

جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین در سیستم بیانی اشرشیاکلی

زهرا شجاع^۱، حمید رجیبی معماری^{۲*} و محمد رعایایی اردکانی^۳^۱ جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی^۲ اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات^۳ اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۴

چکیده

فیکوسیاینین رنگدانه آبی رنگی است که در دو گروه از جلبکها و سیانوباکترها از جمله *Spirulina* وجود دارد. این رنگدانه دارای فعالیت‌های متنوع زیستی است و کاربردهای گوناگونی در صنعت غذایی، آرایشی و دارویی دارد. پیشرفتهای زیادی جهت تولید فیکوسیاینین در مقیاس بالا انجام شده است، اما اغلب روشها مشکل و با هزینه‌های بالایی قابل انجام هستند؛ در صورتی که همسانه‌سازی و بیان فیکوسیاینین به صورت نوترکیب روشی ارزان است و خالص‌سازی آن آسان‌تر انجام می‌پذیرد. از این رو هدف از این تحقیق، جداسازی و همسانه‌سازی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین در ناقل بیانی و تولید این پروتئین نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی بود تا زمینه تولید فیکوسیاینین به صورت صنعتی فراهم گردد. در این پژوهش ژنوم سیانوباکتر *Spirulina platensis* استخراج شد و بعنوان الگو در PCR مورد استفاده قرار گرفت. ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین تکثیر یافته با آغازگرهای طراحی شده، در ناقل بیانی pET-43.1a+ با استفاده از آنزیمهای برشی *NotI* و *NdeI* کلون گردید. همسانه‌سازی ژن زیرواحد آلفا در ناقل بیانی با استفاده از Colony PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. بیان ژن با استفاده از آنالیز SDS-PAGE ۱۲/۵ درصد تا ۸ ساعت پس از القاء با IPTG مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی SDS-PAGE، بیان قوی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین در سیستم بیانی اشرشیاکلی تأیید شد. بیان بالای ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین نشان داد که باکتری اشرشیاکلی می‌تواند بعنوان میزبان مناسب، جهت تولید فیکوسیاینین نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد. همچنین این تحقیق زمینه تولید فیکوسیاینین نوترکیب در آینده را با صرف هزینه‌های پایین‌تر فراهم آورد.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، بیان، ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین، اسپیرولینا پلانتسیس، pET-43.1a+

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۳۷۱۹۱۹۳، پست الکترونیکی: hamidmemory@gmail.com

مقدمه

جهت اثبات خواص دارویی و فواید مواد مغذی موجود در اسپیرولینا انجام شده است که تعدادی از آنها مربوط به فیکوسیاینین موجود در این سیانوباکتر است (۴).

فیکوسیاینین رنگدانه آبی رنگی است که می‌تواند بعنوان رنگ طبیعی، جایگزین رنگهای سنتزی سرطان‌زا در مواد غذایی، دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار گیرد. امروزه علاوه بر استفاده از آن بعنوان رنگ غذا، بمیزان کمی در

اسپیرولینا، سیانوباکتر رشته‌ای است که علاوه بر درصد بالای پروتئین (۷۰-۵۰ درصد)، غنی از ویتامینها (مخصوصاً B12)، لیپیدها (گاما لینولنیک اسید) و رنگدانه‌ها (فیکوبیلی پروتئین و کاروتنوئید) است. از این‌رو امروزه در بسیاری از کشورها به صورت تجاری بعنوان مکمل غذای انسان و حیوانات مورد مصرف قرار می‌گیرد (۱۲).

صرف نظر از ارزش غذایی اسپیرولینا، مطالعات متنوعی

اکسیدانی نشان داد که این پروتئین نوترکیب، پتانسیلی جهت استفاده در fluorescent tagging و عوامل دارویی دارد (۹).

