مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۷ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۴ صفحات ۹۶- ۹۱

ساب کلونینگ و بیان ژن آلفافیتو پروتئین انسانی در مخمر پیکیا پاستوریس

محمدرضا مشایخی: مربی پژوهشی ژنتیک - مرکز علوم و تحقیقات تهران _ دانشگاه آزاد تهران
دکتر نصرت اله ضرغامی: استادیار گروه بیوشیمی بالینی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط
E-mail: nzarghami@hotmail.com
دکتر دلاور شهباززاده: دانشیار گروه بیو تکنولوژی - انستیتو پاستور ایران
دکتر فرزین روحوند: استادیار گروه سلولی و مولکولی - انستیتو پاستور ایران
دکتر محمد عزیزی: مربی گروه بیو تکنولوژی - انستیتو پاستور ایران
بهرنگ علنی: مربی پژوهشی علوم سلولی و ملکولی- مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۳/۴/۲۷، باز نگری نهایی: ۸۳/۹/۱، پذیرش: ۸۳/۱۰/۲

چکیده

زمینه و اهداف: آلفافیتوپروتئین بطور طبیعی در سرم جنینی یافت می شود، در حالیکه تولید و ظاهر شدن آن بعد از تولد حاکی از وجود تومورهای سرطانی است. بنابراین با تعیین مقدار این پروتئین، در دوره های جنینی و بعد از تولد می توان عارضه های مختلف جنینی، توموری و غیرتوموری را تشخیص داد. از اینرو تولید و خالص سازی این پروتئین به روش فن آوری DNA نوترکیب به منظور تولید کیت تشخیصی حائز اهمیت بسیار می باشد.

روش بررسی: پیکیا پاستوریس مخمر متیلوتروفی است که برای تولید آلفافیتوپروتئین انسانی مورد استفاده قرار گرفت. برای تکثیر قطعه ژن مورد نظراز حامل کلونینگ pUC18 و برای بیان پروتئین از حامل دومیزبانه pHIL-S_1 استفاده گردید. بعد ازایجاد پلاسمید نوترکیب pS$_1$-AFP از روشهای الکتروپوریشن و روش شیمیایی لیتیوم کلراید برای انتقال به سلولهای مستعد سویه $^{-}$GS115- HIS استفاده گردید. برای غربالگری نیز از محیط اگزوتروفیک فاقد هیستیدین استفاده گردید. به منظور بررسی نحوه اتصال ژن مورد نظر به ژنوم مخمری و فنوتیپ های حاصله، از روش PCR استفاده شد. در راستای بیان ژنی از محیط های کشت YPG و YPM استفاده گردید و میزان کمی و کیفی تولید پروتئین مورد نظر نیز با استفاده از ژل SDS-PAGE و روش ELISA مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pS$_1$-AFP ترانسفورم شده حاکی از دریافت قطعه ۱/۷۸ Kbp ژن AFP بود که در ژل آگاروز(۱٪) بدست آمد. PCR به عمل آمده نیز وجود این قطعه را تائید کرد. انتخاب سویه های ترانسفورم شده mut^{S} در مقایسه با mut^{+} و کشت آنها در محیط گلیسرول (YPG) تا حصول کدورت OD_{600}= 6 و سپس انتقال به محیط کشت متانول (YPM) با افزودن متانول تا ۱٪ غلظت نهایی سبب حفظ القاء تولید پروتئین در محیط اگزوتروفیک فاقد هیستیدین گردید. میزان تولید این پروتئین حدود ۱۰ ug/ml بدست آمد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که قرار دادن ژن سیگنال ترشحی اسید فسفاتاز و راه انداز AOX1 در ابتدای ژن AFP برای بیان و ترشح این پروتئین مناسب می باشد. بنابراین می توان در راستای تولید آنتی بادی تک دودمانی (منو کلونال) از آن استفاده کرده و با خالص سازی آن کیت های تشخیصی آزمایشگاهی را طراحی کرد

کلید واژه ها: آلفافیتوپروتئین، پیکیا پاستوریس، کلون کردن، بیان ژنی

مقدمه

آلفافیتو پروتئین گلیکو پروتئینی است با وزن مولکولی ٦٩Kda که در روی ژل SDS- PAGE بصورت یک باند منفرد دیده می شود. این پروتئین با بارهای الکتریکی متفاوت و بر اساس میزان اتصال قند[1] و اسید چرب از کروماتوگرافی گرایشی سرم بند ناف و مایع آمنیوتیک انسانی بدست میآید. (۱) آلفا فیتو پروتئین انسانی شامل ۵۹۰ اسید آمینه می باشد و دنبالچه های[2] سه گانه این پروتئین توسط پلهای دی سولفیدی، ساختارهای لولا مانندی را ایجاد می کند که جایگاههای اختصاصی برای اتصال یافتن انواع لیگاندها را دارا می باشند(۲). آلفا فیتوپروتئین انسانی صرفاً یک جایگاه برای اتصال یافتن با ترکیبات اولیگوساکاریدی دارد که س بب ایجاد تنوع بارالکتریکی میگردد. (۳) همچنین این پروتئین سه جایگاه برای اتصال با اسید آراشیدونیک دارد که علاوه بر ایجاد تنوع بارالکتریکی سبب مهار فعالیتهای لنفوسیتی در سیستم ایمنی بدن میگردد. اسیدهای چرب برای اتصال بهAFP با سایر لیگاندها مثل پروستاگلاندین ها در رقابت بوده و نقش تنظیمی خود را در اعمال تخمدانی نیز اعمال می کند(٤).

