مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۲، شماره ۱، بهار ۹۱، صفحات ۳۲ تا ۳۸

Original Article

کلونینگ و بیان پروتئین فاکتور رشد جفتی-۱ انسانی (hPLGF-1) در سیستم بیانی *E.coli Rosetta*

نرگس اربابی[۱]، مهدی بهدانی[۲]، مجید گل‌کار[۳]، سید حمید آقایی بختیاری[۴]، حسین خان احمد شهرضا[۵]، رضا مهدیان[۶]

[۱] کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۳] استادیار، بخش انگل شناسی، انستیتو پاستور ایران
[۴] دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۵] استادیار، بخش BCG، انستیتو پاستور ایران
[۶] استادیار، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: *آنژیوژنزیس یا شکل‌گیری عروق خونی جدید در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک مهم‌ترین عامل رشد و تکثیر سلول‌ها است. پروتئین PLGF یا فاکتور رشد جفتی یکی از مهم‌ترین پروتئین‌ها در تحریک آنژیوژنزیس است. در این پژوهش، ژن PLGF-1 انسانی از بافت جفت جدا شده و پروتئین مورد نظر در سیستم باکتریایی بیان شد.*

روش بررسی: *دراین مطالعه تجربی، ناحیه کد کننده ژن PLGF-1 از بافت جفت انسان توسط پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. قطعه ژنی مورد نظر در پلاسمیدهای pET28a و pET32a کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-PLGF-1 و pET32a-PLGF-1 به باکتری E.coli Rosetta منتقل شدند و بیان پروتئین نوترکیب توسط IPTG القاء گردید. بیان پروتئین نوترکیب و محلولیت آن با SDS-PAGE بررسی و با روش وسترن بلاتینگ هویت آن تائید شد.*

یافته‌ها: *مراحل طراحی و ساخت سازه ژنی pET28a-PLGF-1 و pET32a-PLGF-1 با موفقیت انجام و توالی ژن PLGF-1 تأیید گردید. باکتری‌های القاء شده با IPTG پروتئین PLGF-1 را بیان کردند و توسط وسترن بلاتینگ به تایید رسید. همچنین پروتئین نوترکیب PLGF-1 تقریبا به صورت نامحلول بیان شد.*

نتیجه‌گیری: *پروتئین PLGF-1 به خوبی در سیستم بیانی RosettaE.coli بیان می‌شود و می‌توان از این پروتئین نوترکیب در تست‌های مختلف استفاده نمود.*

