



Secretory Expression of Recombinant Human Calcitonin in Green Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Naghoosi H.¹ MSc,
Ofoghi H.*¹ PhD,
Amini-Bayat Z.¹ PhD,
Moazami N.¹ PhD

How to cite this article

Naghoosi H, Ofoghi H, Amini-Bayat Z, Moazami N. Secretory Expression of Recombinant Human Calcitonin in Green Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. Modares Journal of Biotechnology. 2019; 10(1):29-35.

¹Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Shahid Ehsanirad Street, Ahmad Abad Mostoufi, Azadegan Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 3353136846

Phone: +98 (21) 56276325

Fax: +98 (21) 56276636
ofoghi@irost.ir

Article History

Received: November 21, 2016

Accepted: March 1, 2018

ePublished: March 16, 2019

ABSTRACT

Aims Calcitonin is a small peptide hormone that is produced by parafollicular thyroid cells in human and regulates the metabolism of calcium and phosphorus. It is therapeutically used in treatment of calcium-related disorders and osteoporosis. Recombinant calcitonin production encounters with several difficulties due to instability and low molecular weight, and also needs further treatment in prokaryotic systems. Microalgae have recently garnered high attention for their potential in expression of recombinant proteins. The aim of present study was to assess the ability of *Chlamydomonas Reinhardtii* to express recombinant human calcitonin.

Materials & Methods The optimized calcitonin coding sequence and carbonic anhydrase secretory signal was cloned in Pchlamy_3 and Pchlamy_4 vectors. The recombinant plasmids were transformed to wild type and also a cell wall deficient strain of *Chlamydomonas Reinhardtii* by electroporation. Transformed strains were screened by colony PCR method and selected strains were cultivated to produce recombinant calcitonin. Culture media have been collected after cells growth and assayed by ELISA method.

Findings Pchlamy_3 vector could not express the target sequence as desired and all the recombinant strains were resulted from Pchlamy_4 vector. The wild type strain also did not show desired yield and only cell wall deficient strain was successfully transformed. The yield of recombinant calcitonin produced by positive strain was about 1 pg/ml.

Conclusion The results of this study show that the used strategy for secretory production of recombinant calcitonin was successful and it could be used in further studies.

Keywords Calcitonin; Microalgae; Cloning; Posttranslational Modifications

CITATION LINKS

[1] Cloning and expression of human calcitonin genes in transgenic potato plants [2] Calcitonins - physiological and pharmacological aspects [3] Biology of peptides from the calcitonin genes [4] Forty years of calcitonin--where are we now? a tribute to the work of Iain Macintyre, FRS [5] Chemical synthesis and expression of the human calcitonin gene [6] Human calcitonin (hCT) gene expression and secretion by *Pichia pastoris* [7] Transgenic microalgae as green cell-factories [8] The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics [9] The development of microalgae as a bioreactor system for the production of recombinant proteins [10] *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: Current status and perspectives [11] *Chlamydomonas* sourcebook. 1st Volume [12] Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* [13] Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [14] Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system [15] Production of recombinant salmon calcitonin by amidation of precursor peptide using enzymatic transacylation and photolysis in vitro [16] Large-scale preparation of recombinant human calcitonin from a multimeric fusion protein produced in *Escherichia coli* [17] Chemical synthesis and expression in *E. coli* of a human Val8-calcitonin gene by fusion to a synthetic human interferon-gamma gene [18] Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: Secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption [19] High-level synthesis in *Escherichia coli* of recombinant human calcitonin: Collagenase cleavage of the fusion protein and peptidylglycine α -amidation [20] Production of bioactive salmon calcitonin from the nonendocrine cell lines COS-7 and CHO [21] Expression of human calcitonin by microencapsulated recombinant myoblasts

بیان ترش‌خی کلسیتونین نوترکیب انسانی در ریزجلبک سبز کلامیدوموناس رینهاردتی

حامد ناقوسی MSc

پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

حمیده افقی * PhD

پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

زهرا امینی‌بیات PhD

پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

نسرین معظمی PhD

پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده

کلسیتونین هورمون پپتیدی کوچکی است که در انسان توسط سلول‌های پارافولیکولار تیروئید تولید شده و تنظیم‌کننده متابولیسم کلسیم و فسفر است. کاربرد دارویی کلسیتونین در درمان ناهنجاری‌های مربوط به کلسیم و پوکی استخوان است. به علت وزن مولکولی پایین و ناپایداری آن، تولید نوترکیب کلسیتونین با مشکلات زیادی همراه بوده و همچنین تولید در سیستم پروکاریوتی به تیمارهای بعدی برای دستیابی به مولکول بالغ نیاز دارد. اخیراً به توانایی ریزجلبک‌ها در بیان پروتئین‌های نوترکیب توجه زیادی جلب شده است. لذا هدف این تحقیق، مطالعه توانایی *Chlamydomonas Reinhardtii* در تولید ترش‌خی کلسیتونین انسانی نوترکیب بود.

مواد و روش‌ها: توالی کدکننده کلسیتونین بهینه‌سازی شده به همراه توالی راهبر ترش‌خی کربونیک‌انیدراز در وکتورهای Pchlamy_3 و Pchlamy_4 کلون شد. پلاسمیدهای نوترکیب به سویه وحشی و سویه واجد دیواره ناقص *Chlamydomonas Reinhardtii* با روش الکتروپوریشن منتقل شدند. سویه‌های نوترکیب با روش کلنی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز غریالگری شده و سویه‌های منتخب برای تولید کلسیتونین کشت داده شدند. پس از رشد سویه‌ها، محیط کشت جمع‌آوری شده و با روش الیزا مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: وکتور Pchlamy_3 از قابلیت مناسبی برای بیان توالی هدف برخوردار نبوده و سویه‌های نوترکیب همگی با استفاده از وکتور Pchlamy_4 حاصل شدند. همچنین سویه وحشی نیز کارایی مناسبی جهت نوترکیبی نداشته و نوترکیبی فقط در سویه واجد دیواره ناقص دیده شد. میزان کلسیتونین تولیدی در سویه مثبت به صورت تقریبی یک پیکوگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که راهبرد به‌کاررفته برای تولید ترش‌خی کلسیتونین نوترکیب موفقیت‌آمیز بوده و برای مطالعات بعدی قابل استفاده است.

