فاکتور در زمان (OFAT one-factor-at-a-time) انجام شده و متعاقباً بهینه‌سازی می‌شود که تاثیر تنها یک عامل در زمان یک عامل را در یک زمان بررسی می‌کند (۱۳). با این حال، برخی از فرآیند بیوشیمیایی تحت تاثیر فعل و انفعالات متغیرهای آزمایشی بر هم قرار می‌گیرند. بهترین روش برای بررسی تاثیر عوامل متعدد و همچنین تاثیر فعل و انفعالات آنها بر فرآیند آزمایش، روش طراحی آماری آزمایشات است. از این روش‌های آماری برای ارزیابی متغیرهایی که بیشترین تاثیر را در تولید پروتئین نوترکیب مورد بررسی از نظر عملکرد، کیفیت محصول، خلوص و حلالیت دارند استفاده شده است. (۱۳، ۱۴). با توجه به ساختار آنزیم فورمات دهیدروژناز و افزوده شدن دنباله وکتور به پروتئین نوترکیب بیانی وزن آن حدود ۴۸ کیلودالتون تخمین زده می‌شود که وزن آن روی ژل SDS-PAGE پس از رنگ‌آمیزی حدود ۴۸ کیلودالتون بود. که با پیش‌بینی انجام شده مطابقت داشت. دمای بالا می‌تواند رشد سلول را افزایش دهد، اما برای بیان پروتئین مضر است زیرا سرعت رشد بالاتر منجر به احتمال بیشتر از دست دادن پلاسمید می‌شود و باعث تقسیم نادرست حامل بیان و عدم بیان ژن نوترکیب می‌شود، به خصوص در بیان سلول حامل پلاسمید دمای اپتیمم در زمان القای پروتئین بین ۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته می‌شود (۱۵، ۱۶). از آنجا که این دما برای پروتئین‌های مختلف متفاوت می‌باشد بنابراین دمای

فورمات دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت. طراحی آزمایش با کمک روش فول فاکتوریل انجام گرفت که در مقایسه با روشهای سنتی با کم کردن تعداد آزمایشات و ادغام فاکتورها توانست تمام حالت‌های آزمایش و تاثیر فاکتورها بر یکدیگر را در نظر بگیرد. نتایج نشان داد وجود سوربیتول و کاهش غلظت (0/1 IPTG میلی مولار) بر بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز تاثیر مثبت می‌گذارد و در زمان ۲۴ ساعت پس از القا بیشترین مقدار ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز تولید شد. هم‌چنین محیط LB به‌عنوان بهترین محیط برای بیان بهینه ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز شناسایی شد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر حاصل از طرح شماره ۸۹۱۲ تصویب شده در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.
حامی مالی: از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد برای حمایت مالی از این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد مورد تایید قرار گرفته است. (کد اخلاق: IR.SSU.MEDICINE.REC.1399.156)

مشارکت نویسندگان

مریم‌السادات نبوی‌نیا در ارائه ایده، محبوبه نبوی‌نیا. در طراحی مطالعه، محمدرضا حاجی‌زاده در جمع‌آوری داده‌ها، محمد جعفری کاخکی در تجزیه و تحلیل داده‌ها مشارکت داشته و همه نویسندگان در تدوین، ویرایش اولیه و نهایی مقاله و پاسخگویی به سوالات مرتبط با مقاله سهیم هستند.

