مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره سی و سه، شماره دو، اردیبهشت ۱۴۰۴
تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۱۱/۲۷
تاریخ پذیرش:۱۴۰۳/۰۳/۰۹

کلونینگ و بهینه‌سازی بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در اشرشیاکلی

محمدرضا حاجی‌زاده[۱]، امیر محمد جعفری کاخکی[۲]، محبوبه نبوی‌نیا[۳]، مریم نبوی‌نیا*[۳و ۴]

مقاله پژوهشی

مقدمه: افزایش گازهای گلخانه‌ای و گرم شدن زمین باعث توجه جهانی در اصلاح این پدیده گردیده است. آنزیم فورمات دهیدروژناز قادر به کاهش CO_2 در تبدیل آن به فورمات بوده که توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به متانول تبدیل می‌شود. هم‌چنین این آنزیم در فرایند تولید دارو ساکساگلیپتین می تواند مورد استفاده قرار گیرد. هدف این تحقیق ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف القا کننده IPGT (Isopropyl ß-D-1-thiogalactopyranoside)، زمان القا و محیط کشت بر تولید آنزیم فورمات دهیدروژناز می‌باشد.

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

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

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

واژه‌های کلیدی: کلونینگ، بهینه سازی، سوربیتول، فورمات دهیدروژناز،IPTG

ارجاع: حاجی زاده محمد رضا، جعفری کاخکی امیر محمد، محبوبه نبوی نیا محمد، نبوی نیا مریم. **کلونینگ و بهینه سازی بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در اشرشایا کلی**. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۴؛ ۳۳ (۲): ۱۷-۸۷۰۵.

۱- دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۳-مرکز تحقیقات علوم دارویی و داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۴- کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۴۷۶۴۶۰، پست الکترونیکی: maryamsadatnabavinia@gmail.com، صندوق پستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

مقدمه

افزایش غلظت گازهای گلخانه‌ای و عوارض ناشی از آن و به‌ویژه گرم شدن تدریجی زمین باعث توجه جهانی در اصلاح این پدیده و انتقال سیستم‌های انرژی از سوخت‌های فسیلی به منابع قابل تجدید گردیده است. این سوخت‌ها که شامل بیواتانول، بیومتانول، بیوهیدروژن و بیودیزل می‌باشد، می‌تواند به عنوان جایگزینی برای سوخت های فسیلی به‌کار گرفته شود. هر چند سوختن سوخت‌های زیستی باعث کاهش تولید CO_2 Carbon dioxide و آلودگی کمتر محیط زیست می‌شوند اما در فرآیند تولید آن‌ها حذف فلور میکروبی نرمال از روی پیش ساز این سوخت‌ها ضروری است و همین امر باعث می‌شود در فرایند آماده سازی و تولید آن‌ها مقدار زیادی CO_2 تولید شود. بنابراین یافتن راه‌های جایگزین برای تولید آن‌ها به منظور کاهش تولید CO_2 مهم است (۳-۱). آنزیم فورمات دهیدروژناز قادر به کاهش الکتروشیمیایی CO_2 در تبدیل آن به فورمات بوده که در نهایت توسط آنزیم الکل دهیدروژناز می تواند به متانول تبدیل شود. که این امر می تواند تولید سوخت‌های زیستی مانند متانول را با کاهش تولید CO_2 و کاهش آلودگی محیط زیست همراه کند (۴). علاوه براین این آنزیم از آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتر داروی ساکساگلیپتین می باشد. در طول واکنش انجام شده برای تولید ماده حد واسط داروی ساکساگلیپتین، فورمات‌دهیدروژناز NAD به NADH Nicotinamide adenine dinucleotide تبدیل می‌کند تا مجددا در واکنش بعدی مورد استفاده قرار گیرد، که برای انجام این‌کار به فورمات آمونیوم و بافر فسفات نیاز دارد (۵،۶). در کلون‌سازی ژن‌ها می توان ژن یک پروتئین با اهمیت جانوری یا گیاهی را از میزبان طبیعی جدا کرد، درون یک حامل قرار داد و به درون باکتری فرستاد. اگر مراحل به درستی صورت پذیرفته باشد، پروتئین نوترکیب توسط سلول باکتری ساخته می‌شود. در چنین حالتی می‌توان مقادیر زیادی پروتئین به‌دست آورد (۷). تولید یک پروتئین در شرایط مختلف داخل باکتری متفاوت است. زمانی استفاده از یک آنزیم در فرآیندهای صنعتی از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر است که بتوان این آنزیم را به مقدار زیاد در محیط کشت تولید و خالص کرد. فاکتورهای مهمی در بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E.coli* نقش دارند از این فاکتورها می‌توان به سرعت هم‌زدن محیط، زمان القا بیان، مدت بیان، غلظت القا کننده، نوع پروموتور، دما، ترکیبات محیط کشت، pH و نوع منبع کربن اشاره کرد، روش‌های سنتی بهینه‌سازی به‌دلیل اینکه بیان هر فاکتور را جداگانه بررسی می‌کرد اما به‌دلیل عدم محاسبه تاثیر فاکتورها بر هم معمولاً کار آمد نبوده و بسیار وقت‌گیر می‌باشند. امروزه روش‌های طراحی آزمایش می‌توانند سرعت آزمایش‌های بهینه‌سازی بیان را کاهش داده و تاثیر عوامل مختلف بر یگدیگر را مشخص کنند و شرایط بهینه تولید بیان هر پروتئین را مشخص می‌کند (۸). یکی از روش‌هایی که می‌توان برای طراحی آزمایش استفاده کرد استفاده از روش تاکوچی است مزیت این روش کاهش تعداد آزمایشات، امکان بررسی تاثیر عوامل مختلف بر یکدیگر و تعیین سطوح بهینه آزمایش می‌باشد (۹). هدف این تحقیق کلونینگ و بهینه‌سازی بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در باکتری *E.coli* و همچنین ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف IPGT، اصلاح کننده، زمان القا و محیط کشت بر بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز و بهینه‌سازی می‌باشد.

