خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۸ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۰ (۲۷۸-۲۶۹)

مقاله پژوهشی

بیان فاکتور سلول بنیادی نوترکیب متصل به زیپ‌لوسین

فاطمه تقی خانی[۱]، مهشید محمدی‌پور[۲]، کامران موسوی حسینی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

فاکتور سلول بنیادی، یک سیتوکاین خونی است که از طریق تأثیر بر روی سلول‌های خونساز در تمایز سلول‌های پیش‌ساز خونی، بقا، تکثیر و تمایز ماست‌سل و هم‌چنین افزایش تکثیر و تهاجم سلول‌های توموری نقش ایفا می‌کند. زیپ لوسین به صورت نوترکیب یا طبیعی با تشکیل همودایمر در ساختار خود، باعث همو و یا هترو دایمریزاسیون انواع بسیاری از پروتئین‌های متصل به خود شده و می‌تواند اثری مطلوب در عملکرد یا پایداری آن‌ها داشته باشد. مطالعه انجام شده سعی در دایمریزاسیون فاکتور سلول‌های بنیادی نوترکیب و زیپ‌لوسین و بیان آن دارد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. شامل بخش طراحی پروتئین نوترکیب توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک و بخش آزمایشگاهی می‌باشد. شاخص‌های مورد توجه در بخش طراحی از جمله ساختارهای پروتئینی توسط نرم‌افزارهای مختلف شامل PSIpred و Chimera و پایداری پروتئین نوترکیب توسط RAMPAGE بررسی شد. پس از تعیین جایگاه‌های برش آنزیمی توسط NEBcutter و بهینه‌سازی برای باکتری اریگامی توسط Optimizer ، ساخت توالی انجام شد. در ادامه کلون آن در باکتری TOP10 و بیان پروتئین در باکتری اریگامی انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از مطالعه‌های بیوانفورماتیک روی پروتئین نوترکیب Leucine Zipper / SCF، در برگیرنده شاخص‌های لازم جهت ساختار صحیح پروتئین و دارای امتیازی بالا از لحاظ پایداری در سلول زنده بود و در ادامه نتایج حاصل از بخش تجربی نشان از کلون و بیان موفق آن داشت.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه، همسانه‌سازی و بیان موفق پروتئین نوترکیب Leucine Zipper/SCF در میزبان اریگامی را تائید نمود.

کلمات کلیدی: **Stem Cell Factor، Leucine Zipper، پروتئین نوترکیب، دایمریزاسیون**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۶

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷
۳- دکترای تخصصی شیمی دارویی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