استفاده شد. نتایج نشان داد محیط LB که از تریپتون (مسئول تامین پپتیدها و آمینواسید)، عصاره مخمر (مسئول تامین ویتامین‌ها و مواد ضروری) و سدیم کلراید (تامین سدیم و بالانس اسمتیک) تشکیل شده است، مناسب‌ترین محیط برای بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز در باکتری است. مطالعات نشان داده وجود مقادیری از سوربیتول سبب افزایش بازده و ثبات نتایج در محیط الکتروپوراسیون می‌شود. علاوه بر این، چارپون‌های شیمیایی اسمولیت مانند گلیسرول، پرولین و سوربیتول، هنگامی که در غلظت‌های کم به محیط رشد اضافه می‌شوند، ممکن است محیط میکرو مناسب‌تری را برای تاخوردگی بهتر پروتئین فراهم کند (۲۱،۲۲). طی این مطالعه نیز مشاهده شد وجود سوربیتول سبب افزایش بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز می‌شود. مقدار ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز تولیدی در تحقیق حاضر برابر ۰/۲۰۵۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر از میلی‌لیتر محیط کشت بود، هر چند با توجه به خصوصیت یک ژن بیان آن در میزبان‌های مختلف متفاوت است مطالعه حاضر نشان داد روش فول فاکتوریل نیز می‌تواند برای بررسی نقطه بهینه بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز مناسب باشد. بدیهی است که استفاده از روش فول فاکتوریل برای طراحی آزمایش نه‌تنها تعداد دفعات آزمایش را کاهش می‌دهد بلکه می‌تواند با بررسی همزمان فاکتورهای مختلف تاثیر فاکتورهای مختلف بر یکدیگر را محاسبه کند و به این ترتیب نقطه بهینه بیان پروتئین را حساب کند. و این روش در مقایسه با روش‌های قدیمی که در هر زمان فقط یک فاکتور بررسی می‌شود می‌تواند در زمان کوتاه‌تری انجام شود و در نتیجه دفعات آزمایش و کاهش مواد مصرفی را به همراه خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر اصلاح کننده، غلظت القا کننده، مدت زمان پس از القا و نوع محیط کشت بر میزان بیان ژن آنزیم

References:

- 1-Moua PS, Gonzalez A, Oshiro KT, Tam V, Li ZH, Chang J, et al. *Differential Secretion Pathways of Proteins Fused to the Escherichia Coli Maltose Binding Protein (MBP) in Pichia Pastoris*. Protein Expr Purif 2016; 124: 1-9.
- 2-Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S, Hawthorne P. *Land clearing the biofuel carbon debt*. Science 2008; 319(5867): 1235-8.
- 3-Takacs M, Makhlynets OV, Tolbert PL, Korendovych IV. *Secretion of Functional Formate Dehydrogenase in Pichia Pastoris*. Protein Eng Des Sel 2017; 30(3): 279-84.
- 4-Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S, Hawthorne P. *Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt*. Science 2008; 319(5867): 1235-8.
- 5-Hanson RL, Goldberg SL, Brzozowski DB, Tully TP, Cazzulino D, Parker WL, et al. *Preparation of an Amino Acid Intermediate for the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor, Saxagliptin, Using a Modified Phenylalanine Dehydrogenase*. Advanced Synthesis & Catalysis 2007; 349(8- 9): 1369-78.
- 6-Hoelsch K, Sührer I, Heusel M, Weuster-Botz D. *Engineering of Formate Dehydrogenase: Synergistic Effect of Mutations Affecting Cofactor Specificity and Chemical Stability*. Appl microbiol biotechnol 2013; 97: 2473-81.
- 7-Brown TA. *Gene Cloning and DNA Analysis: an Introduction*. 6 ed. John Wiley & Sons; 2010.
- 8-Uhoraningoga A, Kinsella GK, Henehan GT, Ryan BJ. *The Goldilocks Approach: A Review of Employing Design of Experiments in Prokaryotic Recombinant Protein Production*. Bioengineering 2018; 5(4): 89.
- 9-Rao RS, Kumar CG, Prakasham RS, Hobbs PJ. *The Taguchi Methodology as a Statistical Tool for Biotechnological Applications: A Critical Appraisal*. Biotechnol J 2008; 3(4): 510-23.
- 10-Vera A, González- Montalbán N, Arís A, Villaverde A. *The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins is Enhanced at Low Growth Temperatures*. Biotechnol bioeng 2007; 96(6): 1101-6.
- 11-Gopal GJ, Kumar A. *Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia Coli*. Protein J 2013; 32(6): 419-25.
- 12-Papaneophytou C. *Design of Experiments as a Tool for Optimization in Recombinant Protein Biotechnology: From Constructs to Crystals*. Mol Biotechnol 2019; 61(12): 873-91.
- 13-Mosrati R, Nancib N, Boudrant J. *Variation and Modeling of the Probability of Plasmid Loss as a Function of Growth Rate of Plasmid- Bearing Cells of Escherichia Coli during Continuous Cultures*. Biotechnol bioeng 1993; 41(4): 395-404.
- 14-Betiku E. *Molecular Chaperones Involved in Heterologous Protein Folding in Escherichia Coli*. Biotechnol Molecular Biology Reviews 2006; 1(2): 66-75.
- 15-Horii T, Ogawa T, Ogawa H. *Organization of the RecA Gene of Escherichia Coli*. Proc Natl Acad Sci 1980; 77(1): 313-7.
- 16-Berrow NS, Büssow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers G, et al. *Recombinant Protein Expression and Solubility Screening in Escherichia Coli: A Comparative Study*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006; 62(Pt 10): 1218-26.