کلیدواژه‌ها: کلسیتونین، ریزجلبک، کلونینگ، پیرایش پساترجمه‌ای

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۰

* نویسنده مسئول: foghi@irost.ir

مقدمه

کلسیتونین (CT)، هورمون پپتیدی کوچکی است که در پستانداران توسط سلول‌های پارافولیکولار تیروئید ترشح شده و در تنظیم متابولیسم کلسیم و فسفر نقش اساسی ایفا کرده و تنظیم‌کننده هومئوستازی کلسیم است. کلسیتونین در معدنی‌شدن سلول‌های استخوانی نقش مهمی ایفا کرده و موجب افزایش تراکم مواد معدنی استخوان و استحکام آن می‌شود. این هورمون مهارکننده آزاد شدن کلسیم از استخوان بوده و مانع از دست‌رفتن کلسیم استخوان در شرایط استرس کلسیم نظیر حاملگی و شیردهی است و همچنین در درمان پوکی استخوان، بیماری پازو و موارد کارسینوما تیروئید کاربرد دارویی دارد [1].

فعالیت کلسیتونین ویژگی گونه‌ای نداشته و می‌توان از کلسیتونین

سایر گونه‌ها نظیر ماهی، مارماهی و خوک در درمان بیماری‌های انسانی استفاده نمود، با این حال استفاده طولانی‌مدت از کلسیتونین هترولوگ موجب بروز واکنش حساسیتی، کاهش تدریجی اثر دارویی یا بی‌اثر شدن آن می‌شود و لذا در این موارد به کلسیتونین انسانی نیاز است [2].

کلسیتونین انسانی پپتید کوچکی با وزن ۳/۴ کیلوالتون واجد ۳۲ آمینواسید است. کمپلکس ژن کدکننده کلسیتونین روی کروموزوم شماره ۱۱ قرار دارد و یک خانواده کوچک از پپتیدها شامل کلسیتونین و پپتید وابسته به ژن کلسیتونین (CGRP) را کد می‌کند و اولین بار توسط یاکویس و همکاران در سال ۱۹۸۱ کلون شد. این ژن واجد دو نسخه آلفا و بتا است که نسخه بتا کدکننده CGRP بوده و از نسخه آلفا طی فرآیند پیرایش متناوب، دو mRNA مربوط به کلسیتونین و CGRP حاصل می‌شود که محصول mRNA مربوط به کلسیتونین یک پروپپتید اولیه واجد ۱۴۱ آمینواسید است. ۲۵ آمینواسید ابتدایی زنجیره، توالی رهبر است که پروپپتید را به مسیر ترش‌خی هدایت می‌کند. این زنجیره اولیه طی فرآیندهای پس از ترجمه در دو ناحیه برش خورده و پلی‌پپتید نهایی واجد ۳۲ آمینواسید تشکیل می‌شود که در دستگاه گلژی، انتهای کربوکسیل آن آمیده شده و کلسیتونین بالغ حاصل می‌شود [3].

کلسیتونین بالغ ۳ ویژگی ساختاری مهم دارد که عبارتند از: ۱) وجود باند دی‌سولفیدی بین سیستم‌های ۱ و ۷، ۲) دارا بودن زنجیره آب‌گریز آلفا و ۳) آمیده‌شدن پرولین انتهای کربوکسیل زنجیره پروتئین که این امر نقش اساسی را در فعالیت بیولوژیک آن ایفا می‌کند [4].

امروزه اکثر داروهای پروتئینی به کمک تکنیک‌های نوترکیبی و مهندسی ژنتیک تولید می‌شوند. هورمون کلسیتونین، پلی‌پپتیدی کوچک است که تولید آن از طریق روش‌های ژنتیکی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. با توجه به اینکه داروی کلسیتونین انتخابی مهم در درمان و پیشگیری از بیماری پوکی استخوان به شمار می‌آید، تلاشی جهانی برای به‌دست‌آوردن فرمول‌های جدید از این هورمون را باعث شده است. بیان پپتیدهای کوچک به فرم کامل و مقاوم در برابر تجزیه یکی از چالش‌های بزرگ تکنولوژی مهندسی ژنتیک است. بیان و تولید کلسیتونین انسانی در میزبان پروکاریوتیک *E. coli* از اولین تلاش‌ها برای تولید این هورمون به‌صورت نوترکیب به شمار می‌آید. ایوانوف و همکاران در سال ۱۹۸۷ عدم موفقیت در تولید کلسیتونین نوترکیب در *E. coli* را ناشی از کوچک بودن و تجزیه آن دانستند [5] و پس از آن راهکارهای مختلفی برای تولید کلسیتونین نوترکیب در میزبان‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی ارائه شد. برخی از این راهکارها شامل الیگومریزه‌کردن توالی و تولید الیگومر یا اتصال به پروتئین‌های بیان‌بلا در میزبان پروکاریوتی بوده است. با این حال آمیداسیون انتهای کربوکسیل کلسیتونین که نقش حیاتی در فعالیت زیستی این پپتید دارد فقط در سلول‌های یوکاریوتی صورت می‌گیرد که تاکنون تولید کلسیتونین نوترکیب در رده‌های مختلف سلولی پستانداران و حشرات نتوانسته مقادیر بالای کلسیتونین را تولید کند که از نظر اقتصادی به‌صرفه باشد؛ در میزبان‌های مخمر یا گیاهی نیز تاکنون آمیداسیون کلسیتونین مشاهده نشده است [6].