با بررسی cDNA های بدست آمده از mRNA آلفا فیتو پروتئین انسانی، سه قسمت اصلی که شامل: ٤٤ نوکلئوتید غیر کد کننده ٥'، ۱۸۳۰ نوکلئوتید کدکننده و ۱۵۵ نوکلئوتید غیرکدکننده ٣' می باشد، از یکدیگر متمایز می شود(۵). ژنی که سبب ساخته شدن پروتئین AFP انسانی می شود در بازوی بلند کروموزوم شماره ٤ (4q11- q13) قرار

1. Glycolisation
2. Domain

داشته و حاوی ۱۵ اگزون (Kb ۲) و۱٤ اینترون (Kb ۲۰) می باشد. محققین با مقایسه نقشه های ژنتیکی آلفا فیتو پروتئین و آلبومین متوجه وجود یک خویشاوندی بین آنها شده اند و احتمال داده می شود که هر دو از یک ژن مشترک اولیه مشتق شده باشند(٦). آلفا فیتو پروتئین و آلبومین به مقدار زیادی در سلولهای کبدی جنینی ساخته می شوند و بعد از تولد تولید آن به شدت کاهش می یابد. پس بنابراین، مشاهده این پروتئین در سرم افراد بالغ می تواند نشانه‌ای برای وجود عارضه های توموری و غیر توموری باشد. افزایش غلظت AFP در سرم بیماران مبتلا به هپاتیت، التهاب کبدی، سیروز کبدی و همچنین در تومورهای سرطان کبدی، تراتوکارسینومای بیضه و تخمدان و تومورهای گوارشی بدخیم دیده شده است. (۷) افزایش و کاهش این پروتئین در دوران جنینی نیز نشانه ای از ناهنجاری های مختلف می باشد. از این رو، تغییر مقدارAFP در سرم مادران در طول دوران بارداری می تواند به دلیل عوارض جنینی (از قبیل تریزومی های ۲۱، ۱۸، ۱۳ ـ آنانسفالی) و یا مشکلات حاملگی (از قبیل زایمان زودرس، پاره شدن جفت، خونریزی رحمی) و دلایل دیگری از قبیل دیابت قندی مادر، وزن مادر وکشیدن سیگار و غیره باشد(۸).

وجود آلفافیتوپروتئین در سرم بیمارانی با بدخیمی های مختلف، محققان را بر آن داشت تا در صدد تکمیل و بهینه سازی روشها مختلف تولید آنتی بادی پروتئین مورد نظر باشند. این امرباعث شده است، علاوه بر تشخیص این پروتئین در سرم افراد بیمار، با تعیین مقادیر کمی از آن، یک شاخص توموری به عنوان ضریب فعالیت توموری بدست بیآید. در این راستا، استفاده از روشهای فنآوریDNA نوترکیب برای تولیدآلفافیتوپروتئین انسانی در سال ۱۹۸۹ توسط Giuliani در پروکاریوتها آغاز گردید(۹). اما به لحاظ وجوداشکالاتی درسیستم های ابرازی پروکاریوتی (از قبیل عدم تولید ساختارکامل پروتئین AFP ـ تولید ترکیبات سمی از دیواره سلولی باکتری[1] ـ نامحلول بودن ترکیبات تولید شده[2] و غیره)، امروزه از سیستم های ابرازی یوکاریوتی استفاده می گردد. از جمله یوکاریوتهای که به طور وسیع برای تولید پرو تئینهای خارجی همانند AFP استفاده گردیده است، مخمرها هستند. از مزایای بکارگیری مخمرها، دست ورزی[3] ژنی آسان رشد در محیط های کشت ساده، ایجاد تغییرات بعد از ترجمه (اتصال قند به پروتئین، تشکیل پلهای دی سولفیدی، فولدینگ پروتئینی، مراحل پروتئولیتیکی) می باشد(۱۰). مخمرهای متیلوتروف از قبیل پیکیا پاستوریس نسبت به سایر مخمرها مزایای مختلفی را دارا می باشند که عبارتند از: استفاده از پروموتورهای قوی از قبیل الکل اکسید از ۱ (AOX1) که قابلیت تنظیمی و القائی بالایی دارند، تولید پروتئین های نوترکیب داخل سلولی و ترشحی با مقادیر بالا حتی تا ۱۲ گرم در لیتر، توانایی رشد در شرایط هوازی در فرمانتورهای مخمری باغلظت بالای سلولی، قابلیت پایداری و نگهداری پلاسمیدهای ابرازی داخل شده در جایگاههای ویژه ژنومی در حالت های یک نسخه ای و چند نسخه ای، جلو گیری از هیپرگلیکوزیلیشن به خاطر فقدان اتصالات گلیکانی(۱ـ۳) α (۱۱و۱۲).