واژگان کلیدی: *آنژیوژنزیس، کلونینگ و بیان، فاکتور رشد جفتی -۱انسان.*

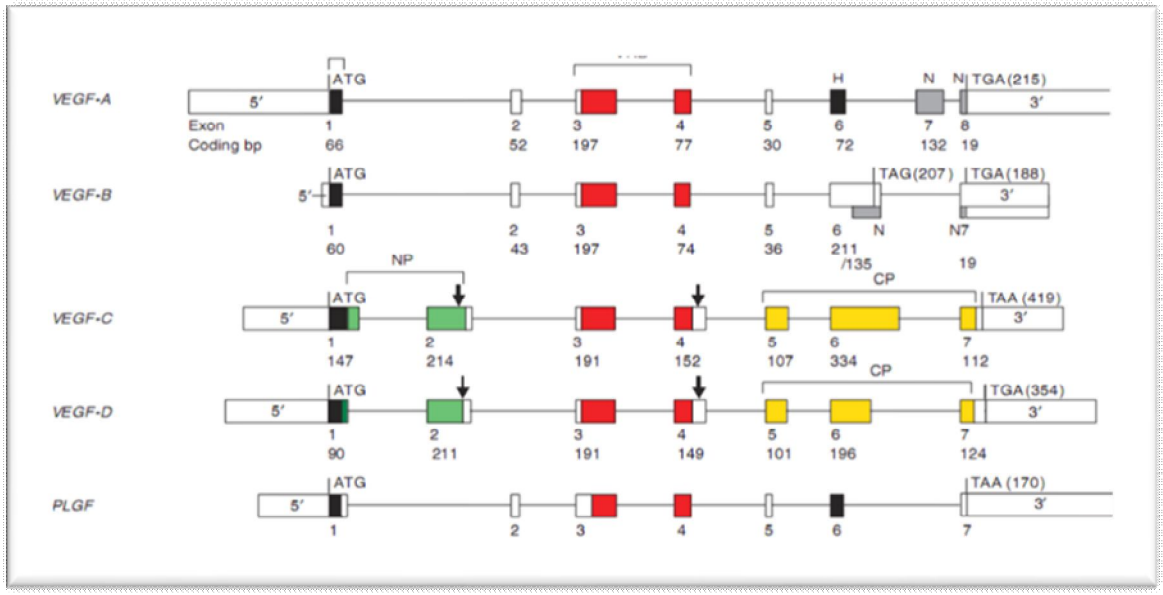
مقدمه

خانواده فاکتورهای رشد سلول های آندوتلیال عروق خونی (VEGF) شامل میتوژن‌های اختصاصی برای سلول‌های آندوتلیال عروق می‌باشد و از نظر ساختمانی با فاکتورهای رشد مشتق شده از پلاکت‌ها PDGF در ارتباط است. VEGF به عنوان فاکتور نفوذپذیر رگی نیز شناخته می‌شود، زیرا این فاکتور پتانسیل مؤثری در نفوذپذیر کردن رگ‌های خونی دارد. تا به حال ۵ عضو خانواده VEGF شامل VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی، دکتر رضا مهدیان (**email**: rezamahdian@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۲/۲۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۷/۲۵

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]



شکل ۱- ناحیه غیر قابل ترجمه (UTR): 5 ناحیه غیر قابل ترجمه (UTR): CP ناحیه کد کننده انتهای کربوکسیلی دمین پپتیدی :H کد کننده دمین متصل شونده به هپارین : NP ناحیه کد کننده انتهای آمینی دمین پپتیدی: SP سیگنال پپتید : VHD کد کننده دمین هومولوژی N: VEGF/PDGF کد کننده دمین متصل شونده به هپارین/NRP1

VEGF-D و PLGF مشخص شده است که از نظر وزن ملکولی و خصوصیات بیولوژیکی متفاوت هستند (شکل ۱) (۳-۱).

PLGF در مژه‌های ترفوبلاستی جفت و سلول‌های اندوتلیال جنینی مانند سلول‌های HUVEC (Human Umblical Vein Endothelial Cell) بیان می‌شود و طی دوران جنینی باعث تشکیل عروق خونی در بافت جفت می‌گردد (۴). PLGF در سایر بافت‌ها از جمله قلب، شش، عضله، تیروئید و بافت‌های چربی نیز شناسایی شده است. بیان PLGF در سلول‌های آندوتلیال، ترفوبلاست‌ها، منوسیت‌ها و سلول‌های اریتروئید نیز گزارش شده است. این فاکتور در تومورها به عنوان یکی از فاکتورهای رگ‌زایی قوی مطرح می‌باشد (۱). PLGF در رگ‌زایی بافت‌های طبیعی و همچنین در تومورها نقش دارد که فقدان آن باعث نقص در رگ‌زایی و رشد بافت‌ها و تومور می‌شود. فاکتور رشد جفتی در بیماری‌های التهابی، بهبود زخم‌ها و سرطان شناسایی شده است. PLGF در بیماری کاردیوواسکولار، فراخوانی مونوسیت‌ها در بیماری‌های عفونی مزمن و افزایش ضخامت درونی آترواسکلورزیس نقش دارد (۵). بیان بالای PLGF-2 باعث افزایش رشد تومور و رگ‌های حیاتی می‌شود و فقدان آن باعث آپوپتوزیس در سلول‌های رگی و ماکروفاژها می‌شود. تغییر در غلظت رایج این فاکتور باعث توسعه غیرطبیعی جفت می‌شود که در دوران بارداری در پره‌اکلامپسی مشاهده می‌شود. در افراد مبتلا به پره‌اکلامپسی، فشار خون مادری افزایش می‌یابد و در این افراد سطح سرمی PLGF مادری کاهش می‌یابد (۸-۶).

این پروتئین به نام PLGF، PGF و PGFL نیز خوانده می‌شود (۶). فاکتور رشد جفتیPLGF نوعی پروتئین N –گلیکوزیله همودایمر ۵۰-۴۶ کیلو دالتونی است و مونومرهای آن با باندهای دی سولفیدی کنار یکدیگر قرار می‌گیرند (۴). ژن کد کننده آن توسط فرآیند Alternative splicing ۴ ایزوفرم PLGF را ایجاد می‌کند. ایزوفرم‌های آن شامل PLGF-1، PLGF-2، PLGF-3 و PLGF-4هستند که به ترتیب از ۱۴۹، ۱۷۰، ۲۲۱ و ۲۴۲ اسید آمینه تشکیل شده‌اند (۹،۴). تمامی این ایزوفرم‌ها دارای یک توالی ۱۸ اسید آمینه‌ای سیگنال پپتید هستند (۱۱،۱۰).PLGF با رسپتور VEGFR-1 (flt-1) باند می‌شود (۱۰،۳).