روش بررسی

پس از انتخاب توالی ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز و بهینه‌سازی کدون، این ژن برای سنتز به شرکت پیشگامان انتقال ژن ارسال و در داخل وکتور pET28α کلون گردید. به منظور مستعد کردن باکتری‌ها برای دریافت وکتور نوترکیب از محلول کلرید کلسیم ۱۰۰میلی‌مولار استفاده شد و ترانسفورم کردن باکتری‌ها با استفاده از شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. و باکتری‌ها به محیط کشت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت شد و به مدت ۱۸ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور تایید وجود قطعه ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در کلونی‌های تشکیل شده از روش Colony-PCR استفاده شد. ابتدا کلونی‌هایی به‌دست آمده از مرحله قبل با استفاده از آنس

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]
[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

استریل در کنار شعله روی محیط LB جامد حاوی کانامایسین مجدداً کشت داده شد و به مدت ۱۸ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی که با نرم افزار Gene Runer ورژن ۶ طراحی شده بودند استفاده شد. مخلوط PCR با استفاده از ۲/۵ ماکرولیتر بافر 10X، ۰/۵ ماکرولیتر از پرایمر مستقیم (GGATCC ATGAAAATCGTTCT) و معکوس (AAGCTTTCATTAAGCAAC) با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱/۵ ماکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ میلی مولار همراه با ۲۰ ماکرولیتر آب فاقد DNase تهیه شد. به جای استفاده از DNA الگو سر سمپلر را به کلونی‌های تشکیل شده تماس مختصری داده و در درون مخلوط PCR قرار داده شد. یک کنترل منفی (فاقد باکتری) و یک کنترل مثبت (پلاسمید حاوی ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز) تهیه شد. یکی از کلون های مثبت کشت داده شد و پلاسمید آن با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید شرکت اینویتروژن طبق پروتکل شرکت تخلیص گردید و از این پلاسمید به‌دست آمده برای تراسفرم باکتری *E.coli* استفاده شد. به منظور تایید نتیجه Colony-PCR هم‌چنین بررسی پلاسمید تخلیص شده نمونه‌ها داخل ژل اگاروز ۱/۵ ٪ الکتروفورز شد. آگارز در بافر TBE 1X حل شد و درون ماکروویو تا انحلال کامل اگارز و شفاف شدن محلول حرارت داده شد. سپس مقدار ۰/۵میکرولیتر رنگ DNA safe stain داخل آن زده شد و این محلول داخل کاست ژل حاوی شانه ریخته شد. بعد از بستن ژل نمونه ها به همراه بافر لودینگ 6x در کنار DNA size marker به مدت یک ساعت با ولتاژ ۸۰ درون بافرTBE 1xالکتروفورز شد. بـه منظـور انتخـاب کلونی که بیشترین توانایی تولید پروتئین را دارد، بیان کلی پـروتئین در کلـونی‌ها باکتری *E.coli* که در تست PCR از نظر وجود ژن فورمات دهیدروژنلز مثبت بودند به محیط کشت LB حاوی کانامایسین منتقل و پس از رسیدن OD رشد باکتری به ۰/۶ در طول موج ۶۰۰ توسط IPTG القا شدند. و نتایج بـا استفاده از SDS-PAGE آنالیز شد. به نمونه کلونی‌های مختلف، ۷۰ میکرولیتر بافر لیز که بـا PMSF ۹۰ میلی‌مولار (۲ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر بافر لیز) و آنزیم لیزوزیم ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴ میکرولیتر به ازای هر میلی‌لیتر بافر لیز) ترکیب شده است اضافه شد و رسوب داخل آن کـاملاً حل گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی یـخ انکوبـه شد. پس از لیز کامل نمونه‌ها به روش فریز - دفریز، سانتریفیوژ با دور ۱۶۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه انجام و رسوب از سوپرناتانت جدا شد. در مرحله بعـد بـا اسـتفاده از منحنـی اسـتاندارد برادفـورد غلظـت نمونه‌ها برای بررسی میزان بیان در فاز محلول محاسبه شد. در این مرحله به منظـور مقایسـه صـحیح میزان پروتئین بیانی در فاز محلول باکتری‌ها غلظت یکسان از نمونه‌ها برداشته شد و با بافر نمونه ۲X مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. نمونه‌ها با توجه به حجم‌های محاسبه شده به روش SDS -PAGE الکتروفورز گردید. با توجه به تاثیر دما و غلظت و نوع محیط کشت بر میزان بیان پروتئین، به منظور بررسی دقیق‌تـر این ۳ فاکتور بر بیان پروتئین از طراحی آزمایش به روش تاکوچی . با آرایه متعامد ارتوگونال L8 استفاده شده است. فاکتورهای انتخابی شامل زمان، غلظت ITPG، نوع محیط کشت و نوع القا کننده همگی در دو سطح و طبق جدول ۱ بررسی شد.

