Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Synthesis and Production of Recombinant Human Interleukin-2 via a Cell-Free Expression System

H. Radi (MSc)[1], E. Ferdosi-Shahandashti (PhD)[*2], G. A. Kardar (PhD)[3]

1.Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
2.Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
3.Immunology, Asthma & Allergy Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran.

[*]Corresponding Author: E. Ferdosi-Shahandashti (PhD)
Address: Biomedical and Microbial Advanced Technologies (BMAT), Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran.
Tel: +98 (11) 32199592. **E-mail:** elaheh.ferdosi@yahoo.com

Article Type
Research Paper

Received:
Jun 18th 2024
Revised:
Sep 11st 2024
Accepted:
Oct 12nd 2024

ABSTRACT

Background and Objective: Cell-free protein expression system is a novel method for synthesizing recombinant proteins such as interleukin-2 (IL-2), which is of great importance in immune system responses in cancer and autoimmune patients. The aim of this study is to synthesize IL-2 using cell-free expression technique with high efficiency and lower cost.

Methods: In this experimental study, the bacterial host DH5α was used to amplify the IL-2 cDNA in the pcDNA3.1 expression vector. After culturing the eukaryotic CHO cell line and preparing the cell lysate, the cell cytoplasm containing protein expression factors along with the addition of essential substances required for amino acid expression was placed in the vicinity of the expression vector containing the IL-2 gene fragment. The negative control sample included all the materials of the tested sample without the presence of the expression vector containing the gene fragment. Both samples were incubated for 20 hours at 25 °C. The accuracy of the expression of recombinant human IL-2 was examined using SDS-PAGE and Dot Blot techniques with monoclonal antibodies against IL-2.

Findings: In the assessment of the expressed protein based on SDS-PAGE technique, a band corresponding to the IL-2 protein produced in the test sample measuring 15 kDa was detected, while no band was found in the vector-free cell lysate sample. In the dot blot technique using gold nanoparticles, the desired spot was obtained from the binding of IL-2 as an antigen to the monoclonal antibody specific to IL-2. Moreover, quantitative analysis of the expression level using Nanodrop was reported to be 17.8 µg/ml.

Conclusion: The results of the techniques showed that there is the possibility to synthesize and produce IL-2 using a cell-free expression method.

Keywords: *Recombinant Human Interleukin-2, Cell-Free Expression System, CHO Cell Line, Synthesis of Recombinant Human Interleukin-2.*

Cite this article: Radi H, Ferdosi-Shahandashti E, Kardar GA. Synthesis and Production of Recombinant Human Interleukin-2 via a Cell-Free Expression System. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2025; 27: e45.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

سنتز و تولید اینترلوکین ۲ نوترکیب انسانی از طریق سیستم بیان بدون سلول

هاله رادی (MSc)[۱]، الهه فردوسی شاهاندشتی (PhD)[۲*]، غلامعلی کاردر (PhD)[۳]

۱. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۳. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۳/۳/۲۹
اصلاح:
۱۴۰۳/۶/۲۱
پذیرش:
۱۴۰۳/۷/۲۱

چکیده

سابقه و هدف: سیستم بیان پروتئین بدون سلول روشی نوین برای سنتز پروتئین‌های نوترکیبی مانند اینترلوکین ۲ است که در پاسخ‌های سیستم ایمنی در بیماران سرطانی و خودایمنی اهمیت بالایی دارد. هدف از این مطالعه، سنتز اینترلوکین ۲ با تکنیک بیان بدون سلول با بازده بالا و هزینه کمتر می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهت تکثیر cDNA اینترلوکین ۲ در وکتور بیانی pcDNA3.1 از میزبان باکتریایی DH5α استفاده شد. پس از کشت رده سلولی یوکاریوتی CHO و تهیه لیزات سلولی، سیتوپلاسم سلولی که حاوی فاکتورهای بیان پروتئین هستند به همراه افزودن مواد ضروری مورد نیاز برای بیان آمینواسیدها در مجاورت وکتور بیانی حاوی قطعه ژنی اینترلوکین ۲ قرار گرفت. نمونه کنترل منفی نیز شامل تمامی مواد نمونه مورد آزمایش بدون حضور وکتور بیانی حاوی قطعه ژنی می‌باشد. هر دو نمونه به مدت ۲۰ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بررسی صحت بیان IL-2 نوترکیب انسانی با استفاده از تکنیک‌های SDS-PAGE و Dot Blot با مونوکلونال آنتی بادی علیه اینترلوکین ۲ انجام شد.