در سالهای اخیر نیز، پژوهش‌های گسترده‌ای برای تولید پروتئین‌های نوترکیب از طریق میکروارگانیسم‌ها، حیوانات ترانسژنیک و گیاهان مورد توجه قرار گرفته است که در این میان، باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* بعنوان کارخانه تولید پروتئین‌های نوترکیب از جاذبه‌های خاصی برخوردار است (۱). مزیت‌های بسیاری برای استفاده از سیستم بیان ژن *اشرشیاکلی* به اثبات رسیده که آن را یک میکروارگانیسم ارزشمند برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در سطوح بالا باقی‌گذارده است. ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی کاملاً شناخته شده آن، تکثیر در زمان کوتاه، آسان بودن دست‌ورزی آن، دانش اثبات شده فرمانتاسیون و نهایتاً ظرفیت بالا برای تجمع پروتئین‌های نوترکیب (بیش از ۲۰ درصد از محتوای پروتئین کل سلولی)، *اشرشیاکلی* را یکی از پرکاربردترین میزبانها در تولید پروتئین ساخته است (۷ و ۱۰).

بر این اساس در این تحقیق ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین در ناقل بیانی مناسب کلون گردید و بیان آن در سیستم بیانی *اشرشیاکلی* بررسی شد تا در طرح‌های بعدی، دیگر ژن‌های مربوط به سنتز فیکوسیاینین هم‌سانه‌سازی شوند و در آینده بتوان به فیکوسیاینین نوترکیب کامل دست یافت.

مواد و روشها

کشت اسپیرولینا و استخراج ژنوم: اسپیرولینا پلتنسیس از مرکز پرورش میگو استان بوشهر تهیه شد. کشت در محیط اختصاصی Zarrouk انجام شد (نمک‌های مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت Zarrouk از شرکت Merck آلمان تهیه شدند). و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انکوبه شد (۱۵). پس از رسیدن اسپیرولینا به مرحله رشد لگاریتمی، استخراج ژنوم با استفاده از روش تغییر یافته جداسازی

ایمونواسی و سیتومتری مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵). فیکوسیاینین موجود در اسپیرولینا همچنین با داشتن بعضی از عملکردها مانند آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی (۱۷) و ضد-سرطانی (۱۳) برای سلامتی انسانها مفید است، به همین دلیل در سالهای اخیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است.

با توجه به اینکه فیکوسیاینین ۲۰ درصد از کل پروتئین سلولی اسپیرولینا پلتنسیس را بخود اختصاص داده است (۱۱)، امروزه بعنوان مدل مناسبی جهت تولید فیکوسیاینین به صورت تجاری در کشتهای فتوتروفی انتخاب شده است. تولید فیکوسیاینین به صورت فتوتروفی همراه با مشکلاتی است. یک راهکار جهت کاهش مشکلات، تولید هتروتروفی آن است که تولید پروتئین نوترکیب، یکی از راههای تولید هتروتروفی است (۶).

فیکوسیاینین دارای دو زیرواحد پروتئینی آلفا و بتا (α , β) است که زیرواحد آلفا یک محل و زیرواحد بتا دو محل، جهت اتصال فیکوسیانیوبیلین به آپوپروتئین مذکور دارد. سنتز کامل فیکوبیلی پروتئین وابسته به سنتز همزمان زنجیره آلفا و بتا و قرارگیری صحیح فیکوبیلین‌ها در این دو زنجیره است. از این‌رو تولید نوترکیب این فیکوبیلی پروتئین نسبت به پروتئین‌های دیگر مشکل است (۶). تاکنون (۲۰۰۱) *Tooley et al*، هالوپروتئین زیرواحد آلفا فیکوسیاینین مربوط به سیانوباکتر *Synechocystis* sp. PCC6803 را در *اشرشیاکلی* بیان کردند. در این تحقیق ژنهای *cpcA* همراه با ژنهای فیکوسیانیوبیلین لیاژ (*cpc-E/c-*) در یک ناقل و ژنهای هم‌اکسیژناز و *3 Z-phycoyanobilin:ferredoxin reductase* در ناقل دیگر کلون شدند و همزمان دو ناقل به باکتری معرفی شد (۲۱). در گزارشی (۲۰۰۷) *Guan et al*، با انتقال این ژنها به یک ناقل، هالوپروتئین زیرواحد آلفا فیکوسیاینین را تولید کردند (۸). همچنین *Guan et al* در سال ۲۰۰۹، با استفاده از ژن *cpcA* اسپیرولینا، هالوپروتئین زیرواحد آلفا فیکوسیاینین نوترکیب را تولید کردند. علاوه بر این بررسی فعالیت آنتی