جدول ۱ طراحی آزمایش. A نشان دهنده محیط کشت LB و B نشاندهنده محیط کشت 2YT، عدد ۱ نشان‌دهنده کمترین و عدد ۲ نشان دهنده بیشترین مقدار متغیر که برای زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد القا بیان پروتئین و برای غلظت IPTG برابر ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار می‌باشد. برای دمای۲۵ درجه سانتی‌گراد نیز مراحل فوق به همین شکل انجام شد با این تفـاوت که بعد از رسیدن به OD= ۰/۶ نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد قـرار گرفتنـد و پس از رسیدن به این دما القاگر اضافه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0

برای تعیین غلظت پروتئین یک محلول به روش برادفورد، ابتدا باید منحنی استاندارد رسم شود. برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا ۱ میلی‌گرم BSA در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید سپس به‌صورت سریالی غلظت‌های مختلف از این استوک ساخته شد. برای تخلیص پروتئین از محیط کشت از ستون رزین کروماتوگرافی Ni-NTA استفاده شد.

جدول ۱: طراحی آزمایش به روش تاکوچی

تعداد آزمایشات۲	نوع محیط	غلظت IPTG	زمان
۱	A	۱	۱
۲	A	۱	1
۳	A	۲	۲
۴	A	۲	۲
۵	B	۱	۱
۶	B	۱	۱
۷	B	۲	۲
۸	B	۲	۲

نتایج

نتایج حاصل از Colony-PCR کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین نشان داد کلنی‌های شماره ۱،۲ و ۴ حاوی ژن فوزمات دهیدروژناز می‌باشند (شکل۱). شکل ۱ نتایج Colony-PCR وکتور نوترکیب را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد کلونی های تشکیل شده بر روی محیط کانامایسین از نظر وجود ژن فورمات دهیدروژناز مثبت هستند. چاهک‌ها به ترتیب از راست به چپ شامل. کنترل منفی، کنترل مثبت، سایز مارکر DNA، ۴ کلنی بعد ترانسفرم

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

پس از بررسی‌های انجام شده با توجه به اینکه بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت نامحلول بود از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای بهینه‌سازی بیان استفاده شد. برای تعیین غلظت ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز از تست برادفورد استفاده شد. ابتدا نمودار استاندارد با استفاده از سریال رقت پروتئین BSA رسم شد. معادله به‌دست آمده از این نمودار برای محاسبه غلظت نمونه‌ها استفاده شد نمودار۱. به منظور بررسی و بهینه سازی بیان پروتئین طراحی آزمایش به روش فول فاکتوریل انجام شد. چهار فاکتور به عنوان متغیرهای موثر در بیان پروتئین در نظر گرفته شد. متغیر غلظت IPTG با دو غلظت ۰/۱ و ۱ میلی‌مولار، متغیر زمان در ۲۴و ۴۸ ساعت، متغیر محیط کشت با استفاده از ۲ محیط کشت 2YT و LB و متغیر اصلاح کننده سوربیتول بود که مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تولید پروتئین طبق مدل‌های آزمایش در جدول ۲ آورده شده است.