امروزه خرید فاکتورهای رشد که به صورت نوترکیب بیان شده‌اند به عنوان یکی از بخش‌های هزینه‌بر تحقیقات در حوزه علوم سلولی می‌باشد، به طوری که پژوهش‌ها در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت کاملاً وابسته به استفاده از این فاکتورهای رشد است. فاکتور رشد جفتی انسان نیز به عنوان یک فاکتور رشد در این زمینه دارای کاربرد می‌باشد. هدف از این پژوهش، کلونینگ و بیان فاکتور رشد جفتی ۱ انسانی در سیستم بیانی *E.coli* است. بنابر این ضرورت، در این پژوهش به دنبال بیان فاکتور رشد جفتی ۱ انسان در سیستم بیانی باکتریایی جهت استفاده به عنوان یک فاکتور رشد در پژوهش های مذکور می‌باشیم. همچنین با توجه به اهمیت این پروتئین در رشد و توسعه سلول‌های توموری با در دست داشتن این پروتئین می‌توان تحقیقات بیشتری را در

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]

زمینه رشد تومورها و مهار رگ‌زایی که هدفی بزرگ در درمان سرطان است، انجام داد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، نمونه بافت جفت انسان بلافاصله پس از زایمان از یک فرد سالم گرفته شد. جهت حفظ و پایدار کردن محتوای RNA، ۱ میلی‌لیتر محلول RNA later (Qiagen) اضافه و بافت به آزمایشگاه منتقل شد. RNA تام با استفاده از کیت RNeasy (Qiagen) از بافت جفت استخراج شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با انجام ژل الکتروفورز و سنجش اسپکتروفوتومتری (Nano photometer IMpLEN) بررسی شد. جهت ساخت cDNA از آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس و کیت Quantitect استفاده شد و بررسی صحت ساخت cDNA توسط PCR با پرایمرهای GAPDH انجام شد.

تکثیر ژن PLGF-1 با یک جفت پرایمر اختصاصی که بر اساس توالی ژن PLGF موجود در پایگاه داده‌های NCBI (NC 000014.8) انجام شد، به طوری که جایگاه برش دو آنزیم محدود الاثر Bam HI و XhoI به ترتیب به انتهای ´5 پرایمرهای Forward و Reverse افزوده شد (جدول ۱).

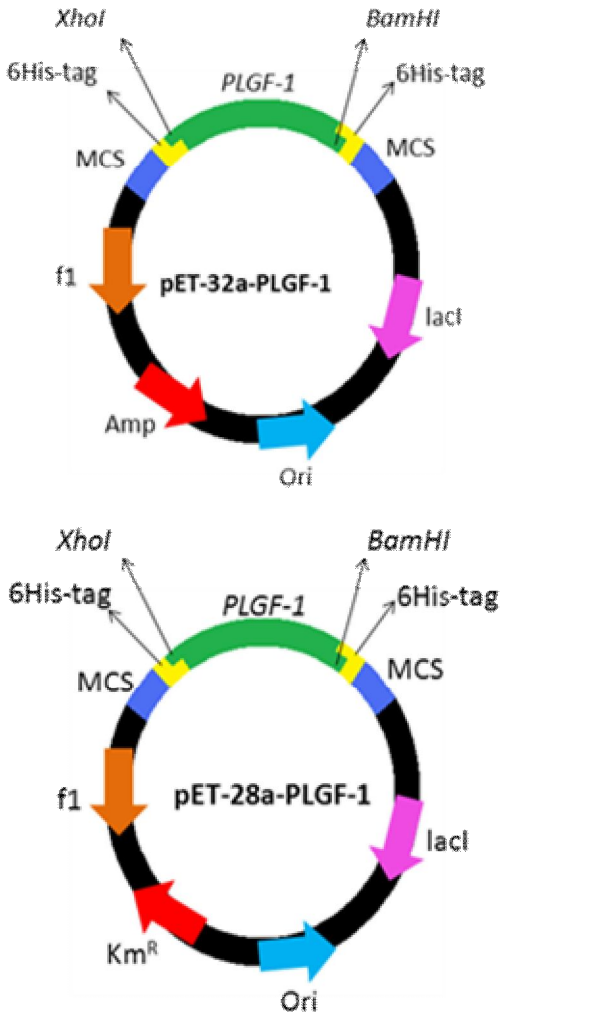
جدول ۱- توالی پرایمر های PGFH(Bam) و PGFH (Xho)