یافته‌ها: در بررسی صحت پروتئین بیان شده با تکنیک SDS-PAGE، باند مربوط به پروتئین IL-2 تولید شده در نمونه مورد آزمایش با اندازه ۱۵ کیلودالتون مشاهده شد در حالی که در نمونه لیزات سلولی بدون وکتور باند مشاهده نشد. در تکنیک دات بلات با استفاده از نانوذرات طلا، از اتصال IL-2 به عنوان آنتی ژن به مونوکلونال آنتی بادی اختصاصی علیه IL-2، لکه مورد نظر به دست آمد. همچنین آنالیز کمی میزان بیان با نانودراپ، ۱۷/۸ µg/ml گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از تکنیک‌ها نشان داد که توانایی سنتز و تولید IL-2 به روش بیان بدون سلول وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: اینترلوکین ۲ نوترکیب انسانی، سیستم بیان بدون سلول، رده سلولی CHO، سنتز اینترلوکین ۲ نوترکیب انسان.

استناد: هاله رادی، الهه فردوسی شاهاندشتی، غلامعلی کاردر. سنتز و تولید اینترلوکین ۲ نوترکیب انسانی از طریق سیستم بیان بدون سلول. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۴؛ ۲۷: e۴۵.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه خانم هاله رادی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۷۲۴۱۳۳۷۶۵ دانشگاه علوم پزشکی بابل می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر الهه فردوسی شاهاندشتی
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات فناوری های نوین زیست پزشکی و میکروبی.
تلفن: ۳۲۱۹۹۵۹۲-۰۱۱ رایانامه: elaheh.ferdosi@yahoo.com

مقدمه

گلیکوپروتئین اینترلوکین ۲ که به عنوان سایتوکاینی با نقش فاکتور رشد سلول‌های لنفوسیت T در سیستم ایمنی بدن اهمیت زیادی دارد (۲و۱). تاثیر اینترلوکین ۲ بر سلول‌های لنفوسیت T و تکثیر سلول‌های T سایتوتوکسیک برای القای مرگ سلول‌های سرطانی و همچنین تکثیر سلول‌های T تنظیمی موجب کنترل سیستم ایمنی در بیماران خودایمنی می شود (۳).

سنتز پروتئین نوترکیب به طور کلی از طریق دو نوع سیستم بیانی درون سلولی و برون سلولی انجام می‌شود. سیستم‌های بیانی بدون سلول را می‌توان به عنوان زیرساخت‌هایی که در آن واکنش‌های بیوشیمیایی مستقل از سلول‌های زنده رخ می‌دهد، تعریف کرد که رونویسی و ترجمه در عصاره سلولی و در شرایط آزمایشگاهی صورت می‌گیرد (۴). سیستم Cell Free Protein Synthesis (CFPS) از حداقل دستگاه آنزیمی برای رونویسی، ترجمه و بازسازی انرژی استفاده می‌کند که یا از عصاره‌های سلولی یا آنزیم‌های خالص مشتق می‌شود (۶و۵). CFPS که به عنوان یک سیستم بازسازی شده ساده و کارآمد طراحی شده است، به طور طبیعی بر محدودیت ذاتی یک سلول زنده غلبه می‌کند و دسترسی مستقیم به فعالیت‌های ضروری بیان پروتئین را فراهم می‌کند (۷). CFPS اولین برنامه‌ای است که فرآیندهای تقلید سلولی مدولار را با پشتیبانی از رونویسی و ترجمه فعال امکان‌پذیر می‌سازد. علاوه بر این، به دلیل عدم حضور غشای سیتوپلاسمی، امکان دسترسی و دستکاری پروتئین و استفاده از اسید آمینه‌های غیر استاندارد برای سنتز طیف زیادی از پروتئین‌های ساده و یا پیچیده فراهم است و زمان دست ورزی و سنتز و تخلیص بسیار کاهش می‌یابد (۸). در حال حاضر، سیستم CFPS، جایگزین سیستم‌های سنتی بیان پروتئین، که مبتنی بر سلول می‌باشد، شده است، که از این طریق سنتز پروتئین‌ها بسیار مقرون به صرفه می‌باشد (۵).