امروزه توجه زیادی به تولید پروتئین‌های نوترکیب در سلول‌های گیاهی جلب شده است. سلول‌های گیاهی و جلبک‌ها معمولاً جز عوامل بی‌خطر طبقه‌بندی شده (GRAS)، از نظر آلودگی به توکسین‌ها و عوامل پاتوژن انسانی اعم از پریون، ویروس یا

مورد استفاده در این مطالعه شامل سویه وحشی (*C. reinhardtii* (C. reinhardtii cw15) 137C) و سویه با دیواره ناقص (*C. reinhardtii* (C. reinhardtii cw15) 137C) بود. به منظور تکثیر پلاسمیدها از میزبان واسطه *E. coli* TOP10 استفاده شد. کشت سویه‌های *C. reinhardtii* در محیط ترپس-استات-فسفات (TAP) انجام پذیرفت [14]. برای تهیه محیط جامد، ۱/۳-۱/۵ درصد وزنی، پودر آگار-آگار اضافه شده و در صورت نیاز به محیط TAP-Sucrose، سوکروز به میزان ۱۳/۷ گرم بر لیتر (معادل ۴۰ میلی‌مولار) به محیط TAP اضافه شده و اتوکلاو گردید. در صورت نیاز به افزودن آنتی‌بیوتیک‌های هایگرومایسین و ژئوسین، محلول آنتی‌بیوتیک استریل با غلظت نهایی به ترتیب ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط اضافه شدند. محیط‌های کشت‌شده در انکوباتور گیاهی با نوردهی یکنواخت با شدت ۵۰ میکرو انیشتین بر مترمربع بر ثانیه و دمای ۲۵°C قرار گرفتند. کشت‌های مایع نیز روی همزن با سرعت ۱۲۰rpm در همان شرایط نور و دما قرار گرفتند.

برای کشت باکتری *E. coli* از محیط کشت ال‌بی‌براث (شارلو؛ اسپانیا) استفاده گردید که حسب مورد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت نهایی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به آن اضافه شد. محیط‌های کشت‌شده نیز در دمای ۳۷°C نگهداری شده و کشت مایع نیز با سرعت ۱۵۰rpm هم زده شد.

وکتورهای بیانی مورد استفاده، دو پلاسمید pChlmy_3 و pChlmy_4 هستند که به ترتیب در کیت‌های GeneArt® مهندسی کلامیدوموناس و بیان پروتئین کلامیدوموناس توسط شرکت سازنده (اینویترژن؛ ایالات متحده) ارائه شده‌اند.

طراحی و سنتز ژن کلسیتونین نوترکیب: از آنجا که آمیداسیون پپیدها در مسیر ترشحی صورت می‌گیرد، تولید ترشحی کلسیتونین مد نظر قرار گرفت. برای این امر از توالی هدایت‌گر ترشحی آنزیم کربونیک انیدراز *C. reinhardtii* [12] در بالادست توالی کلسیتونین استفاده شد. یک واحد گلاسیین نیز در انتهای کربوکسیل اضافه شد که برای آمیداسیون ضروری است. همچنین برای کلونینگ در پلاسمید pChlmy_3 جایگاه‌های برش *Kpn I* و *Not I* به ترتیب در بالادست و پایین‌دست توالی قرار گرفته و توالی حاصله برای بهینه‌سازی و سنتز به شرکت بیوماتیک (کانادا) سفارش داده و توالی سنتز شده با طول ۱۸۳ جفت باز به صورت کلون‌شده در پلاسمید pBMH تحویل گرفته شد.

کلونینگ در وکتورهای بیانی و تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب: برای کلون کردن در پلاسمید pChlmy_3 از آنزیم‌های محدودالایتر *Kpn I* و *Not I* استفاده شد. پلاسمید واجد توالی نوترکیب با این دو آنزیم هضم شده و قطعه هدف از ژل آگارز استخراج شد. پلاسمید pChlmy_3 نیز با همین دو آنزیم هضم شده و قطعه و وکتور با نسبت ۳ به ۱ به همراه آنزیم T4 DNA ligase (فرمنتاس؛ لیتوانی) وارد واکنش اتصال شدند. پلاسمید نوترکیب حاصله CTchlmy3 نامیده شد.

برای کلون کردن در پلاسمید pChlmy_4 ابتدا لازم بود با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) جایگاه‌های برش آنزیمی به توالی اضافه شود. برای این کار از پرایمرهای زیر استفاده شد:

۵'-CGAATTCATGGCGCGTACTG-3' F: واجد جایگاه برش *Pst I* و ۳'-ATACTGCAGTCAGCCCGGGG-5' R: واجد جایگاه برش *EcoR I*. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از بافر آماده مصرف (بکتاتجهیز؛ ایران) انجام گرفت. هر پرایمر با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار به مخلوط واکنش اضافه شد.

باکتری ایمن هستند و استفاده خوراکی آنها نیز میسر است. این سلول‌ها یوکاریوت بوده و به خوبی قادر به تولید پروتئین‌های چند زیرواحدی و با ساختارهای سه‌بعدی پیچیده هستند. همچنین رشد آنها برخلاف سلول‌های پستانداران به فاکتورهای رشد گران‌قیمت و شرایط دشوار نیازمند نیست و با توجه به قابلیت فتوسنتز، با استفاده از منابع غذایی ساده قادر به رشد و تولید محصول هستند [7]. علی‌رغم مزیت‌های جالب توجه گیاهان برای تولید پروتئین‌های نوترکیب، برخی مشکلات در استفاده تجاری از آنها وجود دارد؛ از جمله زمان طولانی مورد نیاز برای رسیدن به گیاه بالغ تراریخت قابل کشت در مزرعه و خطر انتقال ژن به سایر گیاهان در محیط زیست. با این حال ریزجلیک‌ها واجد تمامی خصوصیات مطلوب برای تولید پروتئین نوترکیب هستند: سرعت رشد بالا، کارایی بالای بیان پروتئین نوترکیب با فعالیت زیستی، ایمنی بالا، سهولت دست‌ورزی ژنتیکی، قابلیت تولید پروتئین‌های پیچیده و اعمال تغییرات پس از ترجمه [8].