Primer Name	Sequence (5'>3')	Length
PGFH(Bam)	CGCggatccCTGCCTGCTGTGCCC CCCCAG	30bp
PGFH (Xho)	GCGctcgagCCTCCGGGGAACAG CATCGCC	30bp

برنامه‌ریزی برای چرخه‌های حرارتی PCR طبق الگو، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه برای ۴۰ سیکل تکرار گردید.

پس از تایید تکثیر قطعه مورد نظر با الکتروفورز در ژل آگارز ۲٪، استخراج محصول PCR از ژل با (Qiagen) QIAquick Gel Extraction Kit انجام شد.

پلاسمیدهای pET-32a و pET-28a و همچنین محصول PCR با آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده شد و سپس عمل لیگاسیون توسط آنزیم (Fermentas) T_4 DNA Ligase در دمای محیط به مدت ۱۲ ساعت انجام شد (شکل ۲). پس از عمل لیگاسیون، باکتری‌های *E.coli* TOP 10F' با پلاسمیدهای نوترکیب ترانسفورم شدند.



شکل ۲- نقشه پلاسمیدهای نوترکیب pET-28a-PLGF-1 و pET-32a-PLGF-1

برای تائید انتقال پلاسمیدهای نوترکیب، ابتدا با استفاده از کلنی‌های نوترکیب، Colony-PCR با همان برنامه PCR انجام شد. سپس پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده از کلنی‌های تائید شده مورد برش با آنزیم های BamHI و XhoI قرار داده شدند و سپس محصول برش آنزیمی الکتروفورز گردید و در نهایت پلاسمیدهای pET-28a-PLGF-1 و pET-32a-PLGF-1 تلخیص شده و توسط پرایمرهای T_7 promoter و T_7 terminator تعیین توالی شد. توالی مکمل این پرایمرها در دو سوی جایگاه چند گانه کلونینگ (MCS) پلاسمید قرار دارند.

جهت بیان پلاسمید نوترکیب سلول‌های مستعد *E.coli* از سویه Rosetta با پلاسمیدهای pET-28a-PLGF-1 و pET-32a-PLGF-1 ترانسفورم شدند. جهت بهینه‌سازی بیان پروتئین PLGF-1، در غلظت‌های مختلف از IPTG و شرایط مختلف القاء بررسی گردید تا بهترین شرایط برای به دست آوردن بیشترین میزان پروتئین نوترکیب تأیید شود. شرایط

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]

بهینه شامل تکثیر باکتری‌ها تا رسیدن به OD ۶۰۰ معادل ۰/۶ و القاء بیان با IPTG ۱میلی‌مولار به مدت ۵ ساعت انتخاب شد. سپس سلول‌ها با سانتریفوژ در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک دقیقه رسوب داده شده و از آنها عصاره لیز باکتریایی تهیه شد. بررسی بیان پروتئین نوترکیب PLGF-1 با الکتروفرز بر روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE انجام شد.