سلول‌های یوکاریوتی به دلیل توانایی در شکل دهی درست پروتئین، سر هم بندی و تغییرات پس از ترجمه در بیان گلیکوپروتئین‌ها و پروتئین‌های پیچیده، اهمیت دارند. سیستم‌های بیانی بر پایه سلول‌های پستانداران، انتخاب ارجح برای سنتز بیولوژیکی پروتئین‌های فعال است (۹). در حال حاضر در میان رده‌های سلول‌های پستانداران، سلول‌های تخمدان همستر چینی (Chinese Hamster Ovary Cell) شایع‌ترین رده سلولی میزبان برای تولید بیوداروها هستند و گسترده‌ترین کاربرد را برای انتقال، بیان و تولید پروتئین نوترکیب در مقیاس بزرگ دارند (۱۱و۱۰). داده‌های مربوط به تاییدیه‌های بازار بیودارو بین سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۸ نشان می‌دهد که بیش از ۸۰٪ از بیوداروهای تازه تأیید شده در سلول‌های CHO تولید شده‌اند (۱۲).

از آنجایی که اثر درمانی اینترلوکین-۲ انسانی بر روی بیماران مبتلا به سرطان‌هایی از جمله سرطان کلیه و بیماری‌های خودایمنی بررسی و ثابت شده است، این پژوهش با هدف بیان پروتئین نوترکیب اینترلوکین ۲ انسانی به روش بیان عاری از سلول که بازدهی بالاتر و صرف هزینه کمتری نسبت به روش‌های سنتی سنتز پروتئین دارد، طراحی شده است که سعی در تسریع درمان و بهبود این بیماران دارد.

مواد و روش ها

سویه باکتریایی، رده سلولی و پلاسمید: این مطالعه تجربی با کد IR.MUBABOL.HRI.REC.1400.124 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل به تصویب رسید. در این مطالعه از پلاسمید pcDNA3.1 جهت کلون کردن قطعه ژنی IL-2 و از باکتری اشریشیاکلی سویه DH5α جهت تکثیر و کلونینگ پلاسمید حاوی قطعه ژنی و از رده سلول یوکاریوتی CHO-K1 جهت تهیه لیزات سلولی مورد نیاز بیان پروتئین که از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردیده، استفاده شد.

محیط‌ها، آنزیم‌ها، مواد شیمیایی وکیت‌ها: محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) غیر فعال شده با حرارت از برند Gibco و Pen-Strep 1X از برند Sigma آلمان، برای رشد رده سلولی CHO-K1 و همچنین از محیط broth (BHI) Brain Heart Infusion خریداری شده از شرکت مرک آلمان برای رشد باکتری اشرشیاکلی DH5α در این پژوهش استفاده گردید. پودر آنتی بیوتیک آمپی سیلین تزریقی با غلظت۵۰ µg/ml برای انتخاب کلون باکتری‌های ترانسفرم شده باکتریایی بر روی محیط Luria-Bertani (LB) آگار حاوی آمپی سیلین استفاده شد. از آنتی بادی مونوکلونال Anti-Interleukin-2 با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای مشاهده لکه در تکنیک Dot Blot استفاده شد. از کیت ایرانی دنازیست آسیا، جهت استخراج پلاسمید استفاده گردید.