مواد و روش ها

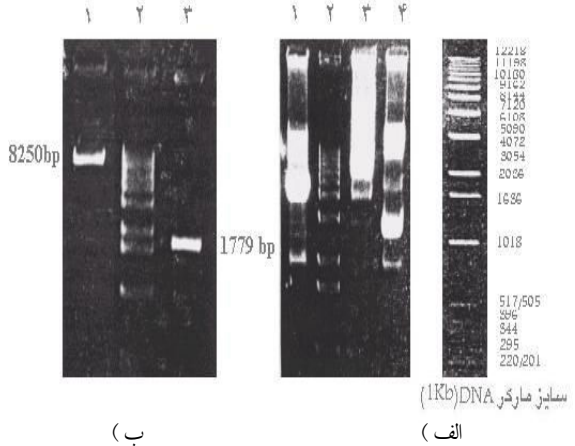
قطعه آماده شده cDNA ژن آلفا فیتو پروتئین انسانی که از mRNA سلولهای کبدی جنین انسانی توسط Shinzo Nishi (دانشکده پزشکی دانشگاه هوکایدو) حاصل شده ودر پلاسمید pNWO33 ساب کلون گردیده بود به ما اهدا گردید. قطعه ۱/۷۸ KbpژنAFP توسط پرایمرهای[4] F-AFP (GCCGGAATTCACACTGCATAGAAATGAATATGG) و[5] R-AFP (CGCGCCTAGGAATTTGAGGGTTTCGTCGTGCTC) که به ترتیب دارای جایگاههای آنزیمیEcoRI وBamHI (طراحی شده در بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران) بودند، توسط تکنیک PCR[6] وبا استفاده از DNA پلیمراز Taq (Stratagene.La Jolla,CA)تکثیر یافت. در این مطالعه نیز برای ساب کلون کردن ژن AFP ، ابتدا آنرا به همراه پلاسمید (۲/٦۹ Kbp) pUC18 در جایگاههای آنزیمی مزبور برش داده و بعد از اتصال، پلاسمید نوترکیب pUC-AFP حاصله را تحت شوک حرارتی ٤۲ درجه سانتی گراد و کلرید کلسیم به مدت ۹۰ ثانیه در سویه JM109باکتری E.coli (Invitrogen,Carlsbad ,CA) ترانسفورم گردیده و سویه باکتریای در محیط LB[7] آگار به همراه آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ µg ml) کشت داده شد. برای استخراج و خالص سازی پلاسمید های ساب کلون شده از روش Alkaline در حضور (۱٪) SDS، (۰/۰۲ N) NaOH ، سدیم استات (۳ M) استفاده گردید. (۱۳) بعد از ساب کلون کردن ژن AFP ، ابتدا آنرا توسط آنزیم های محدودالاثر برش داده و بعد از الکتروفورز، از ژل آگاروز استخراج کرده وسپس در حامل دو میزبانه ابرازی pHIL - S1 وارد گردید و نام پلاسمید نو ترکیب pS1 - AFP نامیده شد. برای ترانسفورم کردن ژن مورد نظر در سویه های GS115 مخمر پیکیا پاستوریس، آنها را در محیطهای کشت اگزوتروفیک فاقد هیستیدین (His^-) YPD[8] (عصاره مخمری ۱٪) (w/v) و پپتون ۲٪(w/v) ودکستروز ۱٪) و[9] MD (YNB[10] (۱/۳٤٪) و بیوتین (۱۰٪ × ٤) و دکستروز ۱٪) غربال گردید. پلاسمید نوترکیب حلقوی توسط آنزیم Bgl II برش داده و از دو قطعه خطی شده ، ژن مورد نظر از ژل آگاروز جداسازی شده و با استفاده از محیط های کشت مذکور و روش شیمیایی لیتیوم کلراید (بافر TE که حاوی Tris-Hcl ۱۰ میلی مولار (PH = 7.4) و[11] EDTA یک میلی مولار (PH = 8) ولیتیوم کلراید (۱۰Mm) و پلی اتیلن گلیکول ٤۰٪) وهمچنین الکتروپوریشن (سوربیتول ۱ M) در سویه های GS115/ HIS^- ترانسفورم گردید. (۱٤) ترانسفورمانت ها پس از ۳-۲ روز که در دمای ۳۰ درجه قرار گرفتند، بر اساس سرعت رشد به دو صورت $His^+ Mut^+$ و $His^+ Mut^S$ در محیط کشت اگزوتروفیک فاقد هیستیدین از یکدیگر تفکیک شدند. DNA کروموزومی آنها را استخراج نموده و پس از تائید دخول ژن AFP در ژنوم مخمری با استفاده از PCR (۱۵)، ترانسفورمانت های تائید شده جهت عادت دادن و سپس القاء به منظور تولید پروتئین AFP در محیط بافری حاوی حداقل گلیسرول ۱٪ (YPG[12]) تلقیح کرده و سپس در انکوباتور ۳۰ درجه همراه با تکانه شدید (Shaker) تا زمان رسیدن