مقدمه

فاکتور سلول بنیادی(SCF:Stem Cell Factor) با نام‌های دیگری چون(Steel Factor : SLF)، (Mast Cell : MGF Growth Factor) و (Kit ligand : KL) نیز شناخته می‌شود(۱). SCF فاکتور رشدی است که در مراحل اولیه نمو(Hematopoietic stem cells : HSCs) نقش دارد. SCF علاوه بر HSCs باعث تحریک، مهاجرت، بقا و تمایز پیش‌سازهای ملانوسیت‌ها، ماست‌سل‌ها و سلول‌های زایا شده و سیگنالینگ گیرنده آن (c-Kit) در تشکیل طبیعی خون نقش دارد. این سیتوکاین گلیکوپروتئینی، توسط مغز استخوان تولید شده و توسط انواع مختلف سلول‌های فیبروبلاست(شامل سلول‌های استرومال مغز استخوان) و سلول‌های اندوتلیال در سرتاسر بدن بیان می‌گردد. گلیکوزیلاسیون نقشی در فعالیت زیستی SCF ندارد(۳، ۲). SCF به دو فرم فعال محلول و متصل به غشا وجود دارد و از نظر کمی و کیفی در نحوه سیگنال‌دهی متفاوت است(۵-۲). در حالی که فرم متصل به غشا SCF نقش بسیار مهمی در بدن ایفا می‌کند، فرم محلول آن جهت کشت و توسعه سلول‌های بنیادی خونساز و جنینی استفاده می‌شود. انواع تجاری SCF همگی به فرم محلول تولید می‌شوند. انتظار می‌رود هر آن چه باعث افزایش عملکرد و پایداری SCF گردد، در افزایش تحریک تکثیر، مهاجرت، بقا و تمایز پیش‌سازهای سلول‌های بنیادی خونساز، ملانوسیت‌ها، ماست‌سل‌ها و سلول‌های زایا نیز اثری مطلوب بر جای بگذارد. این مهم در مطالعه‌ای با ساخت SCF نوترکیب به شکل همودایمر کووالان فراهم گشته است(۶). تولید SCF به صورت فیزیولوژیک به شکل مونومر بوده و به شکل همودایمر غیرکووالان واجد عملکرد می‌باشد و دایمریزاسیون آن نقش تنظیمی در تمایل اتصال و فعالیت گیرنده آن ایفا می‌کند(۱). بر اساس مطالعه انجام شده فرم نوترکیب SCF ، ساختاری بسیار پایدارتر داشته و از نظر عملکرد قوی‌تر از فرم طبیعی آن در تحریک ساخت سلول‌های مورد مطالعه عمل می‌کند(۶). از سویی دیگر با توجه به مطالعه‌های بسیاری که در آن‌ها زیپ‌لوسین به صورت نوترکیب یا طبیعی باعث دایمریزاسیون انواع مختلفی از پروتئین‌ها شده، اثری مطلوب در عملکرد یا پایداری آن‌ها داشته است(۹-۷). زیپ‌لوسین انتخابی مناسب جهت دایمریزاسیون SCF به نظر می‌رسد. دلایل این ادعا در ساختار زیپ‌لوسین و SCF نهفته است. زیپ‌لوسین متشکل از دو هلیکس آلفا می‌باشد و مونومرهای آن با پیچش به دور هم با پیوندهای آب‌گریز مابین خود، تشکیل دایمر داده است و با تشکیل همودایمر، باعث همو و یا هترو دایمریزاسیون انواع بسیاری از پروتئین‌های متصل به خودشان خواهد شد(۱۱، ۱۰). دو پروتومر تشکیل‌دهنده SCF نیز تحت زاویه ۳۰ درجه، با اتصال سر به سر دایمر گشته و فقط به صورت دایمر دارای عملکرد می‌باشد(۱). با بررسی روی مطالعه‌هایی که در آن‌ها زیپ‌لوسین جهت دایمریزاسیون مونومرها به صورت نوترکیب یا طبیعی صورت گرفته است، به این نتیجه می‌توان دست یافت که زیپ‌لوسین از هر دو انتهای N و C ترمینال توالی خود، قابلیت اتصال به توالی‌های دیگر جهت القای دایمریزاسیون را دارد(۱۲-۷). با توجه به ساختار SCF و زیپ‌لوسین، از نظر فضایی امکان دایمریزاسیون SCF توسط زیپ‌لوسین به صورت صحیح ممکن می‌باشد. جهت بهره‌مندی از تمام مزایای میزبان بیانی پروکاریوتی از جمله امکان کشت و تولید در مقیاس وسیع با صرف هزینه و زمان کمتر در مقایسه با میزبان‌های یوکاریوتی، از میزبان پروکاریوتی برای بیان SCF نوترکیب استفاده شد که در این راستا استفاده از باکتری اشریشیاکلای در مطالعه‌ها در اولویت می‌باشد. SCF دارای دو پیوند دی‌سولفیدی در هر پروتومر خود می‌باشد که پیوند دی‌سولفیدی مابین سیستئین ۴و۸۹ جهت اتصال و فعالیت زیستی گیرنده ضروری بوده اما پیوند دی‌سولفیدی مابین سیستئین ۴۳و۱۳۸ برای اتصال گیرنده لازم نیست اما در فعالیت زیستی گیرنده نقش دارد؛ بر این اساس حضور هر دو پیوند برای دست‌یابی به عملکرد صحیح گیرنده ضروری است(۳). اما از آن جا که محیط سیتوپلاسم باکتری(میزبان بیانی)، احیاکننده می‌باشد و امکان تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در آن فراهم نیست، در این مطالعه از سویه مهندسی شده باکتری اشریشیاکلای بنام اریگامی(Origami) استفاده شد که انتظار می‌رود با دارا بودن جهش‌هایی در ژن‌های تیوردکسین‌ردوکتاز و گلوتاتیون‌ردوکتاز، امکان تشکیل باندهای دی‌سولفیدی ضروری در ساختار پروتئین

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

را فراهم کند و بهینه‌سازی توالی طراحی شده نیز برای این باکتری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون تهران در سال‌های ۹۸-۹۷ انجام شد که شامل دو بخش طراحی پروتئین نوترکیب توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک و تولید آزمایشگاهی پروتئین بود:

طراحی و پیش‌بینی ساختار اول، دوم و سوم پروتئین نوترکیب:

توالی‌های SCF و زیپ‌لوسین جهت طراحی پروتئین نوترکیب پس از بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI, Uniprotkb و RCSB PDB و انجام بررسی‌ها توسط برنامه‌های بیوانفورماتیکی انتخاب شدند(۱۵-۱۳). بررسی ساختار سه بعدی پروتئین نوترکیب طراحی شده LZ/SCF توسط برنامه Swissmodel انجام شد(۱۶).

پیش‌بینی ساختار دوم، توسط نرم‌افزار PSIpred انجام شد(۱۹-۱۷). به منظور پیش‌بینی ساختار سوم و به دست‌آوردن شکل سه بعدی فیوژن پروتئین نوترکیب با فرمت فایل PDB، از نرم‌افزار Chimera استفاده شد. بر این اساس کامل‌ترین ساختار متعلق به سازه طراحی‌شده متشکل از SCF متصل به زیپ‌لوسین و فاقد لینکر می‌باشد(۲۰).

بررسی پایداری ساختار:

بررسی پایداری ساختار پیش‌بینی شده پروتئین نوترکیب توسط نرم‌افزار RAMPAGE صورت گرفت(۲۱).

انتخاب میزبان کلونینگ و بیان و بهینه‌سازی:

با توجه به ویژگی‌های پروتئین نوترکیب، از باکتری TOP10 به عنوان میزبان کلونینگ و از باکتری اریگامی به عنوان میزبان بیانی استفاده شد و بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی جهت بیان در میزبان پروکاریوتی توسط نرم‌افزار Optimizer برای باکتری اریگامی انجام گرفت(۲۳، ۲۲). بر اساس ویژگی‌های پروتئین نوترکیب و باکتری‌های انتخاب شده جهت بیان و کلونینگ، وکتور pET32a انتخاب گردید. بررسی و ایجاد جایگاه‌های برش آنزیم محدودکننده توسط نرم‌افزار NEBcutter و در نهایت ساخت توالی ژن طراحی‌شده توسط GenScript (آلمان) درون وکتور pET32a انجام شد(۲۴).