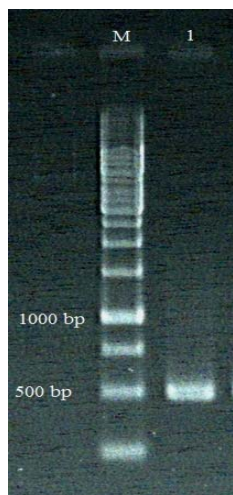
معکوس به صورت (Reverse primer) 5'ATAAGAA
 TGCGGCCGCGCTTAGGGCGTTG
 3'ATCGCGTAGTCG3' بود. در آغازگر پیشرو جایگاه
 برشی برای آنزیم *NdeI* و در آغازگر معکوس جایگاه
 برشی برای آنزیم *NotI* تعبیه شد. جهت افزایش کارایی
 برش آنزیم‌های برشی، دو توالی اضافی بعنوان لنگرگاه
 آنزیم، به ابتدای آغازگرها افزوده گردید.

تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه ترمال
 سایکلر (شرکت BioRad) و در حضور ۱۰۰ نانوگرم
 DNA ژنومی، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی‌مولار
 dNTP، ۰/۴ میکرومولار از آغازگرهای رفت و برگشت،
 ۱/۵ واحد از آنزیم Tag DNA Polymerase و ۲/۵
 میکرولیتر بافر PCR (تهیه شده از شرکت سینازن) انجام
 شد. برنامه دمایی و زمانی بهینه واکنش، با دمای ۹۴ درجه
 سانتی‌گراد بمدت ۵ دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه
 آغاز شد و با ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، ۶۴
 درجه بمدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه بمدت ۳۵ ثانیه ادامه و
 در نهایت با ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۰ دقیقه خاتمه
 یافت. جهت تأیید تکثیر، محصول PCR بر روی ژل آگارز
 ۱ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید (۰/۵ $\mu g/ml$)
 بررسی شد (۱۸).

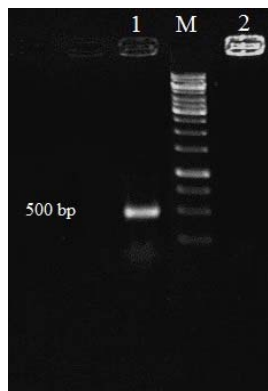
همسانه‌سازی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین: ناقل بیانی و
 محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی *NotI* و
NdeI (تهیه شده از شرکت TAKARA ژاپن) بطور جداگانه
 برش داده شدند و با استفاده از کیت تخلیص از ژل
 (شرکت Bioneer) خالص سازی شدند. در نهایت واکنش
 اتصال در دمای ۱۶ درجه بمدت ۱۴ ساعت توسط آنزیم
 T4 DNA Ligase (TAKARA ژاپن) انجام گردید. پس از
 عمل ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی (۱۸)،
 باکتری *E. coli* DH5 α تراریخته بر روی محیط گزینشگر
 حاوی ۱۰۰ $\mu g/ml$ آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد.
 جهت تأیید صحت همانندسازی، کلنیها با استفاده از
 روشهای Colony PCR و هضم آنزیمی ناقله‌های حاصل از

ژنوم از بافتهای گیاهی تازه، با استفاده از CTAB انجام
 گردید. بدین صورت که پس از جمع آوری توده سلولی،
 به میکروتیوب حاوی این توده ۴۰۰ میکرولیتر بافر
 استخراج Tris-HCl (pH:8) ۱۰۰ میلی‌مولار، EDTA ۲۰
 میلی‌مولار، NaCl ۱/۴ میلی‌مولار، CTAB ۲/۵ درصد
 وزنی/حجمی، مرکاپتواتانول ۰/۲ درصد حجمی/حجمی)
 اضافه و بمدت ۱۵ دقیقه در فریزر -۷۰ درجه قرار داده
 شد. پس از آن توده سلولی با استفاده از روشهای فیزیکی
 در بافر استخراج کاملاً حل شد. سوسپانسیون به دست
 آمده بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار
 داده شد. پس از این مدت، نمونه کاملاً یکنواخت گردید.
 در این مرحله استخراج با کلروفرم با حجمی برابر با حجم
 نمونه انجام شد. استخراج با کلروفرم بیش از یکبار انجام
 شد. پس از افزودن کلروفرم، نمونه بآرامی مخلوط شده و
 ۶ دقیقه در دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز آبی به
 میکروتیوب جدید منتقل شد و حجم برابر آن ایزوپروپانول
 به آن افزوده شد. توده DNA در این مرحله رسوب نمود.
 این توده با سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ و بمدت ۵ دقیقه
 جمع آوری شد. مایع رویی دور ریخته شد و به توده ژنوم
 ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. سپس بترتیب
 بمیزان ۰/۱ حجم، استات سدیم ۳ مولار و ۲ برابر حجم،
 اتانل به نمونه افزوده گردید. رسوب DNA با سانتریفیوژ
 دور ۱۲۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه جمع آوری و سپس در زیر
 هود خشک شد. DNA استخراج شده در ۲۰۰ میکرولیتر
 بافر TE حل شد (۳).