1. Pyrogenic
2. Inclusion badies
3. Manipulation
4. Forward – AFP
5. Reverse - AFP
6. Polymerase Chain Reaction
7. Luria Bertain Broth
8. Yeast extract Pepton Dextrose
9. Minimal Dextrose
10. Yeast Nitrogen Base
11. Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
12. Yeast extract Pepton Glycerol

کدورت آن به حد OD_{600}= 6 قرار داده شد. سلول ها به منظور القاء بیان پروتئین در محیط بافری حاوی حداقل متانول ۰/۵٪ (YPM) انتقال داده و به مدت یک هفته در شرایط فوق الذکر قرار داده شد. در هر روز برای حفظ شرایط القا به میزان ۱٪ حجم نهایی متانول اضافه گردید. سرانجام مایع رویی و سلولها بواسطه سانتریفوژ از همدیگر جدا شده و با استفاده از ژل SDS-PAGE (۱۲ ٪) کلونی های بیان کننده ژن AFP در مقایسه با سوپ سلولی سویه ترانسفورم نشده (کنترل منفی) و پروتئین خالص شده AFP بدست امده از S. cervisiae (کنترل مثبت) در محیط های کشت MD و MM [1] (YNB ۱/۳٤ ٪) و آگار و متانول ۰/۵ ٪) غربال گردید. در نهایت برای تائید و تعیین میزان پروتئین تولید شده در داخل و خارج سلول در زمانهای مختلف از روش ELISA استفاده گردیده و منحنی استاندارد نمونه های القا شده نیز تعیین گردید.

یافته ها

قطعه ژنAFP که دارای جایگاههای آنزیمی EcoRIوBamHI بود در ناحیه آنزیمی (PCS) پلاسمید کلونینگ PUC18 وارد گردید. بعد از ترانسفورم کردن در سلول های مستعد باکتریای JM109 در محیط اختصاصی (AMP + LB) قرار داده و تعداد زیادی کلنی تکثیر یافته بعنوان کنترل مثبت حاصل گردید. سپس با استفاده از روش Alkaline پلاسمید های نوترگیب pUC-AFP در سطح مقادیر کم از سلولهای ترانسفورم شده خالص سازی گردید. جهت حصول اطمینان از پلاسمیدهای خالص شده از برش دو آنزیمی (EcoRIوBamHI) استفاده گردیده و در روی ژل آگاروز قطعات ۱۷۷۹bp و ۲٦٦۵bp تشخیص داده شد. (شکل ۱_ الف) بعد از اطمینان از وجود پلاسمید های خالص شده pUC-AFP و pHIL - S1 ، کلنی های حاوی این پلاسمید ها را در سطح مقادیرزیاد (Large Scale) در محیط LB کشت داده و سپس قطعات ژن AFP از پلاسمید pUC-AFP برش داده شده و با استفاده از الکتروفورز در LMP و روش ذوب و انجماد قطعه ژن AFP خالص شده به دست آمد. پلاسمید ابرازی pHIL - S1 نیز تو سط آنزیم های فوق برش داده و قطعه خطی شده پلاسمید به همراه AFP خالص شده در ژل آگاروز (۱٪) رؤیت گردید. (شکل ۱ _ ب) سپس با استفاده از T_4DNA Ligase پلاسمید نوترکیب AFP– PS1 حاصل گردید. جهت ازدیاد پلاسمید های pS1–AFP، ابتدا آنها را در سویه های JM109 با استفاده از شوک حرارتی ترانسفورم کرده و سپس در محیط کشت (AMP + LB) تکثیر گردید. اما قبل از ترانسفورم کردن در سلول های مخمری، به منظور تولید پروتئین مورد نظر، آنالیزی توسط آنزیم های Pvu II , EcoR I , BamH I و با استفاده از روش (Restriction Mapping) به عمل آمد . برای ایجاد یک نوترکیبی پایدار از نواحی مشابه مابین پلاسمیدpS1-AFP و ژنوم مخمری استفاده گردید. برای این منظور پلاسمید فوق الذکررا با آنزیم Bgl II برش داده و دو قطعه بدست آمد که یک قطعه ۲۸۷۰ bp آن که شامل(f_1 ori , Amp^r) بوده و قطعه برش یافته دیگر به اندازه ۷۱۹۰ bp، قطعه ژن AFP رابه همراه (5′AOX1 , HIS4 , 3′AOX1) دارا خواهد بود. (شکل ۲_ الف) بنابراین قطعه بزرگتر از ژل جدا کرده وبا استفاده از روشهای انتقال در سویه $^-$ GS115/ HIS ترانسفورم گردید. با استفاده از روش لیتیوم کلراید ۵ کلنی و با استفاده از روش ترانسپوریشن ۱۰۰ کلنی به دست آمد. دو سویه نو ترکیب His^+Mut^+ و His^+Mut^s بر اساس ورود قطعه بزرگتر پلاسمید خطی شده در محل AOX1 ژنوم مخمری ایجاد گردید . از کلنی های انتخاب شده، تعداد کمی از آنها از نوع فنوتیپHis^+Mut^s تشخیص داده شد (جدول ۱). طبق غربال گری به عمل آمده توسط محیط های کشت YPD ، MD ، MM ردیف های ۱۱،۳، ۲۵ براساس کنترل های رشد موتانت ها از نوع Mut^s تشخیص داده شده وبقیه کلنی های انتخاب شده از نوع Mut^+ تشخیص داده شد. جهت بررسی دقیق تر نحوه اتصال قطعه ژن AFP در ژنوم مخمری و غربال کردن سویه هایHis^+Mut^s ، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 5′AOX1, 3′AOX1 عمل PCR صورت گرفته و سپس قطعات حاصله، با استفاده از استاندارد Mut^s (یعنی GS115/ Albumin) در روی ژل آگاروز (۰/۸٪) مشخص گردید. (شکل۲_ ب) بر اساس استفاده از پلاسمید pHIL - S1 و سیگنال ترشحی اسید فسفاتاز قبل از ژن AFP ، در ژنوم مخمری انتظار می رفت که پروتئین تولید شده از نوع ترشحی باشد ، بنابراین بعد از القاء با متانول در زمانهای ۰ ، ۲٤ ، ٤۸ ، ۷۲ ، ۹٦ ، ۱۲۰ ساعت نمونه برداری به عمل آمده و پلیت های سلولی از سوپ سلولی جدا گردید .سوپهای سلولی زمانهای بعد از القاء سانتریفوژ شده و در ژل SDS - PAGE (۱۲٪) الکتروفورز کرده و توسط کوماسی بلو رنگ آمیزی گردید. (شکل ۳) قطعه ٦۹Kd در ردیف ۳ مبین تولید این پروتئین بصورت ترشحی می باشد .به منظور ارزیابی مقدار AFP تولید شده در سلول های مخمری از روش ELISA استفاده کرده و بر اساس میزان جذب نوری پرو تئین های استاندارد رقیق شده (۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/٤۰، ۱/۸۰، ۱/۱٦۰)، مقدار پروتئین AFP شده در داخل و خارج سلولی اندازه گیری گردید. که به ترتیب مقدار پروتئین ترشحی ۱۰ µg/ml و مقدار پروتئین داخل سلولی تولید شده µg/ml ۲ تعیین گردید .