آماده‌سازی و تراریختی میزبان کلونینگ:

سلول‌های TOP10 جهت پذیرش وکتور با روش شیمیایی با استفاده از کلریدکلسیم مستعدسازی گشته و تراریختی و انتقال وکتور pET32a-LZ/SCF به درون سلول‌های مستعد به منظور افزایش تعداد وکتور با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد.

استخراج وکتور نوترکیب و بررسی صحت همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور:

پس از ایجاد کلنی‌های اختصاصی، وکتور نوترکیب pET32a-LZ/SCF از باکتری TOP10 استخراج شد. بررسی الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده *Nco*I و *Xho*I جهت بررسی خلوص وکتور و صحت همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور pET32a انجام شد. الکتروفورز ژل آگارز جهت بررسی نتیجه انجام گرفت.

بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF:

پس از آماده‌سازی سلول‌های باکتری اریگامی جهت پذیرش وکتور و تراریختی با وکتورpET32a-LZ/SCF ، پروتئین نوترکیب LZ/SCF در باکتری اریگامی بیان گردید. بررسی بیان پروتئین نوترکیب توسط روش SDS–PAGE صورت گرفت. برای تأیید هویت پروتئین نوترکیب، وسترن‌بلات انجام گرفت.

یافته‌ها

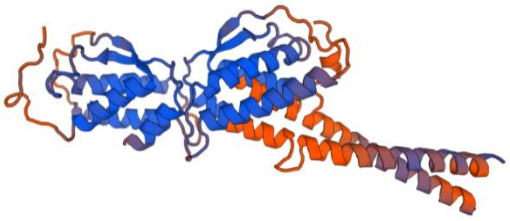
طراحی و پیش‌بینی ساختار اول، دوم و سوم پروتئین نوترکیب:

در گام نخست توالی آمینواسیدی فاکتور سلول بنیادی (SCF) و توالی زیپ‌لوسین از بانک اطلاعات پروتئین

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

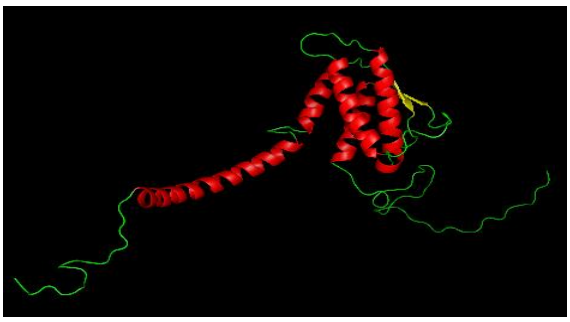
Uniprotkb به دست آمد. از توالی SCF(165) برای طراحی پروتئین نوترکیب استفاده شد که پیوندهای دی‌سولفیدی لازم برای عملکرد صحیح پروتئین و نقاط اتصال به گیرنده SCF (c-Kit) نیز در این محدوده توالی وجود دارد. پس از بررسی ساختار توالی‌های زیپ‌لوسین در اتصال با پروتئین SCF، توالی زیپ‌لوسین مربوط به پروتئین Myocilin انتخاب گردید.

در طراحی ساختمان اول پروتئین نوترکیب، زیپ‌لوسین برگرفته از پروتئین میوسیلین، N ترمینال و توالی مربوط به SCF، C ترمینال پروتئین طراحی‌شده را تشکیل می‌دهد. ساختار دوم پروتئین نوترکیب توسط نرم‌افزار PSIpred بررسی گشته و نتایج مدل‌سازی همولوژیکی حاصل از برنامه SWISS-MODEL نشان‌دهنده ساختاری از پروتئین نوترکیب LZ/SCF می‌باشد که در آن نحوه اتصال توالی پروتئین Leucine Zipper و SCF و ساختمان سه‌بعدی پروتئین نوترکیب به صورت مطلوب می‌باشد(شکل ۱).



شکل ۱: ساختار سه بعدی پروتئین نوترکیب LZ/SCF حاصل از برنامه Swissmodel

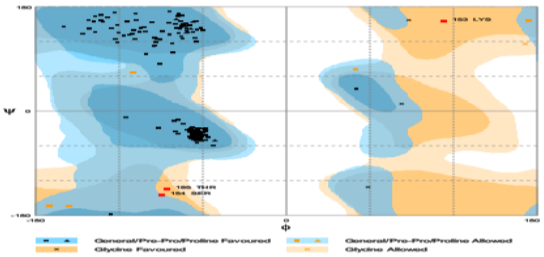
نتایج به دست آمده از پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین نوترکیب LZ/SCF توسط نرم‌افزار Chimera به وسیله نرم‌افزارPyMOL مشاهده شد. مطابق انتظار در پروتئین نوترکیب، دومین تشکیل‌دهنده SCF واجد چهار هلیکس و دو beta-sheet و زیپ‌لوسین نیز متشکل از یک هلیکس خطی می‌باشد(شکل ۲).



شکل ۲ : پیش‌بینی ساختار توسط نرم‌افزار Chimera

بررسی پایداری ساختار:

پایداری ساختار سوم پیش‌بینی شده برای پروتئین نوترکیب با استفاده از نمودار راماچاندران، نشان‌دهنده قرارگیری ۹۵/۸٪ از ریشه‌های آمینواسیدی در ناحیه مطلوب و ۲/۸٪ در ناحیه مجاز است در نتیجه پروتئین نوترکیب LZ/SCF از پایداری مناسبی در محیط سلول برخوردار می‌باشد(شکل ۳).