جلیک تک‌سلولی کلامیدوموناس رینهاردتی (*Chlamydomonas reinhardtii*) به‌عنوان یک مدل برای مطالعه گیاهان پیچیده‌تر، یکی از شناخته‌شده‌ترین گونه‌های جلیکی است که تاکنون مطالعات فراوانی روی ساختار، فیزیولوژی و ژنتیک آن صورت گرفته است. این گونه واجد خصوصیتی است که آن را کاندید مناسبی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب نموده است: از جمله شناخت کامل توالی ژنوم هسته، کلروپلاست و میتوکندری، وجود تکنیک‌های مناسب برای ترانسفورماسیون با کارایی بالا، سرعت رشد سریع با زمان تقسیم ۸-۱۰ ساعته، امکان رشد با تراکم بالا در بیوراکتور، قابلیت اعمال تغییرات پس از ترجمه، همسان‌بودن سلول‌ها و عدم بروز مشکلات ناشی از استخراج محصول از بافت‌های مختلف در مقایسه با گیاهان ترانسژن، امکان رشد در محیط حداقلی به‌علت قابلیت فتوسنتز و همچنین رشد هتروتروفی در حضور منابع کربن نظیر استات؛ البته در مطالعات اولیه میزان بیان ژن‌های نوترکیب کلون‌شده در هسته سلول پایین‌تر از حد انتظار بود که این امر با کمک استراتژی‌هایی نظیر بهینه‌سازی توالی هدف بر مبنای کدون‌های ترجیحی میزبان، به‌کارگیری اینترون‌ها و توالی‌های غیرترجمه‌شونده (UTR) میزبان در توالی نوترکیب، استفاده از پرموتورهای با بیان بالا، بیان پروتئین نوترکیب به‌صورت فیوژن، استفاده از توالی‌های هدایت‌گر برای انتقال پروتئین نوترکیب به سایر اندامک‌ها نظیر کلروپلاست یا شبکه اندوپلاسمی و ترشح به خارج سلول برای دورماندن از دسترس پروتئازهای سیتوپلاسم، این امر بهبود یافته است [8-10].

توانایی ریزجلیک کلامیدوموناس رینهاردتی در تولید و بیان پروتئین‌های نوترکیب به اثبات رسیده است، با این حال تاکنون فقط تولید نوترکیب پروتئین‌های معدودی در آن بررسی شده است [8]. با توجه به تغییرات پس از ترجمه مورد نیاز برای فعالیت بیولوژیک کلسیتونین و برتری *C. reinhardtii* نسبت به سایر سیستم‌های یوکاریوتی بیان پروتئین نوترکیب از نظر هزینه پایین و اعمال تغییرات پس از ترجمه، در این مطالعه، توانایی *C. reinhardtii* در بیان کلسیتونین انسانی مورد بررسی قرار گرفته تا بتوان سیستمی با قابلیت تولید کلسیتونین مشابه پپتید طبیعی با هزینه پایین و امنیت بالا طراحی نمود.

مواد و روش‌ها

سویه‌ها، شرایط کشت و وکتورهای مورد استفاده: سویه‌های جلیکی

F و '5'GACTGATCAGCAGAAACG3'، استفاده شد. پرایمر حدود ۵۰ نوکلئوتید بالادست پروموتور و پرایمر R به ناحیه 3'-UTR متصل شده و موجب تکثیر قطعه‌ای به طول ۹۰۰ جفت‌باز (فاقد قطعه هدف) می‌شود که در حضور توالی هدف به وزن ۱۸۳ جفت‌باز، محصول PCR معادل ۱۰۸۳ جفت‌باز می‌شود. مخلوط واکنش PCR به شرح زیر است: بافر 1X Taq، ۰/۲ میلی‌مولار از هر دئوکسی‌نوکلئوتیدتری فسفات (dNTPs: سیناکلون؛ ایران)، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر، ۱۵۰-۵۰ نانوگرم DNA الگو، واحد DNA پیلیمراز Taq، (سیناکلون؛ ایران)، ۴٪ دی‌متیل‌سولفید (DMSO) و ۰/۶ میکرولیتر کلریدمنیزیم از محلول استوک ۱۰۰ میلی‌مولار.

چرخه دمایی شامل دمای ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه و پس از آن ۳۵ مرحله دماهای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸/۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه. مرحله آخر نیز ۱۰ دقیقه دمای ۷۲°C است. کلنی PCR پلاسمید CTchlamy4 با استفاده از همان پرایمرهای مورد استفاده در کلونینگ و در شرایط دمایی ۹۵°C به مدت ۴ دقیقه و پس از آن ۳۵ مرحله دماهای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله آخر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C صورت گرفت.

بیان محصول نوترکیب و سنجش آن: سوبه‌هایی که در آزمایش PCR واجد توالی نوترکیب بودند برای مراحل بعدی در حجم بالاتر کشت داده شدند. برای افزایش حجم، ابتدا از تک‌کلنی مورد نظر در حجم ۲۰ میلی‌لیتر محیط واجد آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و هنگامی که کشت به اواسط فاز لگاریتمی رسید (تراکم سلولی 10^6 - 5×10^6 سلول در میلی‌لیتر)، از آن به حجم حداکثر ۴۰۰ میکرولیتر تلقیح شد. با توجه به این امر که بیان محصول به صورت ترش‌حی است، نیازی به استخراج محصول نبوده و صرفاً سلول‌ها به روش سانتریفوژ جداسازی شده و مایع روبی برای مصارف بعدی جداسازی شد. از آنجا که پروتئین نوترکیب در ریزجلبک بیان پایینی داشته و همچنین کلسیتونین پیتیدی کوچک است که در سایر میزبان‌ها نیز بیان پایینی دارد، برای سنجش محصول و تحلیل‌های بعدی به افزایش غلظت و تغلیظ نمونه نیاز است. به منظور تغلیظ از روش خشک‌کردن انجمادی استفاده شد. در این روش محیط کشت جدا شده منجمد شد و در دستگاه فریز-درایر قرار گرفت. پودر حاصله در زمان نیاز، مجدداً در مقدار کمتری آب دیونیزه (حداکثر ۱۰٪ حجم اولیه) حل شد.