شکل ۱: نمونه های پلاسمید pUC ـ AFP و pHIL - S1 (برش داده شده با آنزیم EcoR I و BamH I) و قطعه AFP خالص شده از LMP بر روی ژل آگاروز (۱ ٪)

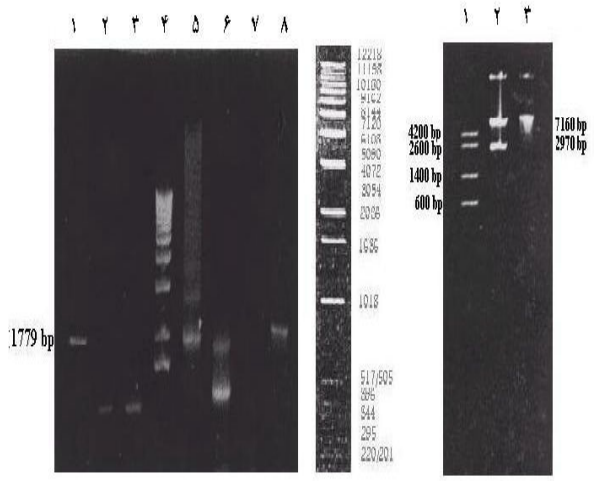
2. Minimal Methanol

الف)

۱ – پلاسمید pUC - AFP (برش داده شده با آنزیم EcoR I و BamH I)
۲ – سایز مارکر DNA (۱ Kb) ۳ – پلاسمید pHIL - S1 (قبل از برش آنزیمی) ٤ – پلاسمید pUC - AFP (قبل از برش آنزیمی)

ب)

۱ – پلاسمید pHIL - S1 (برش داده شده با آنزیم EcoR I و BamH I)
۲ – سایز مارکر DNA (۱Kb) ۳ – قطعه AFP (برش داده شده با آنزیم EcoR I و BamH I)



الف) ب)

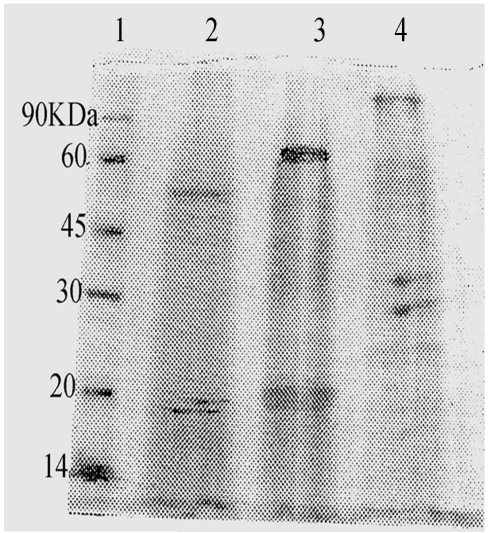
شکل ۲: تصاویر مربوط به خطی کردن پلاسمید pS1 –AFP توسط آنزیم Bgl II و آنالیز PCR قطعه ژن AFPوارد شده به ژنوم مخمری