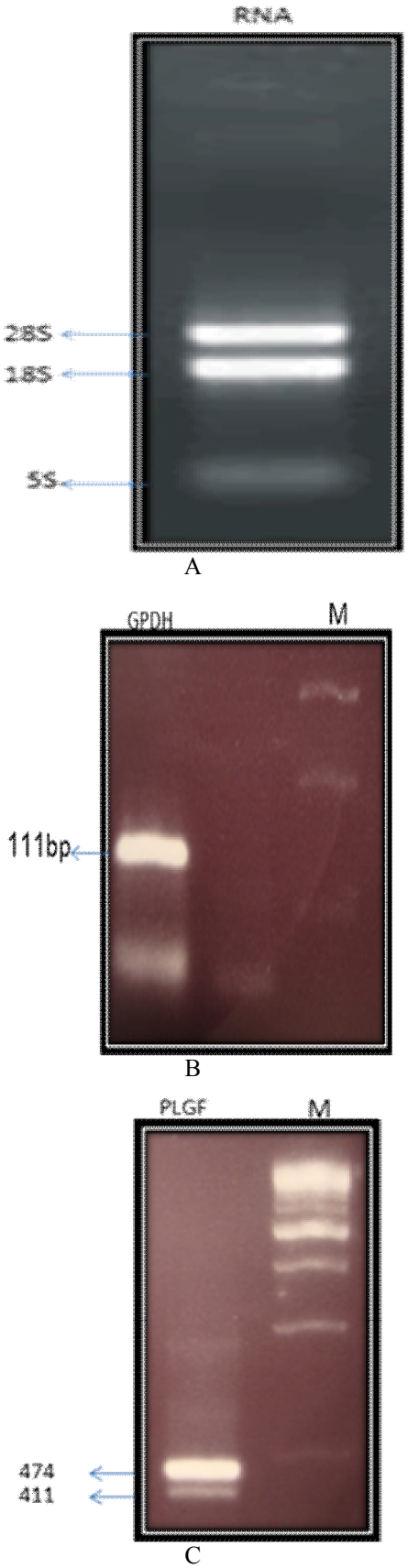
برای تأیید هویت پروتئین نوترکیب PLGF-1 با آنالیز وسترن بلاتینگ، نمونه لیز باکتریایی پس از الکتروفورز روی ژل ۱۲٪ SDS-PAGE تفکیک شده، آن گاه با روش وسترن بلاتینگ به غشاء نیتروسلولز منتقل شد. پس از انتقال، غشاء با رنگ Ponceau S رنگ‌آمیزی و از انتقال پروتئین مورد نظر اطمینان حاصل شد. سپس غشاء به ترتیب با آنتی‌بادی‌های اولیه (Anti-His Tag) و ثانویه (ضد موشی کونژوگه با HRP) انکوبه شد. بعد از انکوبه کردن غشاء با آنتی‌بادی ثانویه، جهت مشاهده باند پروتئین از سوبسترای (DAB) استفاده شد.

جهت بررسی محلولیت پروتئین نوترکیب، بیان پروتئین PLGF-1 در باکتری *E.coli Rosetta* دارای پلاسمید نوترکیب به کمک IPTG(1Mm) القاء شد و بعد از ۵ ساعت انکوباسیون رسوب آن جمع‌آوری شد. به رسوب حاصل PBS استریل اضافه کرده و به خوبی مخلوط شد. سپس باکتری‌ها با روش سونیکاسیون (آمپلیفیکاسیون ۱۰۰ و سیکل ۳/۴ برای ۱۵ سیکل ۲۰ ثانیه‌ای) لیز شدند. سپس سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی و رسوب حاصل با ژل ۱۲٪ SDS-PAGE بررسی شدند.

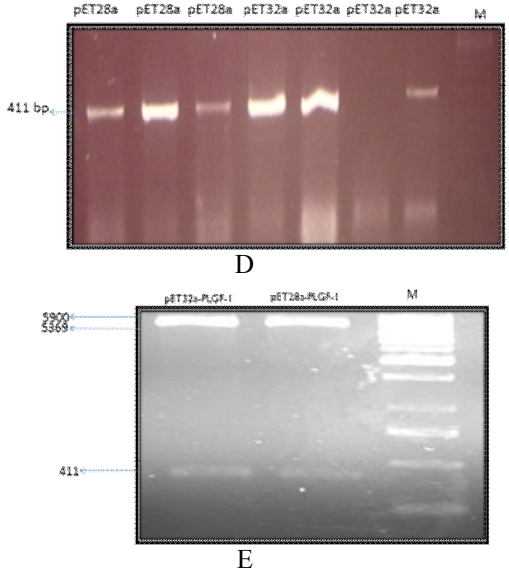
یافته‌ها

RNA تام استخراج شده از بافت جفت دارای غلظت ۵۰ نانوگرم/میکرولیترو نسبت جذب نوری برابر ۲ در ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر بود. پس از الکتروفورز RNA بر روی ژل آگارز باندهای مربوط به RNA ریبوزومی 28S و 18S مشاهده شد (شکل ۳-A). کیفیت cDNA ساخته شده، با تکثیر ژن GAPDH تایید شد (شکل ۳-B). با توجه به پرایمرهای طراحی شده، دو ایزوفرم PLGF-1 و PLGF-2 امکان تکثیر با PCR را داشتند که پس از جداسازی دو ایزوفورم با الکتروفورز، قطعه ژن PLGF-1 (۴۱۱bp) با استفاده از کیت QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen از ژل استخراج شد (شکل ۳-C).