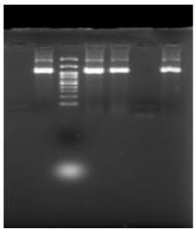
مدت زمان انکوباسیون پس القا به عنوان یک فاکتور مهم در تولید ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه بیان در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (در غلظت‌های متفاوت القاگر) جهت تولید پروتئین نوترکیب در فاز محلول بررسی شد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

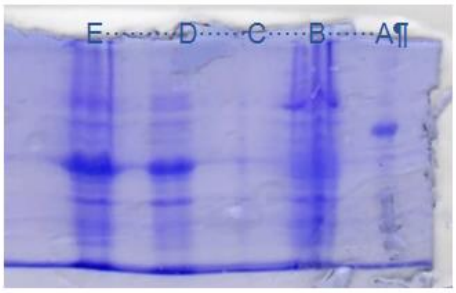
[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0

(شکل‌های ۳ تا ۶). بیان پروتئین نوترکیب در هر ۲ زمان ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از القا تفاوت ندارد. نوع محیط کشت تاثیر چندانی در بیان پروتئین ندارد. حضور سوربیتول بیان در فاز مایع را افزایش می‌دهد. کاهش غلظت IPTG باعث کاهش تولید پروتئین می‌شود (نمودار ۲ و ۳). تخلیص پروتئین در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در محیط کشت LB به همراه ۰/۱ میکرومولار IPTG و یک سی‌سی سوربیتول طی ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. پس از انجام فرایند تخلیص پروتئین نوترکیب به‌وسیله ستون رزین Ni NTA برای محیط کشت و بیدهای مگنتی Ni NTA برای لیز باکتری، نمونه پروتئین خالص شده توسط PAGE-SDS ارزیابی شد (شکل ۷). تخلیص پروتئین در دمای به منظور تایید بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز، نمونه‌های کنترل مثبت و منفی بعد از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریل‌آمید به کاغذ نیتروسلولز منتقل شدند و با استفاده از آنتی‌بادی آنتی‌هیستیدین بیان پروتئین بیان پروتئین به اثبات رسید (شکل ۸).

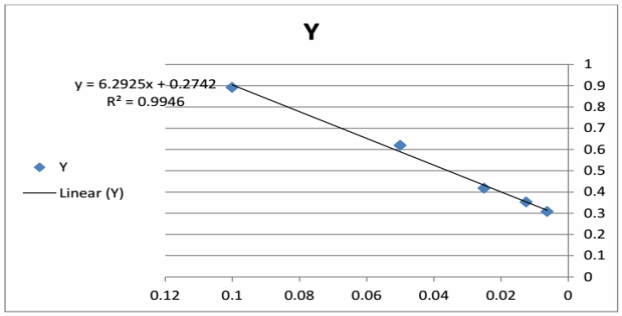


شکل ۱ نتایج Colony-PCR کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی کانامایسین



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

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



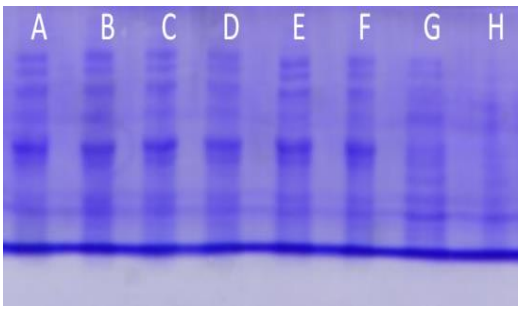
نمودار ۱: بررسی اثر محیط کشت، زمان القا، اصلاح کننده وغلظت القاگر بر بیان پروتئین نوترکیب

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]
[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

جدول۲: نتایج حاصل از تولید پروتئین طبق مدل‌های مختلف طراحی آزمایشات بهینه‌سازی تولید پروتئین

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



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

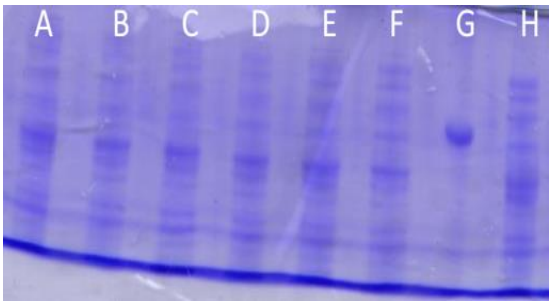
A و E: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG µ۱M پس از ۲۴ ساعت از القا