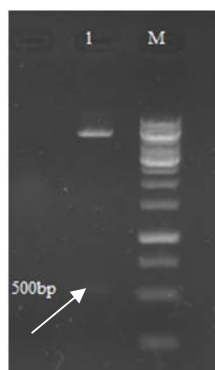
طراحی پرایمر و تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین:
 باتوجه به توالی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاینین *S. platensis*
 دربانک ژن (accession no. AY804216) و نقشه ناقل
 pET-43.1a+ آغازگرهای لازم جهت تکثیر طراحی و
 توسط شرکت تکاپو زیست سنتز گردید. توالی آغازگر
 پیشرو (Forward primer) شامل
 5'GGGAATTCCATATGAAAA
 و آغازگر CCCCCCTAACCGAAGCAGTTTC3'



شکل ۱- محصول PCR ژن زیرواحد آلفا. چاهک ۱: محصول حاصل از تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین، چاهک M: نشانگر مولکولی Kb



شکل ۲- تأیید حضور ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل با استفاده از تکنیک Colony PCR. چاهک ۱: کلنی حاوی ناقل دارای ژن، چاهک ۲: کلنی حاوی ناقل بدون ژن (کنترل منفی)، چاهک M: نشانگر مولکولی Kb



شکل ۳- تأیید حضور ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل با استفاده از هضم آنزیمی. چاهک ۱: خروج ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین از ناقل پس از انجام هضم آنزیمی، چاهک M: نشانگر مولکولی kb

کلنیهای مثبت، مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت یکی از ناقل‌های همسانه‌سازی شده جهت تأیید نهایی تعیین توالی شد.

بررسی بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین: جهت بررسی بیان، انتقال سازه به باکتری بیانی /شرشیاکلی BL21 انجام شد. بمنظور القای بیان، /شرشیاکلی BL21 حاوی ناقل pET43.1a+*cpcA* به محیط کشت TB انتخابی حاوی $100 \mu\text{g/ml}$ آمپی‌سیلین تلقیح گردید و در 37°C در دور 250 rpm انکوبه گردید. پس از رسیدن OD_{600} به 0.4 و نمونه‌گیری بعنوان کنترل منفی، IPTG با غلظت نهایی 1 mM میلی‌مولار به محیط کشت باکتریایی افزوده شد (۲). پس از کاهش دما تا 29°C درجه، نمونه‌گیری در زمانهای $1.2, 2.4, 4.8$ و 8.0 ساعت بعد از القاء انجام شد. در نهایت پروتئین کل به روش رسوب‌گیری از باکتری استخراج گردید و آشکارسازی پروتئینها با استفاده از آنالیز SDS-PAGE $5/12\%$ و رنگ آمیزی کوماسی برلیانت بلو R250 مورد بررسی قرارگرفت. تمامی محلولهای مورد استفاده در SDS-PAGE و رنگ آمیزی طبق دستورالعمل Roche Applied Science تهیه گردید (۱۶).

نتایج

تکثیر ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین: ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و ژنوم استخراج شده /سپیرولینا پلتنسیس بعنوان الگو تکثیر گردید (شکل ۱).

انجام عمل همانندسازی و بررسی صحت آن: پس از هضم آنزیمی ناقل بیانی و ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین، طی فرآیند اتصال و در کنار آنزیم T4 لیگاز، ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین وارد ناقل pET43.1a+ شد. در نهایت حضور ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در ناقل بیانی با استفاده از روشهای Colony PCR (شکل ۲)، هضم آنزیمی (شکل ۳) و تعیین توالی (شکل ۴)، تأیید شد.