در مورد تائید کلنی‌های نوترکیب pET-28a-PLGF-1 و pET-32a-PLGF-1، باکتری‌های *E.coli* Top 10 توسط پلاسمیدهای نوترکیب pET-28a-PLGF-1 و pET-32a-PLGF-1 ترانسفورم شدند. وجود ژن PLGF-1 در کلون‌های انتخاب شده با روش clony-PCR (شکل ۳-D)، برش آنزیمی (شکل ۳-E) و تعیین توالی تائید شد.



[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]

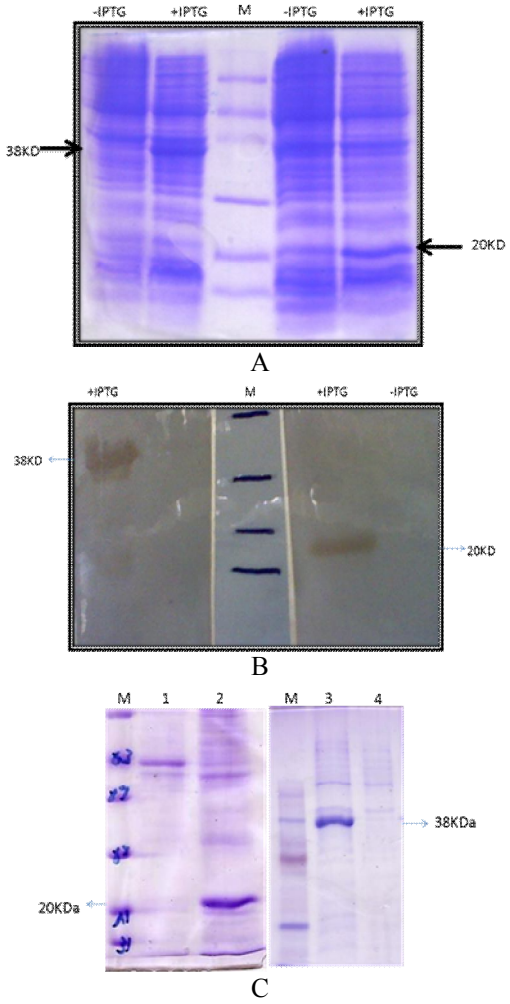


شکل ۳- A- عکس ژل الکتروفورز RNA تام استخراج شده از بافت جفت؛ **B**- عکس ژل الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای GAPDH، باند ۱۱۱bp مربوط به سنتز قطعه مورد نظر است؛ **C**- عکس ژل الکتروفورزمحصول PCR، دو ایزوفرم (411 bp)PLGF-1و (474 bp)PLGF-2 مورد نظر تکثیر شده است؛ **D**- عکس ژل Colony-PCR، باند ۴۱۱ جفت بازی وجود ژن PLGF-1 را در پلاسمید های نوترکیب pET28a-PlGF-1 در ستون های ۱، ۲ و ۳و در ستون های۴، ۵ و ۷ پلاسمید های نوترکیب pET32a-PlGF-1 ،در ستون ۶ کلنی فاقد پلاسمید های نوترکیب pET32a-PlGF-1 رانشان می‌دهد؛ **E**- برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب، با برش آنزیمی پس کلون کردن خروج قطعه ژن PLGF-1 از پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-PlGF-1 و pET32a-PlGF-1تأییدی بر کلون شدن قطعه ژن PLGF-1 در پلاسمیدها می‌باشد. ستون ۱، pET32a-PlGF-1 و ستون ۲، pET28a-PlGF-1 می‌باشد.

باکتری‌های Rosetta ترانسفورم شده با پلاسمیدهای نوترکیب pET28a-PlGF-1 و pET32a-PlGF-1 به ترتیب پروتئین‌های نوترکیبی با وزن حدود ۲۰ کیلودالتون و ۳۸ کیلودالتون را بیان کردند (شکل ۴-A). وزن این پروتئین‌ها مطابق با وزن مورد انتظار برای هر دو سازه بود. سازه نوترکیب pET32a-PlGF-1 حاوی توالی تیروکسین بود که باعث افزایش محلولیت پروتئین بیان شده و در نتیجه منجر به تولید پروتئین ۳۸ کیلو دالتونی گردید.