B و F: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG ۰/µ۱M پس از ۲۴ ساعت از القا

C: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

D: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG ۰/µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

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



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

A و E: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG µ۱M پس از ۴۸ ساعت از القا

B و F: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG ۰/µ۱M پس از ۴۸ ساعت از القا

C: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

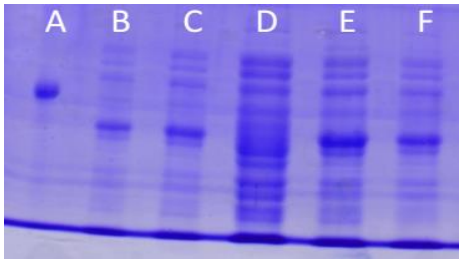
D: محیط کشت 2YT و غلظت IPTG ۰/µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0



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

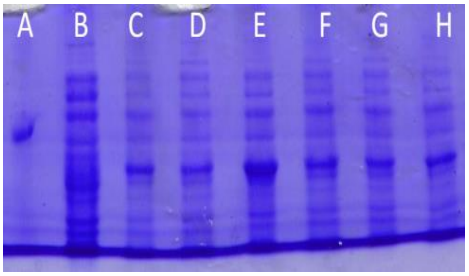
A: پروائین آلبومین به عنوان سایز مارکر پروتئین

B: محیط کشت LB و غلظت IPTG µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی‌مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

C وF: محیط کشت LB و غلظت IPTG ۰/µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی‌مولار سوربیتول پس از ۲۴ ساعت از القا

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

E: محیط کشت LB و غلظت IPTG µ۱M پس از ۲۴ ساعت از القا



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

A: پروائین آلبومین به عنوان سایز مارکر پروتئین

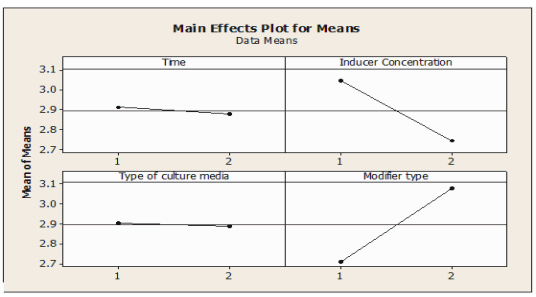
B: محیط کشت LB (کنترل منفی) پس از ۴۸ ساعت از القا

C وG: محیط کشت LB و غلظت IPTG ۰/µ۱M پس از ۴۸ ساعت از القا

H وD: محیط کشت LB و غلظت IPTG µ۱M پس از ۴۸ ساعت از القا

E: محیط کشت LB و غلظت IPTG µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

F: محیط کشت LB و غلظت IPTG ۰/µ۱M به همراه ۴/۳۹ میلی مولار سوربیتول پس از ۴۸ ساعت از القا

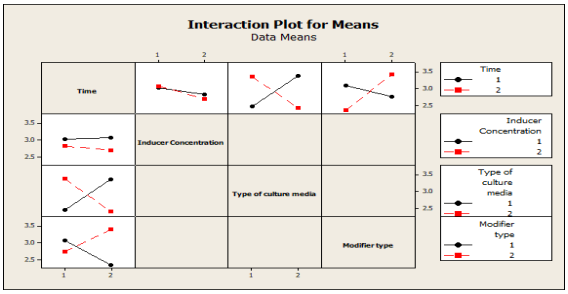


نمودار۲: بررسی اثر محیط کشت، زمان القا، اصلاح کننده وغلظت القاگر بر بیان پروتئین نوترکیب

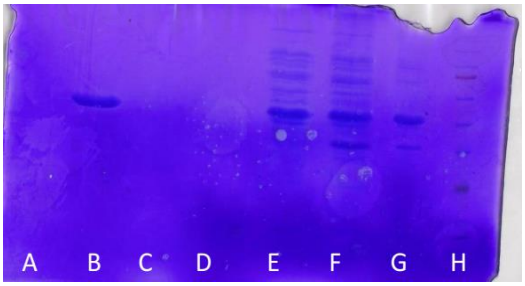
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0