الف)

۱ – DNA مارکر ۲ – پلاسمید PS1 –AFP (برش داده شده با Bgl II)
۳ – پلاسمید PS1 –AFP (قبل از برش آنزیمی)

ب)

۱ – DNA ژنومی ترانسفورم شده با پلاسمید خطی شده PS1 –AFP (GS115/ $His^{+}Mut^{S}$) ۲ – DNA ژنومی ترانسفورم شده با پلاسمید خطی شده PS1 –AFP (GS115/ $His^{+}Mut^{+}$) ۳ – DNA ژنومی مخمر (His^{-} / GS115) ٤ – DNA مارکر (۱Kb) ٥ – پلاسمید کنترل مثبت (AFP–PS1) ٦ – پلاسمید کنترل منفی (pHIL-S1) ۷ – کنترل مثبتβ - gal ۸ – کنترل منفی Albumin



شکل ۳: ارزیابی ابراز پروتئین AFP در مخمر با استفاده ازژل SDS - PAGE (۱۲٪) و رنگ آمیزی با کماسی بلو و تخمین وزن مولکولی پروتئین AFP بعد از القاء با متا نول.

نمونه ۱ : سایز مارکر (KDa) نمونه ۲ : سوپ سلولی قبل از القاء نمونه ۳ : سوپ سلولی بعد از القاء با متانول نمونه ٤ : سوپ سلولی سویه ترانسفورم نشده

جدول۱: غربال کردن سویه های نو ترکیب ترانسفورم شده Muts و +Mut درسه محیط کشتYPD ، MD، MM

شماره کلنی های ترانسفورم شده	YPD	MD	MM	شماره کلنی های ترانسفورم شده	YPD	MD	MM
۱	++	++	++	۱۷	+++	+++	++
۲	+++	++	++	۱۸	++	++	++
۳	++	++	_	۱۹	++	++	++
٤	++	+++	++	۲۰	++	++	++
٥	++	++	+	۲۱	+++	+++	+++
٦	+++	+++	++	۲۲	++	++	++
۷	+++	++	++	۲۳	++	++	++
۸	_	_	_	۲٤	+++	+++	++
۹	+++	+++	+++	۲٥	++	++	_
۱۰	++	++	+	۲٦	++	++	++
۱۱	+++	++	_	۲۷	+++	+++	++
۱۲	+++	++	++	۲۸	+++	+++	++
۱۳	++	+++	++	۲۹	+++	++	+++
۱٤	++	++	++	۳۰	++	++	++
۱٥	++	++	++	Control Mut^{S}	+++	+++	_
۱٦	++	++	++	Control Mut+	+++	+++	+++

نکته : هرچه تعداد علامت های مثبت بیشتر باشد نشان دهنده رشد بالای کلنی های ترانسفورم شده می باشد و علامت منفی نشان دهنده عدم رشد و یا رشد خیلی جزئی کلنی کشت داده شده می باشد .

بحث

از آنجائیکه تغییرات این پروتئین در سرم جنینی و سرم خون افراد بالغ ، با استفاده از تشخیص های سرو لوژیکی قابل بررسی می باشد، تولید آنتی بادی اختصاصی این پروتئین در راستای تشخیص انواع ناهنجاریهای دوران جنینی و ناهنجاریهای توموری و غیر توموری افراد بالغ حائز اهمیت بسیاری است. لذا برای تولید این آنتی بادی، ابتدا از مدل های حیوانی مثل خرگوش استفاده گردید. اما به لحاظ وجود مشکلات عدیده ای، کنار گذاشته شده و روشهای نوترکیبی DNA جایگزین آنها گردید.

در اولین گام برای تولید پروتئین AFP بصورت نوترکیب از سیستم های پروکاریوتی مثل E.coli استفاده گردید (۱۶). ولیکن به خاطر اینکه پروتئین مورد نظر مختص سیستم های یوکاریوتی (پستانداران) بوده و اختصاصات این سیستم را دارا می باشد، پروتئینهای تولید شده کارایی لازم را نداشتند. بنابراین در ادامه از سیستم های یوکاریوتی ساده مثل مخمر برای تولید این استفاده گردید (۱۷). دراین راستا در انستیتو پاستور ایران برای تولید این پروتئین، ژن AFP را تحت پروموتور فسفو گلیسرات کیناز در مخمر S.cerevisiae قرار داده وبه ازای ml ۱ از محیط کشت µg۱ از پروتئین نوترکیب فوق بدست آمد که از لحاظ رفتار و خواص مشابه پروتئین انسانی بود . (۱۸)

در ادامه برای افزایش تولید AFP و پایداری بیشتر آن در سیستم مخمری از مخمرمتیلوتروف پیکیا پاستوریس استفاده گردید. لذا بعد از حصول ژن خالص شده AFP ، آنرا تحت تاثیر پروموتور الکل اکسیداز AOX1 و سیگنال ترشحی اسید فسفاتاز (PHO1) در حامل ابرازی pHIL - S1 وارد گردید. این حامل برخلاف حامل های اپی زومالی شکل پایدارتری را داشته و در عوض فرکانس دخول ژنی پائینی را دارا می باشد. برای ترانسفورم کردن این حامل در سلولهای مستعد از روشهای شیمیایی لیتیوم کلراید (با فرکانس μg 10^2 و دخول یک نسخه ای) و الکتروپوریشن (با فرکانسμg 10^5 و دخول یک نسخه ای) بصورت موازی استفاده شده و به میزان زیادی سلولهای ترانسفورمانت حاصل گردید(۱۹).