همچنین برای بررسی حضور کلسیتونین نوترکیب درون سلولی نیز، عصاره سلولی استخراج شد. به این منظور، بافر لیز با ترکیب زیر تهیه شد: تریس‌کلراید با غلظت میلی‌مولار و pH=۸، کلرید سدیم ۴۰۰ میلی‌مولار و ۱٪ توپین ۲۰. هنگام مصرف، یک قرص مهارکننده پروتئاز (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets) به ۲۵ میلی‌لیتر بافر لیز اضافه شد. حدود ۰/۵ گرم زیست‌توده جلبکی در ۵ میلی‌لیتر بافر لیز مخلوط شده و به هاون چینی ریخته می‌شود، پس از آن نیتروژن مایع به هاون اضافه شده و سلول‌ها در حالت انجماد کوبیده و لیز می‌شوند. عصاره سلولی حاصله سانتریفوژ شده و مایع روبی برای استفاده بعدی جداسازی می‌شود.

سنجش تولید کلسیتونین با روش الیزا انجام پذیرفت. به این منظور از کیت کمی الیزای کلسیتونین ارایه شده توسط شرکت (بایومیریکا، ایالات متحده) استفاده شد. در این کیت روش الیزای دوطرفه با استفاده از دو آنتی‌بادی مونوکلونال موشی اختصاصی کلسیتونین انسانی به کار گرفته شده است و حساسیت آن در حد

پروفایل دمایی واکنش به صورت زیر است: واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل از دماهای ۹۵°C، ۶۵°C و ۷۲°C هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه، نگهداری در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های ذکر شده مورد هضم قرار گرفت و پلاسمید نیز به همین صورت تیمار شده و پس از استخراج و تخلیص قطعات از ژل آگارز، کلونینگ با روش ذکر شده در بالا انجام گرفته و پلاسمید نوترکیب حاصله، CTchlamy4 نامیده شد.

هر دو پلاسمید نوترکیب با روش شوک حرارتی و تیمار با کلرید کلسیم به باکتری *E. coli* TOP10 منتقل شدند. باکتری‌های نوترکیب سپس به محیط کشت ال‌بی واجد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین منتقل شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شد. برای تایید صحت کلونینگ، سوبه‌های مورد نظر در محیط ال‌بی برات واجد آمپی‌سیلین کشت داده شده و پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (یکتاتجهیز؛ ایران) استخراج شده و با آنزیم‌های محدودالتر مورد استفاده در کلونینگ تیمار شدند. در نهایت پلاسمید تایید شده مورد توالی‌یابی نیز قرار گرفت. به منظور توالی‌یابی پلاسمید CTchlamy3 از پرایمر F_{seq} که حدود ۱۰۰ نوکلئوتید بالادست پروموتور متصل می‌شود، استفاده شد. توالی آن عبارت است از: '5'-ACTTGCAACCCCTTATCCGG-3'. توالی یابی پلاسمید CTchlamy4 به صورت دوطرفه و با همان پرایمرهای مورد استفاده برای افزودن جایگاه‌های برش آنزیمی انجام شد. در نهایت سوبه واجد پلاسمید تایید شده در حجم بالا کشت داده شده و پلاسمید آن برای مصارف بعدی، استخراج و در دمای ۲۰°C نگهداری شد.

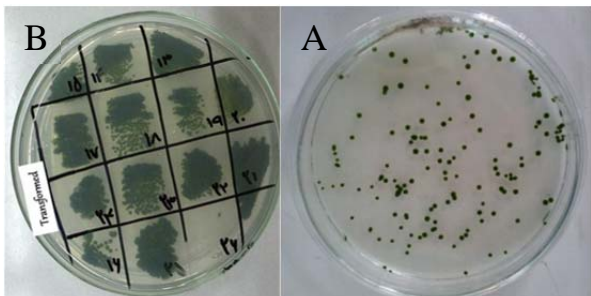
انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به سلول *c.reinhardtii*: برای انتقال به روش الکتروپوریشن، کشت سلول‌ها طبق پروتکل ارایه شده توسط شرکت سازنده (اینویترورژن؛ ایالات متحده) آماده‌سازی شد. پلاسمید نوترکیب نیز برای افزایش کارایی انتقال با استفاده از آنزیم Sca I برش خورده و خطی شد. سوبه‌ها در محیط TAP کشت داده شده و پس از رشد سوبه و زمانی که OD₇₅₀ آن به ۰/۳ تا ۰/۵ رسید، ۱۵ میلی‌لیتر از کشت سانتریفوژ شده و سلول‌ها در ۲۵۰ میکرولیتر محیط TAP-sucrose حل شدند و ۲ میکروگرم پلاسمید خطی به آن افزوده شده و با استفاده از سیستم Genepulser Xcell (بایوراد؛ ایالات متحده)، میدان الکتریکی با شرایط زیر به سوسپانسیون سلولی اعمال شد: ولتاژ: ۶۰۰ ولت، ظرفیت خازنی: ۵۰ میکروفاراد، مقاومت: بی‌نهایت، عرض کووت: ۴ میلی‌متر

پس از الکتروپوریشن، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۱۰ میلی‌متر محیط TAP-sucrose مایع انکوبه شده و بعد از آن سانتریفوژ شدند و رسوب سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه حل شده و به پلیت TAP-agar واجد آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (در مورد پلاسمید CTchlamy3) یا ژئوسین با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (در مورد پلاسمید CTchlamy4) به روش کشت چمنی منتقل شد. پلیت‌ها در انکوباتور با نوردهی یکنواخت با شدت $50 \mu\text{m}^{-2} \text{S}^{-1}$ و دمای ۲۵°C به مدت حداکثر ۲ هفته نگهداری شدند.