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



شکل۷: مراحل تخلیص پروتئین محیط کشت

A. -

B. نمونه Elusoin.

C. نمونه شست و شو بار دوم

D. نمونه شست و شو بار اول

E. نمونه مرحله اتصال

F. نمونه بعد لیز باکتری

G. نمونه جمع آوری شده قبل از لیز باکتری

H. سایز مارکر پروتئین

شکل۸: تایید اختصاصیت پروتئین با استفاده از وسترن بلات

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

بحث

یکی از مهم‌ترین مراحل در تولید آنزیم‌ها برای استفاده در شزایط صنعتی مقدار تولید و تولید آنزیم با تاخوردگی مناسب داخل میزبان می‌باشد. تاخوردگی وپیچش نادرست پروتئین‌ها مشکل مهمی در تولید پروتئین نوترکیب درباکتری می‌باشد. پلی‌پپتیدهای خارجی مخصوصاً وقتی که به میزان زیاد تولید می‌شوند به‌صورت اینکلوژن بادی‌ها در سلول تجمع می‌یابند به همین دلیل از طریق مهندسی پروتئین و شرایط استراتژی‌هایی برای افزایش محلولیت پروتئین‌ها در باکتری *E.coli* معرفی

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]
[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

شده‌اند (۱۰). یکی از استراتژی‌های افزایش بیان پروتئین تغییر وکتور می باشد و به معنی تغییر پروموتور همراه ژن مدنظری که کون می‌شود و یا تغییر فیوژن تگfusion tag که بر محلولیت پروتئین نوترکیب بیانی تاثیر می‌گذارد می‌باشد (۱۱). بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین نوترکیب تولید آن را از لحاظ اقتصادی به صرفه می‌کند؛ پارامترهایی نظیر نوع میزبان، نوع محیط کشت، pH، دمای محیط کشت، مدت زمان انکوباسیون پس از القا و غلظت IPTG در آن دخیل می‌باشد و تاکنون بررسی‌های قابل‌توجهی در زمینه افزایش بیان و حلالیت پروتئین نوترکیب صورت گرفته است (۱۲). اکثر روش‌هایی که در بیوتکنولوژی پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود با استفاده از رویکرد یک فاکتور در زمان (OFAT one-factor-at-a-time) انجام شده و متعاقباً بهینه‌سازی می‌شود که تأثیر تنها یک عامل در زمان یک عامل را در یک زمان بررسی می‌کند (۱۳). با این‌حال، برخی از فرآیند بیوشیمیایی تحت‌تأثیر فعل و انفعالات متغیرهای آزمایشی بر هم قرار می‌گیرند. بهترین روش برای بررسی تأثیر عوامل متعدد و همچنین تأثیر فعل و انفعالات آنها بر فرآیند آزمایش، روش طراحی آماری آزمایشات است. از این روش‌های آماری برای ارزیابی متغیرهایی که بیشترین تأثیر را در تولید پروتئین نوترکیب مورد بررسی از نظر عملکرد، کیفیت محصول، خلوص و حلالیت دارند استفاده شده است. (۱۳،۱۴). با توجه به ساختار آنزیم فورمات دهیدروژناز و افزوده شدن دنباله وکتور به پروتئین نوترکیب بیانی وزن آن حدود ۴۸ کیلودالتون تخمین زده می‌شود که وزن آن روی ژل-SDS PAGEپس از رنگ‌آمیزی حدود ۴۸ کیلودالتون بود. که با پیش‌بینی انجام شده مطابقت داشت. دمای بالا می‌تواند رشد سلول را افزایش دهد، اما برای بیان پروتئین مضر است زیرا سرعت رشد بالاتر منجر به احتمال بیشتر از دست دادن پلاسمید می‌شود و باعث تقسیم نادرست حامل بیان و عدم بیان ژن نوترکیب می‌شود، به خصوص در بیان سلول حامل پلاسمید دمای اپتیمم در زمان القای پروتئین بین ۱۵-۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته می‌شود (۱۵،۱۶). از آنجا که این دما برای پروتئین‌های مختلف متفاوت می‌باشد بنابراین دمای مناسب برای تولید یک پروتئین نوترکیب توسط میزبان باید به‌دست آید. از این رو مطالعه حاضر نشان داد بیشترین بیان پروتئین در فاز محلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲۴ ساعت از زمان القا اتفاق می‌افتد. القا معمولاً در فاز اولیه یا میانه فاز لگاریتمی اتفاق می‌افتد. هرچند گزارشها نشان می‌دهند که القا در انتهای فاز لگاریتمی یا حتی در فاز سکون نیز می‌تواند بر محلولیت پروتئین و بیان کلی پروتئین تاثیرگذار باشد. به‌طورکلی القا در زمان ابتدای فاز لگاریتمی بهترین نتیجه را دارد. القا در فاز سکون کاملا اثر منفی دارد و موجب از دست رفتن بیان کلی برای بسیاری از پروتئین‌ها می‌شود. هم‌چنین بر محلولیت پروتئین نیز تاثیر منفی دارد (۱۷). در این مطالعه زمان القا با توجه به بررسی‌های اولیه ثابت در نظر گرفته شد. غلظت معمول IPTG برای بیان پروتئین نوترکیب بطور معمول بین ۱-۰/۱ میلی‌مولار است. هرچند غلظت IPTG بین ۰ تا ۱ میلی‌مولار بر سرعت رشد خاص باکتری *E.coli* تأثیر نمی‌گذارد اما مقدار بیشتر القا کننده در محیط منجر به بیان مقادیر بالاتری از پروتئین نوترکیب می‌شود (۱۵،۱۸). در مطالعه حاضر کاهش غلظت IPTGباعث افزایش تولید پروتئین در فاز محلول شد و غلظت ۰/۱ میلی‌مولار IPTG تاثیر بیشتری در بیان پروتئین به صورت محلول داشت که نشان می‌دهد برای هر نوع پروتیین نیاز به بررسی غلظت بهینه IPTG داریم. غلظت برخی نمک‌ها، پپتون و مخمرعصاره می‌تواند غلظت پروتئین نوترکیب موردنظر را افزایش دهد. محیط‌های مختلف نظیرLB ، TBو 2YTمی‌توانند جهت بهینه‌سازی بیان پروتئین مورد استفاده قرار بگیرد (۱۹،۲۰). مطالعات نشان می‌دهد هر دو ترکیب محیط کشت و شرایط کشت برای بیان پروتئین مهم هستند. محیط Luria broth (LB) به راحتی ساخته می‌شود و حاوی بیشترین ماده مورد نیاز برای کشت باکتری *E.coli* است. با این‌حال، رشد باکتری *E.coli* درLB با تراکم نسبتاً کمی متوقف می‌شود، زیرا حاوی مقادیر کم کربوهیدرات و کاتیون‌های دو ظرفیتی است (۱۰). در این مطالعه برای بررسی اثر نوع محیط کشت بر بیان پروتئین نوترکیب از دو محیط LB و 2YT