پس از بیان پروتئین نوترکیب PLGF-1، هویت آن توسط آنالیز وسترن بلاتینگ با آنتی‌بادی Anti-his tag بررسی شد. پس از رنگ‌آمیزی DAB، باندهای پروتئینی ۲۰ کیلودالتونی و ۳۸ کیلودالتونی متناظر با باندهای مشاهده شده در آنالیز SDS-PAGE بر روی غشاء ظاهر شدند (شکل ۴-B).

در بررسی محلولیت پروتئین PLGF-1 پس از لیز سلولی و سونیکاسیون، پروتئین‌های بیان شده با استفاده از هر دو وکتور به صورت انکلوژن بادی (نامحلول) به دست آمد (شکل ۴-C).



شکل۴- A- بیان پروتئین PLGF-1 در شرایط متعارف، ستون ۱ پلاسمید pET32a-PLGF-1 کشت شده در باکتری Rosetta در ساعت صفر قبل از القاء می باشد، ستون ۲ پلاسمید pET32a-PLGF-1 کشت شده در باکتری Rosetta در ساعت ۵ بعد از القاء می‌باشد که باند ۲۰ کیلو دالتونی مشاهده می شود، M شاخص وزنی پروتئین، ستون ۳ پلاسمید pET28a-PLGF-1 کشت شده در باکتری Rosetta در ساعت صفر قبل از القاء می‌باشد، ستون ۴ پلاسمید pET28a-PLGF-1 کشت شده در باکتری Rosetta در ساعت ۵ بعد از القاء می باشد که باند ۳۸ کیلو دالتونی مشاهده می‌شود؛ **B**- بررسی هویت PLGF-1 با روش وسترن بلاتینگ، حاصل این واکنش یک باند ۲۰ کیلو دالتونی در pET28a و ۳۸ کیلو دالتونی درpET32a نمونه های بعد از القاء بود که در نمونه های قبل از القاء مشاهده نشد؛ **C**- بررسی محلولیت پروتئین PLGF-1 ۱، سوپ رویی پس از سونیکاسیون pET28a-PLGF-1، ۲ رسوب پس از سونیکاسیون pET28a-PLGF-1، ۳ رسوب پس از سونیکاسیون pET32a-PLGF-1 ۴ سوپ رویی پس از سونیکاسیون pET32a-PLGF-1، M.۴ شاخص وزنی پروتئین.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]

بحث

با توجه به اهمیت فاکتور PLGF در رگ‌زایی پاتولوژیک در سرطان‌ها و همچنین کاربرد گسترده آنتی‌بادی‌های درمانی در کنترل پیشرفت تومور، هدف اصلی این مطالعه بهینه‌سازی بیان این پروتئین در *E.coli* و به کارگیری آن در آینده به عنوان فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال و آنتی‌ژن ایجاد کننده پاسخ ایمنی در حیوانات آزمایشگاهی بود. بر اساس مطالعات قبلی که حاکی از بیان این پروتئین در بافت جفت بود، استخراج RNA و ساخت cDNA اختصاصی ژن PLGF بر روی نمونه گرفته شده از جفت انسان با موفقیت انجام شد. اگر چه مطالعات دیگر، بیان این پروتئین در سلول‌های اندوتلیال HUVEC را نشان می‌دهد و می‌توان از این سلول‌ها جهت استخراج RNA استفاده کرد.

در این مطالعه، به منظور انتقال و بیان ژن PLGF-1 از دو پلاسمید pET32a و pET28a به عنوان وکتورهای بیانی استفاده شد. این پلاسمیدها جهت بیان بهتر پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند، پروتئین PLGF-1 بیان شده، در هر دو وکتور pET28a و pET32a کاملا به شکل نامحلول بود. Maglione و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۰ این پروتئین را در باکتری *E.coli* به شکل کاملا نامحلول گزارش کردند (۹). این موضوع می‌تواند به دلیل هیدروفوبیسیته بالا یا تشکیل ناقص باندهای دی‌سولفیدی در ساختار پروتئین باشد. این احتمال که نامحلول بودن پروتئین ممکن است مربوط به هیدروفوبیسیته آن باشد، با نرم افزارCLC GENOMIC و با توجه به توالی ژن و توالی اسیدآمینه پروتئین بررسی شد. اما میزان هیدروفوبیسیته پروتئین توجیه کننده عدم محلولیت آن نبود. مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که محلولیت پروتئین‌های حاوی چندین باند دی‌سولفید را می‌توان از طریق فیوژن با تیوردوکسین افزایش داد (۱۳،۱۲). در این مطالعه از وکتور pET32a که توالی تیوردوکسین را به پروتئین اضافه می‌کند استفاده شد، ولی بر اساس نتایج حاصل پروتئین PLGF-1 به صورت نامحلول به دست آمد. پروتئین PLGF-1 نامحلول را می‌توان به شکل denaturing تخلیص و سپس با کمک گلوتاتیون اکسید و احیا تشکیل باندهای دی‌سولفیدی و تاخوردگی مجدد پروتئین را در شرایط آزمایشگاهی القاء نمود.