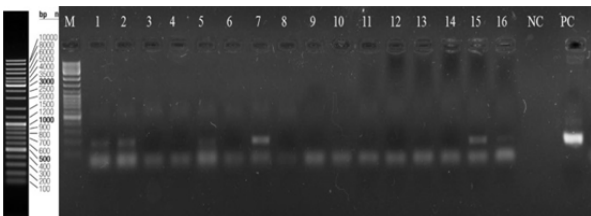
غربالگری سلول‌های نوترکیب: اولین روش غربالگری، بررسی حضور توالی مورد نظر در کلنی‌های رشد یافته در محیط واجد آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش PCR است. برای Colony PCR پلاسمید CTchlamy3 از پرایمرهای: '5'TTGAGTGAGCTGATACCGC3'

در سویه‌های نوترکیب ترانسفورم شده با پلاسمید CTchlamy4، سویه مثبت مشاهده شد که همگی سویه‌های CW15 (واجد دیواره ناقص) بودند (شکل ۳).

هر سویه مثبت برای افزایش مقیاس کشت داده شدند. از سویه، ۴ سویه در حجم ۴۰۰ میلی لیتر رشد کردند که به سویه‌های شماره ۴-۱ نام گذاری شدند.

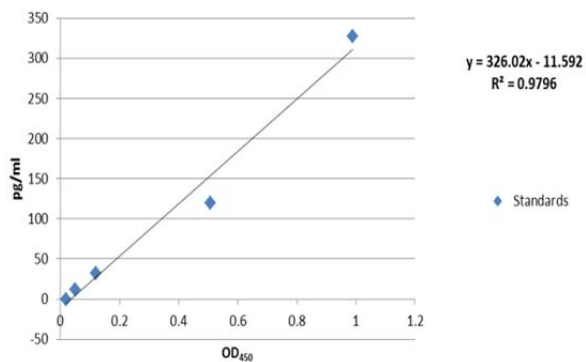


شکل ۲ (A) پلیت حاوی کلنی نوترکیب *C. reinhardtii* پس از ترانسفورماسیون. (B) رپلیکاپلیت سویه‌های نوترکیب



شکل ۳ نتایج کلنی PCR سویه‌های ترانسفورم شده با CtChlamy4، سویه مثبت (۱، ۲، ۵، ۷، ۱۵ و ۱۶) مشاهده می‌شود. M: GeneRuler DNA ladder mix, PC: positive control, NC: negative control

بررسی بیان کلسیتونین نوترکیب: مایع رویی حاصل از سانتریفوژ کشت سویه‌ها به همراه نمونه شاهد (سویه غیرنوترکیب) به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. از بین ۴ سویه، یکی از سویه‌ها (سویه شماره ۲) به میزان ۱/۲۲ اپیکوگرم بر میلی لیتر تولید داشته است. همچنین برای امکان تولید کلسیتونین به صورت درون سلولی، از زیست توده هر ۴ سویه، عصاره سلولی استخراج شد و به روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت. نتایج الایزا نشان می‌دهد که در عصاره سلولی هیچ کدام از سویه‌ها، کلسیتونین وجود ندارد. پس از آن، سایر مراحل کشت در حجم بالا، تغلیظ و سنجش روی سویه تولیدکننده کلسیتونین نوترکیب صورت پذیرفت. در نمونه تغلیظ شده به میزان ۱۰۰X، حدود ۷۵ اپیکوگرم بر میلی لیتر کلسیتونین مشاهده شد (نمودار ۱ و جدول ۱).



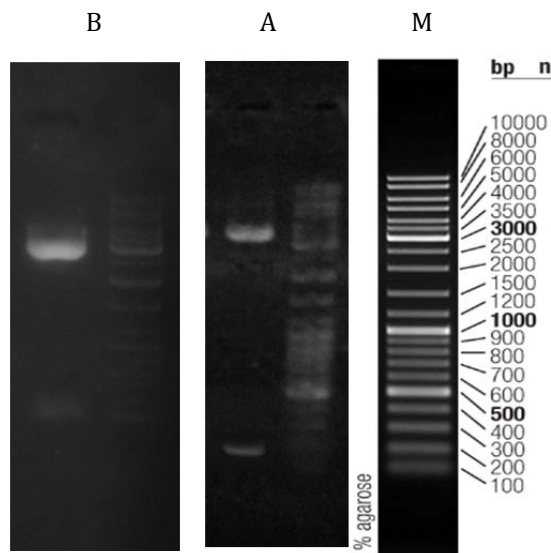
نمودار ۱) منحنی استاندارد الایزا

یافته‌ها

طراحی کانستراکت بیانی کلسیتونین: با توجه به نکات ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، نکته اساسی برای بیان مناسب پروتئین نوترکیب، بهینه‌سازی توالی کدکننده آن با توجه به کدون‌های ترجیحی *C. reinhardtii* است. سایر موارد مورد اهمیت در طراحی توالی بیانی به شرح زیر است: ساختار ثانویه mRNA، فقدان جایگاه‌های آنزیم‌های محدودالایر که ممکن است موجب اختلال در مراحل بعدی شود، فقدان جایگاه‌های اسپلایسینگ نابجا، فقدان توالی ناپایدارکننده mRNA، فقدان جایگاه داخلی اتصال به ریبوزوم و ممانعت از Codon tandem repeats که با توجه به این موارد، توالی کدکننده به صورت زیر طراحی و سنتز شد:

کدون پایان-گلاسیسین- کلسیتونین انسانی-سیگنال پپتیدی توالی راهبر کربونیک‌انیدراز

کلونینگ در وکتورهای بیانی: نتایج هضم آنزیمی که در شکل ۱ نمایش داده شده است، تاییدکننده صحت کلونینگ در هر دو وکتور بیانی است. نتایج توالی‌یابی نیز تاییدکننده صحت کلونینگ است.