شکل۳: نمودار راماچاندران پروتئین نوترکیب LZ/SCF ، قرارگیری ۹۸/۶٪ از ریشه‌های آمینواسیدی در ناحیه مطلوب و مجاز

بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی:

به منظور بهینه‌سازی توالی پروتئین نوترکیب طراحی شده جهت بیان در میزبان پروکاریوتی(E. coli K12) از نرم‌افزار آنلاین Optimizer استفاده شد.

با توجه به نتایج حاصل از نرم‌افزار NEBcutter، آنزیم‌های محدودکننده *Nco*I و *Xho*I انتخاب شدند. توالی محل اثر برش این آنزیم‌ها به سکانس نوکلئوتیدی طراحی شده اضافه گشت. در نهایت توالی ژنی ساخته شده (GenScript، آلمان) و به درون وکتور pET32a وارد شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

آماده‌سازی و تراریختی میزبان کلونینگ:

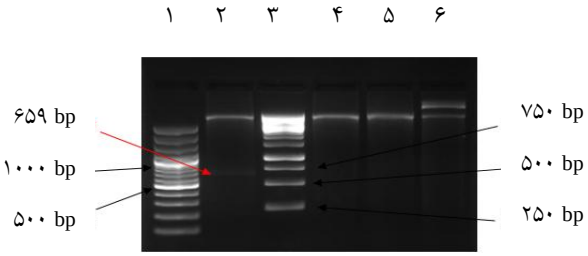
پس از آماده‌سازی سلول‌های باکتری TOP10 (انستیتو پاستور، ایران) جهت پذیرش وکتور و نیز تراریختی این باکتری‌ها با وکتور نوترکیب، باکتری‌ها در محیط کشت انتخابی LB agar (Luria Bertani Broth) جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (ژن مقاومت به آمپی‌سیلین بر روی وکتور pET32a-LZ/SCF وجود دارد) کشت و به صورت کلنی ظاهر شدند. این امر نشان‌دهنده موفقیت در تراریختی باکتری‌های TOP10 با وکتور نوترکیب pET32a-LZ/SCF و ورود آن به ژنوم باکتری می‌باشد.

استخراج وکتور نوترکیب و بررسی صحت همسانه‌سازی ژن هدف در وکتور:

استخراج وکتور نوترکیب pET32a-LZ/SCF از باکتری‌های E.coli سویه TOP10 با استفاده از کیت استخراج وکتور(Favorgene ، تایوان) به روش Miniprep انجام شد. جهت بررسی الگوی هضم آنزیمی، وکتور نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های محدودکننده NcoI و XhoI در بافر مشترک(Tango 2X) شکسته شد. بررسی کیفیت وکتور استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. بررسی اندازه قطعات حاصل از هضم آنزیمی و حضور قطعه ژنی با اندازه مورد نظر، صحت همسانه‌سازی را تأیید نمود(نمودار ۱).

آماده‌سازی و تراریختی میزبان بیانی:

مستعدسازی سلول‌های باکتری اریگامی(انستیتو پاستور، ایران) جهت پذیرش وکتور با استفاده از کلریدکلسیم و تراریختی و انتقال وکتورpET32a-LZ/SCF به داخل سلول‌های مستعد شده توسط شوک حرارتی انجام شد. سپس باکتری‌ها در محیط کشت انتخابی LB agar جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و تتراسایکلین (ژن‌های مقاوم به این آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری اریگامی وجود دارد) رشد کرده و کلنی تشکیل دادند که نشان‌دهنده موفقیت در تراریختی باکتری‌های اریگامی با وکتور نوترکیب pET32a- LZ/SCF و ورود آن به ژنوم باکتری است.