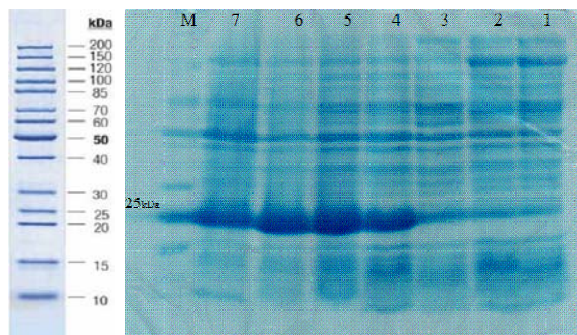
Descriptions						
Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay						
Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
gi 62126199 gb AY804216.1	Arthrospira platensis FACHB341 cpc operon, partial sequence	822	823	36%	0.0	100%
gi 359358854 H0828098.1	Arthrospira platensis edz phycocyanin beta chain (cpcB) and phycoc	818	818	36%	0.0	99%
gi 18252398 AF41127.1	Arthrospira maxima phycocyanin beta chain and phycocyanin alpha c	818	818	36%	0.0	99%
gi 359358857 H0828099.1	Arthrospira erdosensis ez phycocyanin beta chain (cpcB) and phycoc	800	800	36%	0.0	99%
gi 359358863 H0828101.1	Arthrospira jenneri fz phycocyanin beta chain (cpcB) and phycocyan	800	800	36%	0.0	99%
gi 1654092 Y09074.1	S. platensis cpcB and cpcA gene	800	800	36%	0.0	99%


```

>|gi|62126199|gb|AY804216.1| Arthrospira platensis FACHB341 cpc operon, partial sequence
Length=2086
Score = 765 bits (848), Expect = 0.0
Identities = 424/424 (100%), Gaps = 0/424 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 16  ATTCCCAAGGTCGTTTCTAAGCAGCACCGAAATCCAAGTAGCTTTTGGCCGTTTCGTC 75
Sbjct 1095  ATTCCCAAGGTCGTTTCTAAGCAGCACCGAAATCCAAGTAGCTTTTGGCCGTTTCGTC 1154
Query 76  AAGCCAAAGCTGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCA 135
Sbjct 1155  AAGCCAAAGCTGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCA 1214
Query 136  GTGGTCTGCCCAAGCAGTGTACAAACAAGTTCCTTACACCCCAATGCAGGGACCTA 195
Sbjct 1215  GTGGTCTGCCCAAGCAGTGTACAAACAAGTTCCTTACACCCCAATGCAGGGACCTA 1274
Query 196  ACTACGGCGCAGACCAACCGGTAAGGACAAATGTGCTGACATAGGCTACTACCTGC 255
Sbjct 1275  ACTACGGCGCAGACCAACCGGTAAGGACAAATGTGCTGACATAGGCTACTACCTGC 1334
Query 256  GGATGGTAACTTATTGCCTGATTGCTGGTGAAGTGGCCCATGGATGATACCTGATTG 315
Sbjct 1335  GGATGGTAACTTATTGCCTGATTGCTGGTGAAGTGGCCCATGGATGATACCTGATTG 1394
Query 316  CCGGTATTGATGAAATCAACCGGACTTTCGAGCTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCC 375
Sbjct 1395  CCGGTATTGATGAAATCAACCGGACTTTCGAGCTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCC 1454
Query 376  TGAATAACATCAAAGCTAACCAAGGCTTGGTGTGACGCTGCTGTGAAGCTAACTCCT 435
Sbjct 1455  TGAATAACATCAAAGCTAACCAAGGCTTGGTGTGACGCTGCTGTGAAGCTAACTCCT 1514
Query 436  ACCT 439
Sbjct 1515  ACCT 1518

```

شکل ۴- نتیجه Blast توالیهای به دست آمده از تعیین توالی ژن زیرواحد آلفا فیکوسیاین در بانک ژن



شکل ۵- آنالیز SDS-PAGE زیرواحد آلفا فیکوسیاین قبل و بعد از القاء با IPTG. ستون ۱: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+ قبل از القاء، ستون ۲: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+ بعد از القاء، ستون ۳: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+ -cpcA قبل از القاء، ستونهای ۴ تا ۷: باکتری BL21 حاوی ناقل pET-43.1a+ -cpcA، بترتیب ۱، ۲، ۴ و ۸ ساعت پس از القاء، ستون M: نشانگر ۱۰-۲۰۰ کیلو دالتون.