شکل ۱) هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب: (A) پلاسمید CTchlamy3 تیمار شده با آنزیم‌های *Not I* و *Kpn I* (B) پلاسمید CTchlamy4 تیمار شده با آنزیم‌های *EcoRI* و *Pst I* (M) مارکر وزن مولکولی GeneRuler DNA ladder mix

ترانسفورماسیون به *C. reinhardtii* و آزمایش‌های تاییدی آن:

پلاسمیدهای نوترکیب خطی شده و به سویه‌های مختلف *C. reinhardtii* منتقل شدند. پس از ترانسفورماسیون، کلنی‌های نوترکیب روی پلیت TAP آگار حاوی آنتی‌بیوتیک رشد کردند (شکل ۲). از کلنی‌های نوترکیب، رپلیکاپلیت تهیه شد و کلنی PCR گذاشته شد. حدود ۱۵۰ سویه ترانسفورم شده با CTchlamy3 و ۵۰ سویه ترانسفورم شده با CTchlamy4 مورد سنجش قرار گرفتند.

در هیچ یک از سویه‌های ترانسفورم شده با پلاسمید CTchlamy3 کلنی PCR مثبت نشد. همچنین بعد از ۱ یا ۲ مرحله کشت، ژن نوترکیب را از دست داده یا آن را خاموش کرده و در نتیجه قادر به رشد در محیط واجد آنتی‌بیوتیک‌های گرومایسین نبودند.

نمونه	میزان جذب در ۴۵۰ نانومتر	غلظت محاسبه شده (پیکوگرم بر میلی لیتر)
کنترل ۱	۰/۱۱۶۵	۲۶/۳۸۹
کنترل ۲	۱/۵۲۰۵	۴۸۴/۱۲۱
نمونه ۲ با غلظت 100X	۰/۲۶۶۳	۷۵/۲۲۷
عصاره سلولی نمونه ۱	۰/۰۱۳۵	۰
عصاره سلولی نمونه ۲	۰/۰۱۹۵	۰
عصاره سلولی نمونه ۳	۰/۰۱۶۵	۰
عصاره سلولی نمونه ۴	۰/۰۲۶۵	۰
عصاره سلولی سویه ترانسفورم نشده (شاهد)	۰/۰۱۶۵	۰

بحث

در این مطالعه تلاش شد که از سیستم بیانی ریزجلبک کلامیدوموناس رینهارتی برای تولید کلسیتونین انسانی نوترکیب استفاده شود. با توجه به اینکه آمیداسیون در مسیر ترشحات سلول رخ می‌دهد و همچنین ترشح محصول به خارج سلول یکی از راهکارهای حفظ آن از دسترس پروتئازهای سلولی است، بیان ترشحات کلسیتونین مد نظر قرار گرفت به این منظور سیگنال ترشحات طبیعی کلامیدوموناس استفاده شد.

امروزه نیاز روزافزون به پروتئین‌های دارویی، به‌عنوان محرک قوی در راستای تحقیق و توسعه روش‌های جدید و ایمن تولید پروتئین‌های نوترکیب در مقیاس بالا لحاظ می‌شود. پیشرفت‌های تکنولوژی DNA نوترکیب موجب شده است که بتوان از گونه‌های مختلف زیستی به‌عنوان بستر تولید فرآورده‌های نوترکیب استفاده نمود. اصطلاح کشاورزی مولکولی اولین بار توسط آرنتزن و همکاران در پی تولید موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب در میزبان گیاهی ارایه شد [13]. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در راستای گسترش کشاورزی مولکولی به سوی استفاده از ریزجلبک‌ها برای تولید فرآورده‌های نوترکیب صورت گرفته است و بدین ترتیب هم منافع استفاده از سیستم گیاهی و هم مزایای سیستم‌های میکروبی فراهم می‌شود. در میان گونه‌های مختلف جلبکی، کلامیدوموناس رینهارتی موضوع بیشترین مطالعات فیزیولوژی و ژنتیک بوده و تلاش‌های موفقیت‌آمیزی نیز در راستای بیان پروتئین‌های نوترکیب در آن صورت گرفته است.

پوکی استخوان به‌عنوان یک بیماری خاموش، تهدیدکننده سلامت انسان‌ها بوده و موجب بروز شکستگی‌ها و ناتوانی به‌ویژه در افراد مسن می‌شود. یکی از داروهای رایج برای پیشگیری و درمان پوکی استخوان، کلسیتونین است. این کلسیتونین دارویی عمدتاً از میزبان‌هایی نظیر ماهی آزاد، مارماهی، خوک یا به‌صورت نوترکیب حاصل می‌شود، ولی کلسیتونین‌های غیرانسانی برای استفاده در انسان محدودیت دارد و از آنجا که به‌منظور فعالیت زیستی کامل کلسیتونین به آمیداسیون نیاز است، میزبان پروکاریوتی صرفاً قادر به تولید پیش‌ساز کلسیتونین بوده و برای فعالیت کامل به تیمارهای شیمیایی نیاز دارد.

مطالعات صورت‌گرفته تاکنون در زمینه تولید کلسیتونین نوترکیب، به تولید در میزبان‌هایی نظیر *E. coli*، *Staphylococcus carnosus*، مخمر، کشت سلول‌های میوبلاست، کشت سلول‌های موشی، کشت سلول‌های NIH3T3، لارو کرم ابریشم و سیب‌زمینی منجر شده است که میزبان‌های باکتریال و کشت سلولی بیان بالانصبه بالاتری داشته‌اند [1, 6, 14-21].