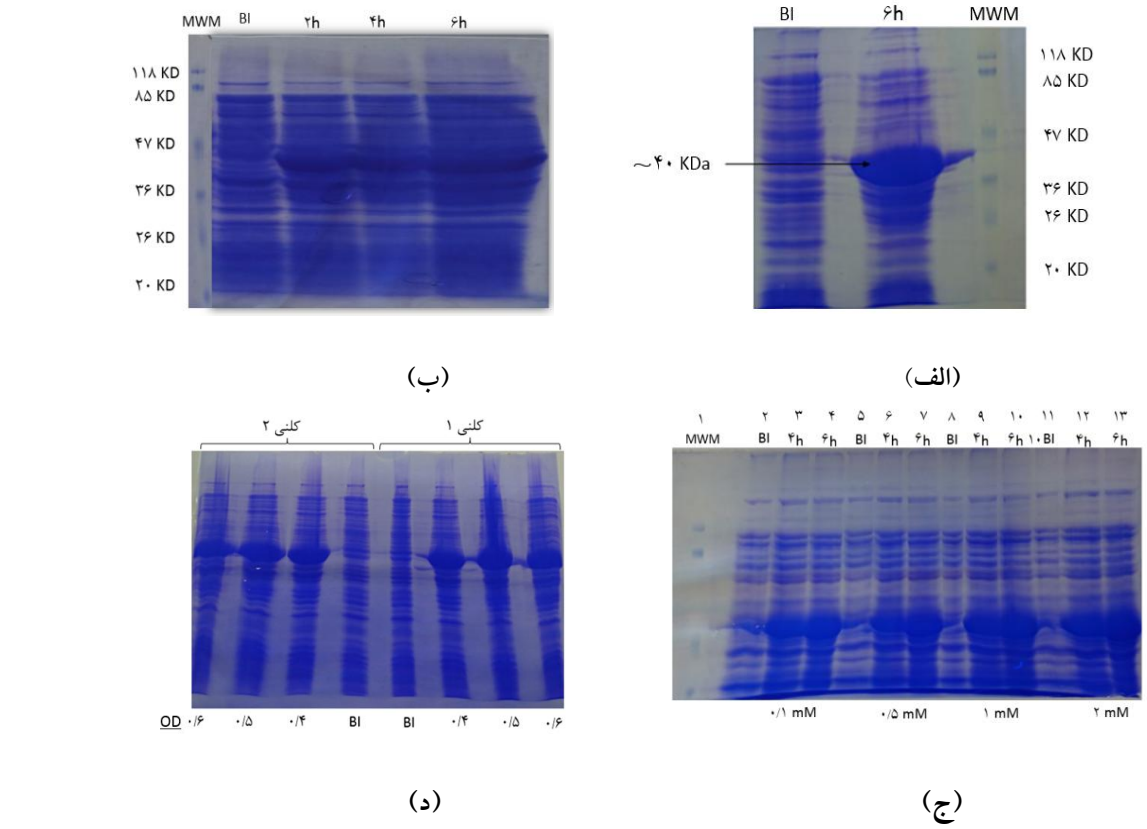
نمودار ۱: بررسی الگوی هضم آنزیمی وکتور نوترکیب-pET32a LZ/SCF توسط الکتروفورز؛ ستون ۱ شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی، ستون ۲ واجد آنزیم محدودکننده XhoI و NcoI ، ستون ۳ شاخص اندازه مولکولی ۱ کیلوبازی، ستون ۴ واجد آنزیم محدود کننده XhoI، ستون ۵ واجد آنزیم محدودکننده NcoI ، ستون ۶ فاقد آنزیم.

بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF:

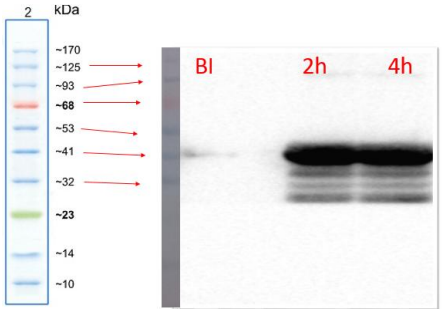
جهت بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF پس از گرماگذاری کشت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور، از آن کشت تازه تهیه شد و القای بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF توسط IPTG (سیگما، آمریکا) انجام شد. بررسی بیان فیوژن پروتئین نوترکیب LZ/SCF در اریگامی، توسط الکتروفورز پروتئین‌ها با استفاده از روش SDS-PAGE انجام شد. نتایج حاصل از الکتروفورز(قسمت الف نمودار ۲) نشان‌دهنده بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF در ستون ۲ پس از گذشت ۶ ساعت پس از القا توسط IPTG در مقایسه با نمونه‌های قبل از القا در ستون ۳ می‌باشد. در این میان در بررسی فواصل زمانی ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از القا با یکدیگر به نظر می‌رسد که باکتری در زمان ۶ ساعت پس از القا توسط IPTG ، بیشترین میزان بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF را نشان داده و زمان مناسب‌تری برای برداشت پروتئین است(قسمت ب نمودار ۲).

از میان کلنی‌های تراریخت شده باکتری اریگامی با وکتور نوترکیب PET32a-LZ/SCF ، چهار کلنی مجزا و کوچک انتخاب شده و جهت بررسی بهترین غلظت IPTG جهت القای بیان باکتری، از غلظت‌های متفاوت IPTG ۰/۱ -۰/۵ -۱ -۲ میلی‌مولار استفاده شد که غلظت ۱ میلی‌مولار بهترین میزان غلظت برای القای باکتری جهت بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF می‌باشد(قسمت ج نمودار ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]



نمودار ۲: نتایج SDS – PAGE جهت بررسی میزان بیان؛ الف) بررسی بیان قبل و پس از القا با IPTG ب) بررسی بیان در زمان‌های مختلف پس از القا ج) بررسی بهترین میزان غلظت IPTG برای القای باکتری جهت بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF د) مقایسه بیان دو کلنی مختلف در ODهای مختلف



نمودار ۳ : تأیید هویت پروتئین نوترکیب LZ/SCF پس از بیان توسط روش وسترن‌بلات

بهترین دانسیته جذب نوری (OD) رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر، حدود ۰/۵ ارزیابی گردید(قسمت د نمودار ۲).

تأیید هویت پروتئین نوترکیب LZ/SCF:

در انتها به دلیل این که توالی پروتئین نوترکیب LZ/SCF دارای His-Tag می‌باشد، پس از بیان هویت آن توسط وسترن‌بلات با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti His-Tag متصل به آنزیم HRP تأیید شد(نمودار ۳).