بررسی بیان با استفاده از آنالیز SDS-PAGE: سوسپانسیونهای باکتریایی در زمانهای قبل و ۲، ۴، ۸ و ۱۶ ساعت پس از افزودن IPTG تهیه شد و پروتئین کل از باکتری استخراج گردید. در بررسی SDS-PAGE نمونه‌های القایی، باند قوی پروتئینی در محدوده ۲۵-۲۰ کیلو دالتون نشانگر پروتئینی مشاهده شد، در حالی که در نمونه‌های کنترل منفی و غیرالقایی هیچ گونه باندی مشاهده نشد (شکل ۵). با توجه به وزن مولکولی زیرواحد آلفا فیکوسیاین همراه با Tag های تعبیه شده در انتهای پروتئین بیان شده (His tag, HSV tag) که حدود ۲۰/۹۲

بحث

فیکوسیاین رنگدانه جذب نوری است که بعنوان رنگ در مواد غذایی و آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین پتانسیلی جهت درمان بیماریهای ایجاد شده توسط

استرس‌های اکسیداتیو محسوب می‌شود (۱۴). علاوه بر مشکلات تولید فتوتروفی فیکوسیانین، استخراج فیکوبیلی پروتئینها از سیانوباکترها مشکل است چرا که کوچک و دارای دیواره سلولی مقاومی هستند. روشهای بسیاری جهت استخراج و خالص‌سازی فیکوسیانین انجام شده است، اما هرکدام از این روشها صرف نظر از مزایا و معایب، هزینه بر هستند (۱۹ و ۲۲). با توجه به نقش مطلوب این پروتئین و مشکلات تولید آن از سایر منابع، سیستم ساده و ارزانی که تولید آن را در مقیاس انبوه و قیمت ارزان ممکن سازد، مورد توجه قرار گرفته است. تولید فیکوسیانین نوترکیب می‌تواند یکی از این سیستمها باشد.

امروزه تقاضای زیادی برای تولید پروتئینهای نوترکیب وجود دارد. بدین منظور سیستمهای بیان ژن باکتریایی، قارچی، حشره، پستانداران و گیاهان برای تولید این پروتئینها به کار می‌روند. در حال حاضر پروتئینهای با ارزش دارویی و اقتصادی ترجیحاً در سلولهای باکتریایی تولید می‌شوند (۲۰). انتخاب یک سیستم بیانی برای تولید پروتئینهای نوترکیب در سطح بالا به فاکتورهای زیادی وابسته است. این فاکتورها، شامل ویژگیهای رشد سلولی، سطوح بیان داخل و خارج سلولی، تغییرات پس از ترجمه-ای و فعالیت زیستی پروتئین مورد نظر است. از آنجایی که ژنهای فیکوسیانین از سیستم پروکاریوتی جدا می‌شوند و همچنین عدم نیاز آنها به فرآیندهای پس رونویسی و پس ترجمه‌ای، اشرشیاکلی می‌تواند میزبان مناسبی برای تولید آن باشد.

بنابراین هدف از این تحقیق جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن زیرواحد آلفا فیکوسیانین در سیستم بیانی مناسب و شناخته شده در باکتری اشرشیاکلی بود. سیستم بیانی pET43.1a+ که در تحقیق حاضر استفاده شد، یکی از قوی‌ترین سیستمها برای همسانه‌سازی و بیان پروتئینهای نوترکیب در اشرشیاکلی است، زیرا این ناقل دارای پروموتور

قوی T7 جهت افزایش نسخه برداری ژن هدف است. همچنین بمنظور پیش بینی فرآیند شناسایی و تخلیص پروتئین تولید شده در پژوهشهای آتی، آزنیمهای برشی بگونه‌ای انتخاب شد که توالی His tag و HSVtag در انتهای ژن زیرواحد آلفا افزوده گردد. انتهای پروتئین حاصل از بیان این ژن، دارای ۶ اسید آمینه هیستیدین بوده و توسط آزنیم Anti-His tag از سایر پروتئینهای باکتریایی قابل جداسازی می‌باشد. در این صورت پروتئین نوترکیب تولید شده به صورت متصل به His tag را می‌توان با گذراندن از ستونهای کروماتوگرافی ویژه، خالص سازی کرد. HSV tag شامل ۱۱ اسید آمینه QPELAPEDPED مشتق شده از گلیکوپروتئین D ویروس هرپس است که همچنین می‌تواند در خالص‌سازی پروتئین نوترکیب کمک کند. این توالیها بدلیل کوچک بودن، تغییری در ساختار بیوشیمیایی پروتئین نوترکیب ایجاد نمی‌کنند.