مقایسه وکتورهای بیانی pChlmy_3 و pChlmy_4 عملاً برتری استراتژی به‌کاررفته در pChlmy_4 را نشان می‌دهد، به

نحوی که پلاسمید CTchlmy3 به هیچ وجه در ژنوم میزبان پایدار نبوده و پس از ۲ یا نهایتاً ۳ بار تجدید کشت حذف می‌شود، در حالی که استراتژی به‌کاررفته در pChlmy_4 در استفاده از یک پروموتور برای بیان همزمان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و توالی هدف، میزبان را مجبور به حفظ آن برای بقای خود در محیط واجد آنتی‌بیوتیک می‌کند. همچنین مشاهده شد که وجود دیواره سلولی عاملی در راستای کاهش کارایی ترانسفورماسیون و ترشح پروتئین‌ها به محیط است، لذا برای پروتئین‌های ترشحاتی استفاده از سویه‌های واجد دیواره ناقص ترجیح داده می‌شود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که سویه نوترکیب، بیانی در حد پیکوگرم دارد که البته این میزان مشابه نتایج سایر مطالعات بوده است، همچنین سیگنال ترشحاتی استفاده‌شده به‌خوبی عمل کرده و کلسیتونین نوترکیب در محیط کشت شناسایی شد ولی در عصاره سلولی قابل شناسایی نبود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصله مشاهده می‌شود که علی‌رغم دشواری‌های خاص تولید پپتیدهای کوچک و ناپایدار نظیر کلسیتونین به‌صورت نوترکیب، راهبرد به‌کاررفته در بیان ترشحاتی کلسیتونین انسانی در سلول ریزجلبک کلامیدوموناس رینهارتی موفقیت‌آمیز بوده و این روش از قابلیت تولید ترشحاتی پپتیدهای کوچک برخوردار است. لذا می‌توان از این راهکار در مطالعات بعدی برای افزایش حجم و بازده تولید و همچنین تلاش در راستای بیان سایر پپتیدهای ارزشمند استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به کارکنان پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌ویژه جناب آقای شیخی‌نژاد و سرکار خانم عمیدی ابراز می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافی وجود نداشته است.

سهم نویسندگان: حامد ناقوسی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ حمیده افقی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۰٪)؛ زهرا امینی بیات (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)؛ نسرین معظمی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪).

منابع مالی: این طرح با حمایت مالی پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران صورت گرفته است.

منابع

- 1- Ofoghi H, Moazami N, Domonsky NN, Ivanov I. Cloning and expression of human calcitonin genes in transgenic potato plants. *Biotechnol Lett.* 2000;22(7):611-5.
- 2- Azria M. Calcitonins - physiological and pharmacological aspects. In: Azria M, editor. *Calcitonins - physiological and pharmacological aspects, Mafosfamide - a derivative of 4-Hydroxycyclophosphamide. Enzymatic DNA methylation.* Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 1989. pp. 1-34.
- 3- Zaidi M, Breimer LH, MacIntyre I. Biology of peptides from the calcitonin genes. *Q J Exp Physiol.* 1987;72(4):371-408.

- 14- Dilsen S, Paul W, Sandgathe A, Tippe D, Freudl R, Thömmes J, et al. Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2000;54(3):361-9.
- 15- Hong D, Mingqiang Z, Min L, Changqing C, Jifang M. Production of recombinant salmon calcitonin by amidation of precursor peptide using enzymatic transacylation and photolysis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(1):362-7.
- 16- Ishikawa H, Kawaguchi J, Yao Y, Tamaoki H, Ono T, Fukui F, et al. Large-scale preparation of recombinant human calcitonin from a multimeric fusion protein produced in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng*. 1999;87(3):296-301.
- 17- Ivanov I, Gigova L, Jay E. Chemical synthesis and expression in *E. coli* of a human Val8-calcitonin gene by fusion to a synthetic human interferon-gamma gene. *FEBS Lett*. 1987;210(1):56-60.
- 18- Sandgathe A, Tippe D, Dilsen S, Meens J, Halfar M, Weuster-Botz D, et al. Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: Secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption. *Process Biochem*. 2003;38(9):1351-63.
- 19- Tajima M, Iida T, Kaminuma T, Yanagi M, Fukushima S. High-level synthesis in *Escherichia coli* of recombinant human calcitonin: Collagenase cleavage of the fusion protein and peptidylglycine α -amidation. *J Ferment Bioeng*. 1991;72(5):362-7.
- 20- Takahashi KI, Liu YC, Hayashi N, Goto F, Kato M, Kawashima H, et al. Production of bioactive salmon calcitonin from the nonendocrine cell lines COS-7 and CHO. *Peptides*. 1997;18(3):439-44.
- 21- Wang Y, Zeng B, Li X. Expression of human calcitonin by microencapsulated recombinant myoblasts. *Biotechnol Lett*. 2006;28(18):1453-8.
- 4- Zaidi M, Inzerillo AM, Moonga BS, Bevis PJ, Huang CL. Forty years of calcitonin--where are we now? a tribute to the work of Iain Macintyre, FRS. *Bone*. 2002;30(5):655-63.
- 5- Ivanov I, Tam J, Wishart P, Jay E. Chemical synthesis and expression of the human calcitonin gene. *Gene*. 1987;59(2-3):223-30.
- 6- Salehzadeh A, Ofoghi H, Roohvand F, Aghasadeghi MR, Parivar K. Human calcitonin (hCT) gene expression and secretion by *Pichia pastoris*. *Rom Biotechnol Lett*. 2012;17(1):7036-42.
- 7- León-Bañares R, González-Ballester D, Galván A, Fernández E. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol*. 2004;22(1):45-52.
- 8- Rasala BA, Mayfield SP. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. *Bioeng Bugs*. 2011;2(1):50-4.
- 9- Walker TL. The development of microalgae as a bioreactor system for the production of recombinant proteins [Dissertation]. Brisbane: Queensland University of Technology; 2004.
- 10- Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LM, Soria-Guerra RE. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: Current status and perspectives. *Plant Cell Rep*. 2012;31(3):479-94.
- 11- Harris EH, Stern DB, Witman GB. *The Chlamydomonas sourcebook*. 1st Volmme. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
- 12- Lauersen KJ, Berger H, Mussgnug JH, Kruse O. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*. 2013;167(2):101-10.
- 13- Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):11745-9.