بحث

نظر به اهمیت حضور SCF در بقا، تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول‌های بنیادی خونساز، پیش‌سازهای ملانوسیت‌ها، ماست‌سل‌ها و سلول‌های زایا و در راستای پیشرفت روزافزون بیوتکنولوژی و ژن‌درمانی در دهه‌های اخیر، SCF به عنوان یکی از گزینه‌های مهم در فعالیت‌های بیوتکنولوژی شناخته شده است. SCF به نحو گسترده‌ای در مطالعه‌های سلول‌های بنیادی، بررسی روند مولکولی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

سرطان‌ها و مهاجرت سلول‌های سرطانی و مطالعه‌های مولکولی در انواع کم‌خونی‌ها و حتی ایجاد روش‌های درمانی جدید مورد استفاده است. بدین منظور در بسیاری از مطالعه‌های موجود در این حیطه، تولید SCF به شیوه نوترکیب مورد توجه قرار گرفته است. اما در این مسیر، صرف دست‌یابی به SCF نوترکیب اغناکننده و به صرفه نمی‌باشد؛ بلکه تولید SCF نوترکیبی که واجد ساختاری پایدارتر و عملکردی بیشتر از فرم طبیعی باشد، مطلوب‌تر خواهد بود.

در طی مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۷ مقایسه دو فرم دایمر کووالان (فرم نوترکیب) و غیرکووالان (فرم طبیعی) SCF نشان‌دهنده افزایش در تعداد کلنی‌های مشاهده شده از SCF نوترکیب و توانایی تحریک رشد سلول‌های مشتق از میزبان‌های مورد نظر مطالعه و نیز پایداری بالاتر در مقایسه با SCF طبیعی بود(۵). با توجه به این مطالعه که سعی بر ارتقای SCF از طریق تأثیر بر نحوه دایمریزاسیون مونومرهای SCF شده و باعث به دست آمدن راندمان بالاتری در بیان و پایداری SCF گشته است؛ ایده ارتقای SCF توسط تقویت و یا تغییر نحوه دایمریزاسیون SCF شکل گرفت. در مطالعه عنوان شده با تداخل در ساختار فضایی پروتئین به نتیجه موردنظر دست یافتند؛ در نتیجه با توجه به این که زیپ‌لوسین یکی از مواردی است که به صورت طبیعی قادر به دایمریزاسیون توالی‌های متصل به خود می‌باشد و با توجه به مطالعه‌های بسیاری که در این زمینه انجام شده است و نظر به تأثیرات زیپ‌لوسین در پایداری و افزایش فعالیت دومین کاتالیتیک، توالی‌های پروتئین‌هایی که موتیف زیپ‌لوسین به صورت اتصال طبیعی یا نوترکیب به آن‌ها متصل گشته است(۹-۷). در مطالعه پیش‌رو با اضافه کردن موتیف زیپ‌لوسین به توالی SCF ، در واقع از زیپ‌لوسین به عنوان ابزاری طبیعی جهت دست‌یابی به نتایج موردنظر بدون تداخل در ساختمان فضایی پروتئین استفاده شد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۵، دایمریزاسیون مونومرهای پروتئین توسط زیپ‌لوسین موجود در ساختار آن نشان‌دهنده تأثیر زیپ‌لوسین بر پایداری این پروتئین در انواع شرایط سخت بافری می‌باشد(۷). در پژوهش صورت گرفته در سال ۲۰۰۰ نیز جهت بررسی اتصال زیپ‌لوسین به صورت نوترکیب به پروتئین‌ها، در *in vivo* و *in vitro* ، افزایش فعالیت دومین کاتالیتیک متصل به زیپ‌لوسین (فرم نوترکیب) نسبت به دومین کاتالیتیک (فرم طبیعی) مشاهده گردید(۹).

تاکنون مطالعه‌های صورت گرفته برSCF در ایران، حول محور کلون و بیان توالی SCF بوده است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴ در ایران، توالی کدکننده فرم محلول SCF را کلون نمودند اما در مورد بیان آن گزارشی ارائه نگردید(۲۵). هم‌چنین در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۷ در جهت بررسی بیان SCF در ایران، توالی کدکننده مونومر SCF کلون و در سویه Rosetta-gami بیان شد(۴).

هدف مطالعه حاضر با توجه به مطالعه‌های عنوان شده، طراحی و بیان توالی پروتئینی نوترکیب LZ/SCF بود. جهت تحقق هدف پیش‌رو پس از بررسی پایگاه‌های اطلاعاتی مختلف، توالی آمینواسیدی فاکتور سلول بنیادی (SCF) و توالی زیپ‌لوسین مربوط به پروتئین میوسیلین به دست آمد. جهت بررسی ساختار دوم پروتئین نوترکیب از نرم‌افزار PSIpred استفاده شد. ساختمان سه بعدی پروتئین نوترکیب LZ/SCF توسط برنامه Swiss-model بررسی و در نتایج مدل‌سازی همولوژیکی، نحوه اتصال توالی پروتئین Leucine Zipper و SCF به هم و ساختمان سه بعدی آن به صورت مطلوب می‌باشد. بررسی ساختار سوم توالی‌های انتخابی نیز تحت چیدمان‌های متفاوت توسط نرم‌افزار Chimera انجام گرفت. نتایج به دست آمده از پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین نوترکیب LZ/SCF توسط نرم‌افزار Chimera نشان‌دهنده فولد مناسب و تشکیل ساختار کامل سازه طراحی شده می‌باشد. پایداری ساختار سوم پروتئین نوترکیب LZ/SCF با استفاده از نمودار راماچاندران بررسی شد که نشان‌دهنده پایداری مناسب پروتئین نوترکیب LZ/SCF در محیط سلول است.