باند قوی پروتئینی مشاهده شده در آنالیز SDS-PAGE حاکی از بیان بالای پروتئین نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی است که دلایل متعددی در این فرآیند تأثیرگذار بوده است. باکتری اشرشیاکلی و جلبکهای سبزآبی هر دو جزء باکتریهای حقیقی‌اند. شباهت بالای codon usage اسپیرولینا و اشرشیاکلی، می‌تواند دلیلی بر بیان بالا باشد. همچنین این شباهت، نیاز به بهینه کردن کدونی (codon optimization) را از بین می‌برد. ناقلهای بیانی نوترکیب جهت بیان بالای ژن به پروموتور و ترمیناتور قوی نیاز دارند. سیستم بیانی pET مورد استفاده در این پژوهش با داشتن پروموتور و ترمیناتور قوی نیز سبب بیان بالای ژن می‌شود. این سیستم دارای پروموتور T7 است که تنها توسط RNA پلیمراز باکترفاز T7 قادر به شناسایی است این RNA پلیمراز با سرعتی ۵ برابر RNA پلیمراز باکتریایی عمل می‌کند، بدین معنی که تحت این پروموتور بیان ژن در سطح بالا انجام پذیراست (۲۰). سیستم بیانی BL یکی از قوی‌ترین سیستمها برای بیان پروتئینهای نوترکیب در اشرشیاکلی است. ژنوم این باکتری دارای یک نسخه

کند تا تولید پروتئین نوترکیب زمانی آغاز شود که باکتری به OD بهینه رسیده باشد.

با توجه به اهمیت دارویی، غذایی و آرایشی فیکوسیانین و اینکه تاکنون گزارشی مبنی بر تولید فیکوسیانین و یا کشت اسپیرولینا پلتنسیس به صورت صنعتی جهت استخراج فیکوسیانین در ایران عنوان نشده است. انجام موفق این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز تولید صنعتی و خالص فیکوسیانین باشد.

کروموزومی از ژن RNA پلیمراز باکتریوفاژ T7 است که تحت کنترل پروموتور Lac است و بیان آن با IPTG تنظیم می‌شود. اگر IPTG با غلظت مناسب و در زمانی که باکتری به OD بهینه رسیده باشد، به محیط کشت افزوده گردد، همانطور که در این پژوهش مشاهده شد، به تولید بالای پروتئین نوترکیب کمک می‌کند. بعبارت دیگر بیان قابل القاء که توسط پروفاژ DE3 باکتری اشرشیاکلی سویه BL امکان پذیر می‌شود این فرصت را برای باکتری فراهم می‌-