CC BY-NC 4.0

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]
[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

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

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر اصلاح کننده، غلظت القا کننده، مدت زمان پس از القا و نوع محیط کشت بر میزان بیان ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز مورد بررسی قرار گرفت. طراحی آزمایش با کمک روش فول فاکتوریل انجام گرفت که در مقایسه با روشهای سنتی با کم کردن تعداد آزمایشات و ادغام فاکتورها توانست تمام حالت‌های آزمایش و تاثیر فاکتورها بر یکدیگر را در نظر بگیرد. نتایج نشان داد وجود سوربیتول و کاهش غلظت (۰/۱IPTG میلی‌مولار) بر بیان آنزیم فورمات دهیدروژناز تاثیر مثبت می‌گذارد و در زمان ۲۴ ساعت پس از القا بیشترین مقدار ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز تولید شد. هم‌چنین محیط LB به‌عنوان بهترین محیط برای بیان بهینه ژن آنزیم فورمات دهیدروژناز شناسایی شد.

سپاس‌گزاری

مطالعه حاضر حاصل از.طرح شماره ۸۹۱۲ تصویب شده در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد می‌باشد.

حامی مالی:از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد برای حمایت مالی از این طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

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

مشارکت نویسندگان

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0

References:

1-Moua PS, Gonzalez A, Oshiro KT, Tam V, Li ZH, Chang J, et al. ***Differential Secretion Pathways of Proteins Fused to the Escherichia Coli Maltose Binding Protein (MBP) in Pichia Pastoris***. Protein Expr Purif 2016; 124: 1-9.

2-Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S, Hawthorne P. ***Land clearing the biofuel carbon debt.*** Science 2008; 319(5867): 1235-8.

3-Takacs M, Makhlynets OV, Tolbert PL, Korendovych IV. ***Secretion of Functional Formate Dehydrogenase in Pichia Pastoris.*** Protein Eng Des Sel 2017; 30(3): 279-84.

4-Fargione J, Hill J, Tilman D, Polasky S, Hawthorne P. ***Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt.*** Science 2008; 319(5867): 1235-8.

5-Hanson RL, Goldberg SL, Brzozowski DB, Tully TP, Cazzulino D, Parker WL, et al. ***Preparation of an Amino Acid Intermediate for the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor, Saxagliptin, Using a Modified Phenylalanine Dehydrogenase.*** Advanced Synthesis & Catalysis 2007; 349(8- 9): 1369-78.

6-Hoelsch K, Sührer I, Heusel M, Weuster-Botz D. ***Engineering of Formate Dehydrogenase: Synergistic Effect of Mutations Affecting Cofactor Specificity and Chemical Stability***. Appl microbiol biotechnol 2013; 97: 2473-81.