بعد از ترانسفورماسیون حاملهای الحاقی[1] به داخل سلولهای میزبان، اتصال بین ژن و ژنوم مخمری بصورت جایگزینی ژنی و دخول ژنی صورت می گیرد. جایگزینی ژنی نسبت به دخول ژنی به میزان کمتری رخ میدهد ولیکن ترانسفورمانت های پایدارتری نسبت به دخول ژنی ایجاد می کند(۲۰). جایگزینی ژنی ممکن آست از طریق جایگاههایHIS4 ویا AOX1 صورت بگیرد . پس بنابراین برای جایگزینی در هر یک از جایگاههای فوق، باید قبل از ترانسفورماسیون، پلاسمید ها، به ترتیب توسط آنزیم های Sal I ویا Bgl II برش داده شود. اگر از آنزیم Sal I استفاده شود، ژنHIS4 بصورت دوتائی درآمده و صرفاً فنوتیپ His^+Mut^+ تولید میگردد ، از اینرو زیاد توصیه نمی شود. بنابراین در مطالعه اخیر با استفاده از Bgl II و خطی کردن پلاسمید ، هر دو نوع فنوتیپ His^+Mut^sو His^+Mut^+ بدست آمد. اما از آنجائیکه فنوتیپ Mut^s درمقایسه با Mut^+ میزان متانول کمتری رامصرف کرده و در عوض زمان القاء طولانی تری را دارد، برای بیان پروتئینAFP مناسب تر تشخیص داده شد و با اتصال قطعه پلاسمید خطی شده در جایگاه AOX1 ژن دیگر تولید کننده الکل اکسیداز (AOX2) که نسبت به AOX1 فعالیت کمتری دارد، شروع به فعالیت کرده و فنوتیپ Mut^s ایجاد شده می تواند به مقدار جزئی در محیط حداقل متانول به رشد خود ادامه دهد. بعد از غربال گری و مقایسه رشد ترانسفورمانت ها در محیط گلوکز از تمامی کلنی ها نمونه برداری شده و با استفاده از PCR ، نحوه اتصال و نوع فنوتیپ ها مشخص میگردد. با انتخاب فنوتیپ His^+Mut^s ، آنرا در محیط گلیسرول ۲ درصد به همرا ه متانول ۱ درصد به طور همزمان کشت داده و تولید پروتئین مربوطه را افزایش میدهند و به تدریج با کاهش درصد کلیسرول و افزایش درصد متانول تا ۱ درصد حجم نهایی القاء تولید پروتئین را تداوم می بخشند. (۲۱) در این مطالعه برای ابراز پروتئین از گلوکز ۲درصد و متانول ۱درصد استفاده گردید. البته برای بهینه سازی تولید پروتئین از منبع گلیسرول نیز استفاده گردید ، زیرا گلوکز عامل مهاری برای رونویسی ژن مربوطه بوده و در امر القاء متانول اشکال ایجاد می کند در حالیکه بکارگیری همزمان دو منبع کربن (متانول و کلیسرول) اختلالی در ابراز ژن AFP ایجاد نمی کند (۲۲). با توجه به اینکه سیگنال ترشحی PHO1 قبل از ژن مورد نظر طراحی شده بود، انتظار می رفت که پروتئین ها ی ترشحی بیشتر از پروتئینهای داخل سلولی در فضای پری پلاسمی باشد، که توسط تست ELISA و ژل SDS – PAGE این موضوع تائید گردید.

در انتها توصیه می شود در مطالعات بعدی برای افزایش تولید این پروتئین از قالب های ابرازی بیشتری در مخمر پیکیا پاستوریس استفاده شده و از سیگناهای ترشحی و پروموتورهای از قبیلPEG8 وGAP با کارایی های بالاتر استفاده گردد(۲۳ و ۲٤). از کلنی های Mut^+ نیز برای افزایش پروتئین در دستگاه فرمانتوری استفاده شده و در سیستم خالص سازی پروتئین نیز تغییراتی داده شود، همچنین مطالعاتی در ارتباط با فعالیت ضد سرطانی این پروتئین بر اساس تغییر در جایگاه اتصال استروژن در AFP نوترکیب به عمل آید.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از مساعدتهای آقای دکتر سیروس زینلی رئیس بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و از کلیه اساتید دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران و همکاران، کمال تشکر و قدردانی را دارد.