ترنسفورم pcDNA3-IL-2 در میزبان پروکاریوتی DH5α و استخراج پلاسمید: پس از دریافت پلاسمید pcDNA3.1 حاوی قطعه ژنی اینترلوکین ۲، به منظور تکثیر وکتور حاوی قطعه ژنی مورد نظر، پس از کشت سویه DH5α باکتری اشریشیا کلی در محیط BHI broth با استفاده از کلسیم کلراید ۱۰۰ میلی مولار و شوک گرمایی، برای پذیرش پلاسمید آماده شدند. انتقال پلاسمید حاوی قطعه ژنی اینترلوکین ۲ با شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور اثبات ورود وکتور به باکتری، کلونی‌های ترنسفورم شده و مقاوم به آنتی بیوتیک در محیط LB آگار دارای آنتی بیوتیک

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

آمپی سیلین بررسی شدند. از تعدادی از کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط LB agar حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین که نشان دهنده حضور وکتور در کلونی است، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، پلاسمید حاوی قطعه استخراج شد. به منظور تائید وجود قطعه کلون شده در سازه نوترکیب اهدایی از دکتر کاردر (Kardar)، از محلول استخراج پلاسمید به دست آمده به عنوان الگو با پرایمر اختصاصی پلاسمید که در دو طرف قطعه ژنی الحاق شده طراحی شده است، با دمای آنیلینگ ۵۸ درجه سانتی‌گراد طی ۳۵ سیکل با روش PCR تکثیر شد.

کشت سلولی: بدین منظور، سلول‌های CHO-K1 در محیط RPMI-1640 با ۱۰٪ FBS و PenStrep 1X در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 و رطوبت ۹۵٪ کشت داده شدند. این رده سلولی به شکل شبه اپیتلیال هستند و در کف فلاسک کشت سلولی می‌چسبند و رشد می‌کنند.

عصاره سلولی: سلول‌های به دست آمده از فلاسک سلولی جمع آوری شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰ سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، با محلول واش تهیه شده از شرکت شفا زیست ارمون آمل (شفامل)، شستشو شدند. سپس سلول‌ها در محلول extraction تهیه شده از شرکت شفامل، که از قبل به دمای اتاق رسیده بود، غوطه‌ور شدند. پس از انجام این مرحله از کار سوپرناتانت سلولی جمع آوری شد. سوپرناتانت جمع آوری شده، به عنوان عصاره سلولی برای مراحل بعدی در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

مرحله بیان: لیزات سلول یوکاریوتی سلول‌های CHO-K1 با وکتور pcDNA3.1 حاوی ژن اینترلوکین ۲ که در مراحل قبل تکثیر شده بود، مجاور شد. عصاره سلولی به دست آمده با نسبت برابر در مجاورت محلول بیانی متشکل از ۱۸ ماده ضروری مورد نیاز برای بیان مانند مخلوط اسیدهای آمینه، بیان در سیستم عاری از سلول صورت گرفت. نمونه کنترل منفی نیز مخلوط بیانی و محلول عصاره سلولی بدون حضور وکتور در نظر گرفته شد. میکروتیوب‌های نمونه مورد آزمایش و نمونه کنترل منفی به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان بیان پروتئین موجود در میکروتیوب با نانودراپ اندازه گیری شد به صورتی که بلانک مورد نظر برای خوانش، مخلوط بیانی و محلول عصاره سلولی بدون حضور وکتور بودند.

تکنیک دات بلات: به منظور اطمینان از وجود پروتئین اینترلوکین ۲ از تکنیک دات بلات با آنتی بادی مونوکلونال علیه اینترلوکین ۲ و آنتی بادی کونژوگه با نانو ذره طلا استفاده شد. برای انجام تکنیک دات بلات ابتدا دو ناحیه بر روی بستر نیتروسلولزی (PVDF, Roche) برای کنترل و تست مشخص گردید. هر ناحیه طول و عرض یک سانتی‌متر را در بر می‌گرفت. برای ناحیه کنترل ابتدا به میزان ۲ میکرولیتر از Goat anti-mouse antibody که حاوی ۰/۴ میکروگرم از آنتی بادی بود به کمک سمپلر بر روی ناحیه کنترل لود گردید. سپس در ناحیه دوم که مربوط به ناحیه تست بود ابتدا ۲ میکرولیتر از Mouse anti IL-2 antibody که حاوی µg ۲ از آنتی بادی بود با سمپلر بر روی ناحیه تست لود شد. بعد از ۳۰ دقیقه، هر دو ناحیه بستر با بافر فسفات حاوی توین ۲۰ شستشو داده شدند. سپس مخلوط بیانی بدون سلول بر روی ناحیه تست و بافر فسفات بر روی ناحیه کنترل ریخته شدند و پس از یک ساعت انکوباسیون و شستشوی بستر برای حذف پروتئین‌های متصل نشده به آنتی بادی، از محلول کونژوگه که حاوی anti IL-2 antibody به همراه نانوذره طلا بود، به میزان ۲ میکرولیتر (با غلظت µg/ml 2) بر روی هردو ناحیه ریخته شد. پس از شستشوی بستر برای حذف آنتی بادی‌های متصل نشده، رنگ‌های حاصل از واکنش بررسی گردید.