7-Brown TA. ***Gene Cloning and DNA Analysis: an Introduction***. 6 ed. John Wiley & Sons; 2010.

8-Uhoraningoga A, Kinsella GK, Henehan GT, Ryan BJ. ***The Goldilocks Approach: A Review of Employing Design of Experiments in Prokaryotic Recombinant Protein Production***. Bioengineering 2018; 5(4): 89.

9-Rao RS, Kumar CG, Prakasham RS, Hobbs PJ. ***The Taguchi Methodology as a Statistical Tool for Biotechnological Applications: A Critical Appraisal***. Biotechnol J 2008; 3(4): 510-23.

10-Vera A, González- Montalbán N, Arís A, Villaverde A. ***The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins is Enhanced at Low Growth Temperatures***. Biotechnol bioeng 2007; 96(6): 1101-6.

11-Gopal GJ, Kumar A. ***Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia Coli***. Protein J 2013; 32(6): 419-25.

12-Papaneophytou C. ***Design of Experiments as a Tool for Optimization in Recombinant Protein Biotechnology: From Constructs to Crystals.*** Mol Biotechnol 2019; 61(12): 873-91.

13-Mosrati R, Nancib N, Boudrant J. ***Variation and Modeling of the Probability of Plasmid Loss as a Function of Growth Rate of Plasmid- Bearing Cells of Escherichia Coli during Continuous Cultures***. Biotechnol bioeng 1993; 41(4): 395-404.

14-Betiku E. ***Molecular Chaperones Involved in Heterologous Protein Folding in Escherichia Coli***. Biotechnol Molecular Biology Reviews 2006; 1(2): 66-75.

15-Horii T, Ogawa T, Ogawa H. ***Organization of the Reca Gene of Escherichia Coli***. Proc Natl Acad Sci 1980; 77(1): 313-7.

16-Berrow NS, Büssow K, Coutard B, Diprose J, Ekberg M, Folkers G, et al. ***Recombinant Protein Expression and Solubility Screening in Escherichia Coli: A Comparative Study.*** Acta Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006; 62(Pt 10): 1218-26.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0

17-Antoniou G, Papakyriacou I, Papaneophytou C. ***Optimization of Soluble Expression and Purification of Recombinant Human Rhinovirus Type-14 3C Protease Using Statistically Designed Experiments: Isolation and Characterization of the Enzyme***. Mol Biotechnol 2017; 59(9-10): 407-24.

18-Yan F, Qian M, Yang F, Cai F, Yuan Z, Lai S, et al. ***A Novel Pro-Apoptosis Protein PNAS-4 From Xenopus Laevis: Cloning, Expression, Purification, and Polyclonal Antibody Production***. Biochemistry (Moscow) 2007; 72(6): 664-71.

19-Kram KE, Finkel SE. ***Rich Medium Composition Affects Escherichia Coli Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture***. Appl Environ Microbiol 2015; 81(13): 4442-50.

20-Tseng C-L, Leng C-H. ***Influence of Medium Components on the Expression of Recombinant Lipoproteins in Escherichia Coli***. Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93(4): 1539-52

21-Zhang H, Li Y, Chen X, Sheng H, An L. ***Optimization of Electroporation Conditions for Arthrobacter with Plasmid PART2***. J Microbiol Methods 2011; 84(1): 114-20.

22-Lebendiker M, Danieli T. ***Production of Prone-to-Aggregate Proteins***. FEBS Letters 2014; 588(2): 236-46.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 33| NO 2 | Apr 2025

Received: 16 Feb 2024
Accepted: 29 May 2024

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

Mohammad Reza Hajizadeh[1], Amir Mohamad Jafari Kakhki[2], Mahboubeh Nabavinia[3], Maryam Sadat Nabavinia[*3,4]

Original Article

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

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

Results: PCR results confirmed the amplification of formate-dehydrogenase enzyme gene in *E. coli* DH5α. Induction time and concentration negatively impacted on expression. The highest level of expression of the recombinant protein was observed 24 hours post-induction at a temperature of 25°C, with an IPTG concentration of 0.1 mM in the presence of sorbitol. LB culture medium was chosen as the best expression medium.

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

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

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

[1]School of Pharmacy, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
[2]School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
[3]Traditional Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciencese, Yazd, Iran.
[4]Student Research Committee, Shahid Sadoughi University of Medical Sciencese, Yazd, Iran.
***Corresponding author: Tel:** 09132476460**, email:** maryamsadatnabavinia@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-05-11]

[DOI: 10.18502/ssu.v33i2.18517]

CC BY-NC 4.0