- 17-Antoniou G, Papakyriacou I, Papanephytou C. *Optimization of Soluble Expression and Purification of Recombinant Human Rhinovirus Type-14 3C Protease Using Statistically Designed Experiments: Isolation and Characterization of the Enzyme*. Mol Biotechnol 2017; 59(9-10): 407-24.
- 18-Yan F, Qian M, Yang F, Cai F, Yuan Z, Lai S, et al. *A Novel Pro-Apoptosis Protein PNAS-4 From Xenopus Laevis: Cloning, Expression, Purification, and Polyclonal Antibody Production*. Biochemistry (Moscow) 2007; 72(6): 664-71.
- 19-Kram KE, Finkel SE. *Rich Medium Composition Affects Escherichia Coli Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture*. Appl Environ Microbiol 2015; 81(13): 4442-50.
- 20-Tseng C-L, Leng C-H. *Influence of Medium Components on the Expression of Recombinant Lipoproteins in Escherichia Coli*. Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93(4): 1539-52
- 21-Zhang H, Li Y, Chen X, Sheng H, An L. *Optimization of Electroporation Conditions for Arthrobacter with Plasmid PART2*. J Microbiol Methods 2011; 84(1): 114-20.
- 22-Lebendiker M, Danieli T. *Production of Prone-to-Aggregate Proteins*. FEBS Letters 2014; 588(2): 236-46.

Cloning and Optimization of Formate Dehydrogenase Gene Expression in *E. COLI*

Mohammad Reza Hajizadeh¹, Amir Mohamad Jafari Kakhki²,
Mahboubeh Nabavinia³, Maryam Sadat Nabavinia^{*3,4}

Original Article

Introduction: The increase in greenhouse gas levels and the gradual warming of the earth have garnered worldwide interest. The enzyme formate-dehydrogenase can reduce CO₂ by converting it into formate, which is subsequently converted into methanol by the enzyme alcohol dehydrogenase. The purpose of this research was to evaluate the effect of different concentrations of IPTG, modifier, induction time and culture medium on the expression of formate-dehydrogenase enzyme and optimization.

Methods: Specific primers were designed to amplify the gene fragment using polymerase chain reaction (PCR). The Formate-dehydrogenase enzyme gene was inserted into the pET28b vector, and the recombinant plasmid was used to transform *E.coli*. To enhance protein expression, a Taguchi experimental design was conducted to investigate the effects of temperature, inducer concentration, and type of culture medium type on protein expression levels at two different levels.

Results: PCR results confirmed the amplification of formate-dehydrogenase enzyme gene in *E. coli* DH5 α . Induction time and concentration negatively impacted on expression. The highest level of expression of the recombinant protein was observed 24 hours post-induction at a temperature of 25°C, with an IPTG concentration of 0.1 mM in the presence of sorbitol. LB culture medium was chosen as the best expression medium.

Conclusion: This study showed that low concentrations of IPTG were sufficient for producing the recombinant protein, proving to be economical. Reducing the induction time also increased protein expression. LB medium enhanced with sorbitol was identified to be the best culture medium for inducing the expression of the formate dehydrogenase enzyme.

Keywords: Cloning, Optimization, Sorbitol, Formate-Dehydrogenase, IPTG.

Citation: Hajizadeh M.R, Jafari Kakhki A.M, Nabavinia M, Nabavinia M.S. **Cloning and Optimization of Formate Dehydrogenase Gene Expression in *E.Coli***. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2025; 33(2): 8705-17.

¹School of Pharmacy, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

²School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

³Traditional Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

⁴Student Research Committee, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09132476460, email: maryamsadatnabavinia@gmail.com