همچنین در این مطالعه از باکتری *E.Coli Rosetta* به عنوان میزبان بهینه سازی شده توسط روش‌های مهندسی ژنتیک استفاده شد. یوکاریوت‌های مختلف از کدون‌های خاصی برای یک اسید آمینه مشخص بیشتر استفاده می‌کنند. به این پدیده، تمایل به یک کدون خاص گفته می‌شود. بعضی از این کدون‌ها در *E.Coli* کمتر استفاده می‌شود. لذا بیان پروتئین‌هایی که شامل تعداد زیادی از این کدون‌های نادر (Rare codon) باشند، در *E.coli* بسیار کم یا حتی غیرقابل مشاهده خواهد بود. برای حل این مشکل از سویه‌های باکتریایی حاوی پلاسمید کد کننده tRNA مربوط به این کدون‌ها استفاده می‌شود. سویه Rosetta حاوی پلاسمیدی است که tRNAهای مربوط به کدون‌های نادر موجود در یوکاریوت‌ها را کد می‌کند و می‌تواند میزبان مناسبی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب یوکاریوتی باشد (۱۴).

برای اطمینان از هویت پروتئین بیان شده، وسترن بلاتینگ انجام شد و در این بررسی با استفاده از آنتی His موشی باند پروتئینی ۲۰ کیلودالتونی در pET28a-PLGF-1 و ۳۸ کیلودالتونی در pET32a-PLGF-1 در باکتری *E.coli Rosetta* مشاهده شد. در واقع با توجه به دنباله هیستیدینی که پلاسمیدها به انتهای پروتئین اضافه می‌کنند انتظار می‌رود که پروتئین حاصل با آنتی His واکنش دهد. البته استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه PLGF می‌تواند تایید کننده نتایج فوق باشد.

در مطالعات آینده می‌توان این پروتئین نوترکیب را به حیوانات آزمایشگاهی تزریق کرده و میزان آنتی‌ژنیسیته آن را بررسی کرده و همچنین به عنوان فاکتور رشد به سلول‌های اندوتلیال کشت داده شده اضافه و عملکرد آن را بررسی کرد. همچنین می‌توان جهت تولید آنتی‌بادی مونوکلونال از آن استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از کلیه کسانی که ما را در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران درانجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev 2004; 56: 549-80.

2. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999; 13: 9-22.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]

3. De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor. Trends Cardiovasc Med 2002; 12: 241-46.

4. Athanassiades A, Lala PK. Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. Placenta 1998; 19: 465-73.

5. Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. Circulation 2005; 111: 2828-36.

6. The biochemistry and role of placental growth factor (PlGF). Available from: http://shop.perkinelmer.com/content/applicationnotes/app_biochemistryandroleofplgf.pdf

7. Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, Mooney RA, Cox C, Miller RK. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. Obstet Gynecol 2003; 101: 1266-74.

8. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. Cancer Res 2002; 62: 2749-52.

9. Maglione D, Battisti M, Tucci M. Recombinant production of PIGF-1 and its activity in animal models. Farmaco 2000; 55: 165-67.

10. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. Genome Biol 2005; 6: 209.

11. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. J Reprod Immunol 2003; 60: 53-60.

12. Kim S, Lee SB. Soluble expression of archaeal proteins in Escherichia coli by using fusion-partners". Protein Expr Purif 2008; 62: 116-19.

13. Fam HK. Subcloning emoA into pET32a(+), pET32a(+)ΔtrxA/+fre and pET32a(+)ΔtrxA to assess the relative effect of thioredoxin A and flavin oxidoreductase on emoA solubility. J Expr Microbiol Immunol 2009; 13: 114-18.

14. Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3). Protein Expr Purif 2010; 69: 159-67.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2024-03-29]