از آن جا که در مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۱۷ جهت بیان کدون‌های نادر، از سویه Rosetta-gami به عنوان میزبان بیانی استفاده شد(۴). در مطالعه حاضر به دلیل استفاده از سویه اریگامی به عنوان میزبان بیانی و بهینه‌سازی توالی برای میزبان انتخاب شده توسط نرم‌افزار

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

آنلاین اپتیمایزر، تمامی کدون‌ها در اریگامی بیان خواهند شد. با توجه به نتایج حاصل از نرم‌افزار NEBcutter، آنزیم‌های محدودکننده *Nco*I و *Xho*I انتخاب شدند. توالی محل اثر برش این آنزیم‌ها که برای بیان پروتئین در میزبان پروکاریوتی ضروری است، به سکانس نوکلئوتیدی طراحی شده اضافه گشت. در نهایت توالی ژنی توسط(GenScript، آلمان) سنتز و درون وکتور pET32a ساب‌کلون گردید.

جهت همسانه‌سازی سازه ژنی از باکتری TOP10 (انستیتو پاستور، ایران) به عنوان میزبان کلونینگ استفاده شد. استخراج وکتور pET32a- LZ/SCF از میزبان کلونینگ با استفاده از کیت استخراج پلاسمید(Favorgene ، تایوان) به روش Miniprep انجام شد. به منظور مشاهده و اطمینان از صحت و خلوص وکتور استخراج شده، محصول واکنش هضم آنزیمی، با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه‌های پیشین پس از بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E.coli* ، نیاز به Refolding پروتئین نوترکیب جهت تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بود(۲۶). از آن جا که دو پیوند دی‌سولفیدی SCF جهت اتصال و فعالیت زیستی گیرنده ضروری است و محیط باکتری E.coli به دلیل احیاکننده بودن سبب شکست پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در پروتئین نوترکیب LZ/SCF می‌گردد، در نتیجه در مطالعه حاضر از باکتری اریگامی استفاده شد که موتانت برگرفته از سویه *E.coli* K12 می‌باشد زیرا سویه مهندسی‌شده اریگامی با دارا بودن جهش‌هایی در ژن‌های تیوردکسین‌ردوکتاز و گلوتاتیون‌ردوکتاز، امکان تشکیل باندهای دی‌سولفیدی ضروری در ساختار پروتئین را فراهم می‌آورد. در مطالعه انجام گرفته در سال ۲۰۱۵، جهت بیان پیوندهای دی‌سولفیدی، توالی تیوردوکسین‌ردوکتاز را با وکتور، بیان هم‌زمان(coexpression) نموده که در مطالعه حاضر مرتفع نمودن این نیاز با اضافه نمودن توالی تیوردوکسین‌ردوکتاز به توالی پروتئین نوترکیب طراحی شده انجام گرفت(۲۷). لازم به ذکر است که SCF در سلول‌های پستانداران به صورت N-glycosylate است با این وجود ثابت شده است که حضور یا عدم حضور کربوهیدرات در SCF برای فعالیت زیستی ضروری به نظر نمی‌رسد. به همین دلیل بیان پروتئین نوترکیب LZ/SCF در باکتری *E. coli* باعث اختلال در فعالیت زیستی آن نخواهد شد. در نهایت بیان فیوژن پروتئین LZ/SCF در میزبان بیانی اریگامی به روش SDS – PAGE بررسی شد و سپس با روش وسترن‌بلات هویت پروتئین تأیید گشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، تأیید ساختار مناسب سازه طراحی شده توسط نرم‌افزارهای مورد استفاده و موفق بودن کلون وکتور نوترکیب pET32a-LZ/SCF در میزبان باکتریایی کلونینگ (TOP10) و حصول کلون‌های اختصاصی می‌باشد. بیان پروتئین LZ/SCF در میزبان باکتریایی بیان اریگامی نیز با موفقیت انجام شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بودجه این تحقیق توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل علمی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام شده است. پروپوزال این پایان‌نامه با دریافت کد اخلاق IR.TMI.REC.1397.002 در کمیته تخصصی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی تصویب شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

References:

1- Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A, Schlessinger J, Kong XP. Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(14): 7732-7.
2- Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. Physiol Rev 2012; 92(4): 1619-49.
3- Jiang X, Gurel O, Mendiaz EA, Stearns GW, Clogston CL, Lu HS, *et al*. Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. EMBO J 2000; 19(13): 3192-203.
4- Nayebhashemi M, Fahimii H, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. Isolation, cloning and expression of human stem cell factor using prokaryotic expression system. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 14(1): 53-64. [Article in Farsi]
5- Tarasova A, Haylock D, Winkler D. Principal signalling complexes in haematopoiesis: Structural aspects and mimetic discovery. Cytokine Growth Factor Rev 2011; 22(4): 231-53.
6- Nocka KH, Levine BA, Ko JL, Burch PM, Landgraf BE, Segal R, *et al*. Increased growth promoting but not mast cell degranulation potential of a covalent dimer of c-Kit ligand. Blood 1997; 90(10): 3874-83.
7- Teruaki O, Saotomo I, Ishii R, Suzuki K, Nauseef WM, Toyoshima S, *et al*. Homotypic dimerization of the actin-binding protein p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. Biochem J 2005; 387(2): 325-31.
8- Karyagina A, Boksha I, Grunina T, Demidenko A, Poponova M, Sergienko O, *et al*. Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an Escherichia coli heterologous expression system. Biochemistry (Moscow) 2017; 82(5): 613-24.
9- Naula C, Schaub R, Leech V, Melville S, Seebeck T. Spontaneous dimerization and leucine-zipper induced activation of the recombinant catalytic domain of a new adenylyl cyclase of Trypanosoma brucei, GRESAG4. 4B. Mol Biochem Parasitol 2001; 112(1): 19-28.
10- Fautsch MP, Johnson DH. Characterization of myocilin–myocilin interactions. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42(10): 2324-31.
11- Tropsha A, Bowen JP, Brown FK, Kizer J. Do interhelical side chain-backbone hydrogen bonds participate in formation of leucine zipper coiled coils? Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(21): 9488-92.
12- Vasileva Wand NI, Bonney LC, Watson RJ, Graham V, Hewson R. Point-of-care diagnostic assay for the detection of Zika virus using the recombinase polymerase amplification method. J Gen Virol 2018; 99(8): 1012-26.
13- Park IS, Jo KS, Won HS, Kim H. Dimerization of TRAF-interacting protein (TRAIP) regulates the mitotic progression. Biochem Biophys Res Commun 2015; 463(4): 864-9
14- NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res 2018; 46(D1): D8-D13.
15- Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bairoch A. Uniprotkb/swiss-prot. Plant bioinformatics. USA: Springer; 2007. p. 89-112.
16- Heinz DW, Baase WA, Dahlquist FW, Matthews BW. How amino-acid insertions are allowed in an α-helix of T4 lysozyme. Nature 1993; 361(6412): 561-4.
17- Prisant M, Richardson J, Richardson D. Structure validation by Calpha geometry: Phi, psi and Cbeta deviation. Proteins 2003; 50: 437-50.
18- Kaur H, Raghava GPS. Prediction of β-turns in proteins from multiple alignment using neural network. Protein Sci 2003; 12(3): 627-34.
19- Cuff JA, Barton GJ. Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. Proteins 2000; 40(3): 502-11.
20- Chen Y. Bioinformatics technologies. USA: Springer Science & Business Media; 2005.
21- Takamatsu N, Watanabe Y, Yanagi H, Meshi T, Shiba T, Okada Y. Production of enkephalin in tobacco protoplasts using tobacco mosaic virus RNA vector. FEBS Lett 1990; 269(1): 73-6.
22- Lovell S, Davis I, Arendall W, de Bakker P, Word J, Prisant M, *et al*. Structure validation by Calpha geometry: phi, psi and Cbeta deviation. Proteins 2003; 50(3): 437-50.
23- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 2012; 13(1): 134.
24- Puigbo P, Romeu A, Garcia-Vallve S. HEG-DB: a database of predicted highly expressed genes in prokaryotic complete genomes under translational selection. Nucleic Acids Res 2008; 36(Database issue): D524-7.
25- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3688-91.
26- Asghari S, Khaniani MS, Darabi M, Derakhshan SM. Cloning of soluble human stem cell factor in pet-26b (+) vector. Adv Pharm Bull 2014; 4(1): 91-5.
27- Ueda T, Akuta T, Kikuchi-Ueda T, Imaizumi K, Ono Y. Improving the soluble expression and purification of recombinant human stem cell factor (SCF) in endotoxin-free Escherichia coli by disulfide shuffling with persulfide. Protein Expr Purif 2016; 120: 99-105.
28- Akuta T, Kikuchi-Ueda T, Imaizumi K, Oshikane H, Nakaki T, Okada Y, *et al*. Expression of bioactive soluble human stem cell factor (SCF) from recombinant Escherichia coli by coproduction of thioredoxin and efficient purification using arginine in affinity chromatography. Protein Expr Purif 2015; 105: 1-7.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2021;18 (4): 269-278

Original Article

Expression of recombinant Stem Cell Factor fused with Leucine Zipper

Taghikhani F.[1], Mohammadipour M.[1], Mousavi Hosseini K.[1]

[1]*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Stem cell factor (SCF) is a blood cytokine that plays an important role in the differentiation of hematopoietic progenitor cells, as well as survival, proliferation, and differentiation of mast cells. Furthermore, it can enhance tumor cell proliferation and invasion. Recombinant or natural form of leucine zipper can cause homo- or heterodimerization of many types of proteins which are attached to it and have a favorable effect on their function or stability. The present study investigates the expression of leucine zipper-bound SCF.

Materials and Methods

This experimental study consists of designing a recombinant protein by bioinformatic softwares and the laboratory part of the study. The indices of interest for designing of the protein structures were analysed by various softwares including PSIpred and Chimera and the recombinant protein stability by RAMPAGE. The sequence synthesis was performed after determination of the enzymatic cleavage sites with NEBcutter. Then, codon optimization for Origami was done with Optimizer. Cloning in TOP10 and the protein expression in Origami were performed.

Results

The results of bioinformatics studies on the Leucine Zipper/SCF recombinant protein included the necessary criteria for the possible native structure of the protein and the high score for viability in the living cell. Furthermore, the results of the experimental section showed successful cloning and expression.

Conclusions

In the present study, the results indicated the successful cloning and expression of the recombinant Leucine Zipper/SCF protein.

Key words: Stem Cell Factor, Leucine Zippers, Recombinant Proteins, Dimerization

Received: 17 Feb 2020
Accepted: 7 Aug 2021

Correspondence: Mohammadipour M., PhD of Molecular Genetics. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88699531; Fax: (+9821) 88699531
E-mail: *mahshid127@gmail.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-20]