منابع

- ۱- کیانی ج، شمس آرا م، ۱۳۸۴، اصول بیان پروتئینهای نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی. انتشارات اندیشه ظهور، تهران.
- 2- Abdolrasouli N., Memari H.R., Ardakani M.R., Ebrahimi M.A., Ebrahimi N., 2013, Production of Human Alpha 2b Interferon in *E. coli* Expression System. *Jundishapur Sci. Med. J.*, 12: 325-334.
- 3- Berrendero E., Perona E., Mateo P., 2008, Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 58: 447-460.
- 4- Cevallos G.C., Barrón B.L., Sánchez J.V., 2008, Toxicologic Studies and Antitoxic Properties of *Spirulina*. In: Gershwin M.E., Belay A., (eds) Boca Raton: CRC Press, 28-44.
- 5- Cohen Z., 1997, The Chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak A (Ed.) *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. Taylor & Francis, London, 175-204.
- 6- Eriksen N.T., 2008, Production of phycocyanin-a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine: Min-Rev. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80: 1-14.
- 7- Georgiou G., 1996, Expression of proteins in bacteria, in *Protein Engineering: Principles and Practice*. Wiley Liss, New York, USA.
- 8- Guan X., Qin S., Su Z., Shao F., Ge B., Li F., Tang X., 2007, Combinational biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial holo-a phycocyanin in *Escherichia coli* by using one expression vector. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 142: 52-59.
- 9- Guan X., Zhang W., Zhang X., Li Y., Wang J., Lin H., Tang X., Qin S., 2009, A potent anti-oxidant property: fluorescent recombinant α -phycocyanin of *Spirulina*. *J. Appl. Microbiol.*, 106: 1093-1100.
- 10- Hodgson J., 1993, Expression systems: A user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. *Bio/Technology*, 11: 887-893.
- 11- Jeamton W., Dulsawat S., Laoteng K., Tanticharoen M., Cheevadhanark S., 2011, Phycocyanin promoter of *Spirulina platensis* controlling heterologous expression in cyanobacteria. *J. Appl. Phyco.*, 23: 83-88.
- 12- Kawata Y., Yano S., Kojima H., Toyomizu M., 2004, Transformation of *Spirulina platensis* Strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 Transposase-Transposon DNA-Cation Liposome Complex. *Mar. Biotechnol.*, 6: 355-363.
- 13- Liu Y., Xu L., Cheng N., Lin L., Zhang C., 2000, Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *J. Appl. Phyco.*, 12: 125-130.
- 14- Minkova K.M., Tchernov A.A., Tchorbadjieva M.I., Fournadjieva S.T., Antova R.E., Busheva M.Ch., 2003, Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) fusiformis. *J. Biotechnol.*, 102: 55-59.
- 15- Raouf B., Kaushik B.D., Prasanna R., 2006, Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass Bioenergy*, 30: 537-542.

- 16- Roche molecular biochemicals, 2011, Lab FAQs - find a quick solution. 4th Edition, Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 192.
- 17- Romay C., Armesto J., Ramirez D., Gonzalez R., Ledon N., Garcia I., 1998, Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflamm. Res.*, 47: 36-41.
- 18- Sambrook J., Russel D.W., 2001, Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd Edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- 19- Soni B., Trivedi U., Madamwar D., 2008, A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycoyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. *Biore. Technol.*, 99: 188-194.
- 20- Sørensen H.P., Mortensen K.K., 2005, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 115: 113-128.
- 21- Tooley A.J., Cai Y.A., Glazer A.N., 2001, Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo-a subunit in a heterologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 10560-10565.
- 22- Zhu Y., Chen X.B., Wang K.B., Li Y.X., Bai K.Z., Kuang T.Y., Ji H.B., 2007, A simple method for extracting C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74: 244-248.

Isolation and Cloning of Phycocyanin Alpha Subunit Gene and its Production in *E.coli* Expression System

Shoja Z.¹, Rajabi-Memari H.² and Roayaei Ardakani M.³

¹Biology Dept., Faculty of Science, Islamic Azad University, Jahrom, I.R. of Iran

²Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of Iran

³Biology Dept., Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, I.R. of Iran

Abstract

Phycocyanin is a blue pigment in two eukaryote algal genera and in cyanobacteria as *Spirulina*. This pigment has various biology activities and are utilised in a number of applications in foods, cosmetics and pharmaceuticals. A lot advantage of phycocyanin studied by many researchers but the scale-up of these methods is difficult and expensive while production of recombinant phycocyanin is more convenience and inexpensive to scale up protein desire. The purpose of this study was to isolation and cloning of phycocyanin alpha subunit gene in expression vector and production of recombinant protein in *E.coli* to provide industrial production of phycocyanin. The genomic DNA of *Spirulina platensis* was prepared and used for PCR as template. phycocyanin alpha subunit gene amplified by designed specialize primers was cloned in a pET43.1a+ expression vector, under the control of T7 promoter using *NdeI* and *NotI* restriction enzymes. The cloning of phycocyanin alpha subunit gene is confirmed by colony PCR, digestion and DNA sequencing. The constructs were transformed into *E.coli* strain BL21 (DE3). Expression of phycocyanin alpha subunit gene was examined by 12.5 % SDS-PAGE analysis at 8 hrs after induction by IPTG. The SDS-PAGE analysis showed that alpha subunit phycocyanin was produced in *E.coli* expression system. Our study provided the production of recombinant phycocyanin. Also overexpression of the synthetic alpha subunit phycocyanin in a bacterial system (*E.coli* BL-21) showed that *E.coli* can be used to produce this desire protein in large quantity.

Key words: cloning, expression, phycocyanin alpha subunit gene, *Spirulina platensis*, pET-43.1a+