1. Integrative

References

1. Young JL, Webb BA. Two methods for the separation of human alfa- fetoprotein and albumin. (A) Affinity chromatography using Blue Sepharose CL-6B and (B) ampholyte displacement chromatography. *Anal Bio chem* 1978; **88**, 619-623
2. Arron R, Teichner E, Bustin M, Sela M. Preparation of antisera to alpha-fetoprotein making use of estradiol affinity column. *FEBS Lett*. 1973 Jun 1; **32**(2): 335-8.
3. Tosuchida Y, Yamashita K, Kobata A, Nishi S, Endo Y, Satio S. Structure of the sugar chain of alfa- fetoprotein purifie fromm a human yolk sac tumor and its reactivity with concanavalin A. *Tumor Biol* 1984; **5**, 33 -40
4. Aussel C, Masseyeff R. Interaction of retinoids and bilirubin with the binding of arachidonic acid to human alpha-fetoprotein. . Biochem Biophys . *Res Commun*. 1984; **119**, 1122 –1127
5. K Sawadaishi, T Morinaga, and T Tamaoki. Interaction of a hepatoma-specific nuclear factor with transcription-regulatory sequences of the human alpha-fetoprotein and albumin genes. Proc. *Natl Acad Sci*. 1981; **78**, 243 – 246
6. T D Sargent, M Yang, and J Bonner. Nucleotide sequence of cloned rat serum albumin messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 January; **78** (1): 243–246
7. Black CT, Luck SR, Musemeche CA, Andrassy RJ. Aggressive excision of pulmonary metastases is warranted in the management of childhood hepatic tumors. *J Pediatr Surg*. 1991; **26**(9): 1082-5; discussion 1085-6.
8. Qin LX, Ma ZC, Wu ZQ, Fan J, Zhou XD, Sun HC, Ye QH, Wang L, Tang ZY. Diagnosis and surgical treatments of hepatocellular carcinoma with tumor thrombosis in bile duct: Experience of 34 patients. *World J Gastroenterol*. 2004 May 15; **10**(10): 1397-401.
9. Giuliani MM, Ricci S, Ratti G, Pacci P, Mariano G. Molorni A, Caccarini C, Terrena B, Tecce MF. Synthesis and characterization of a recombinant fragment of human alpha-fetoprotein with antigenic selectivity versus albumin. *Protein Eng.* 1989; **2**(8):605-10
10. Eckart MR, Bussineau CM. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curropin Biotechnal*. 1996 Oct; 7(5), 625 – 630
11. Han Y, Lei XG. Role of glycosylation in the functional expression of an Aspergillus niger phytase (phyA) in Pichia pastoris. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Apr 1; **364**(1): 83-90.
12. Higgins DR, Cregg JM (Eds), Introduction to Pichia pastoris. *Methods Mol Biol*. 1998; **103**: 1-15.
13. Clemson M, Kelly WJ. Optimizing alkaline lysis for DNA plasmid recovery. *Biotechnol Appl Biochem*. 2003; **37**(Pt 3): 235-44
14. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of Pichia pastoris pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*. 2004; **36**(1): 152-4.
15. Asim K, Bej Meena H, Mahbbubani, Ronald M. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction and methods and their Application. *Crritical Reviews in Biochemistry and Mlecular Biology*. 1991; **26** (3.4): 304 –334
16. Nishi S, Koyama Y, Sakamoto T, Soda M, Kairiyama CB. Expression of rat alpha-fetoprotein cDNA in Escherichia coli and in yeast. *J Biochem (Tokyo)*. 1988; **104**(6): 968-72.
17. Yamamoto R, Sakamoto T, Nishi S, Sakai M, Morinaga T. Expression of human alpha – fetoprotein in yeast. *Life. sci*. 1990; **46** (23), 1676 – 86
18. Shahbazzadeh D, Estrogen binding activities of recombinant alpha-fetoproteins expressed in yeast. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 1995; **70** (3), 473 – 483
19. Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. Pichia pastoris as a host system for transformations. *Mol Cell Biol*. 1985 Dec; **5**(12): 3376-85.
20. Nett JH, Gerngross TU. Cloning and disruption of the PpURA5 gene and construction of a set of integration vectors for the stable genetic modification of Pichia pastoris. *Yeast*. 2003 Nov; **20**(15): 1279-90.
21. J M Cregg, K R Madden, K J Barringer, G P Thill, and C A Stillman. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast Pichia pastoris. *Mol Cell Biol*. 1989 March; **9**(3): 1316–1323
22. Hans R. Waterham, Kimberly A. Russell, Yne de Vries, and James M. Cregg. Peroxisomal Targeting, Import, and Assembly of Alcohol Oxidase in Pichia pastoris. *J. Cell Biol*. 1997; 139(6): 15, 1997 1419-1431
23. Monique A. Johnsona, Hans R. Waterham1 A, Galyna P. Ksheminskab, Liubov R.Fayurab, Joan Lin Cereghinoa, Oleh V. Stasyka, Marten Veenhuisc, Aleksander R.Kulachkovskyb, Andrei A. Sibirnyb, and James M. Cregga. Positive Selection of Novel Peroxisome Biogenesis-Defective Mutants of the Yeast Pichia pastoris. *Genetics*. 1999; Vol. **151**, 1379-1391
24. Geoffrey P Lin Cereghino, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protin production and genetic analysis. *Current Opinion In Biotechnology*. 1999; **10**, 422 – 427