تکنیک Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE): برای رویت پروتئین بیان شده به واسطه بیان بدون سلولی و ارزیابی اندازه مولکولی اینترلوکین ۲ از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید احیایی (SDS-PAGE) استفاده شد. طبق جدول زیر درصد ژل جداکننده در SDS-PAGE برای جداسازی اینترلوکین ۲، ۱۲/۵٪ است که در این مطالعه استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. مقادیر مختلف درصد ژل جداکننده ژل پلی آکریل آمید

	درصد ژل جدا کننده				
	٪۵	٪۷/۵	٪۱۰	٪۱۲	٪۱۵
وزن باند موردنظر مطابق پروتئین سایز مارکر (کیلودالتون)	>۲۵۰	۱۲۰–۲۵۰	۴۰–۱۲۰	۱۵–۴۰	<۱۵

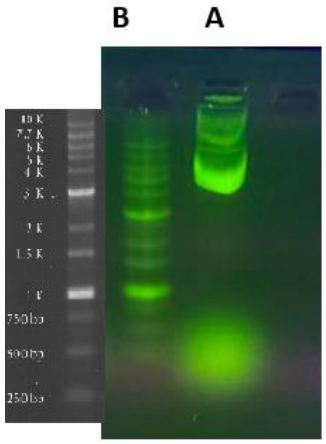
یافته ها

ترنسفورم، استخراج و PCR از قطعه ژنی الحاق شده در پلاسمید: از الکتروفورز پلاسمید استخراج شده از باکتری میزبان اشریشیاکلی DH5α باند حدود ۶ کیلوبازی که هم سایز وکتور و قطعه ژنی مورد نظر بود بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد (شکل ۱). وکتور استخراج شده از باکتری به عنوان الگو

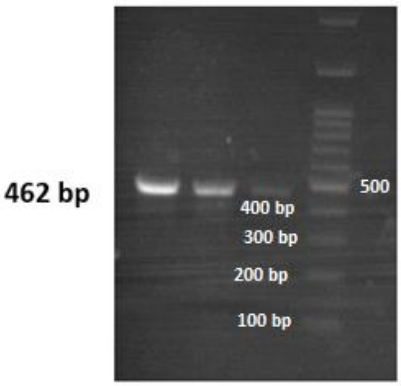
[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه ژنی اینترلوکین ۲ با روش PCR تکثیر و با الکتروفورز محصول آن باند 462 bp مشاهده شد که با اندازه ژن مورد نظر مطابقت داشت (شکل ۲).

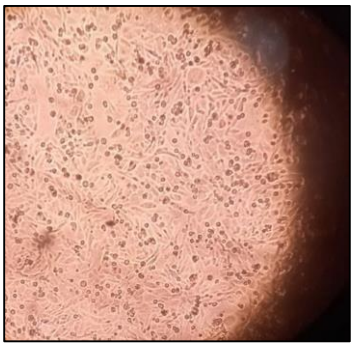
کشت رده سلول یوکاریوتی CHO-K1: پس از رسیدن تراکم سلولی به ۸۰٪ سلول‌های یوکاریوتی رده سلولی CHO-K1 از لحاظ مورفولوژی و تعداد در مراحل مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳)، نهایتاً عصاره ۵۰ میلیون سلول برای تهیه عصاره سلولی استفاده شد.



شکل ۱. باند پلاسمید واجد ژن اینترلوکین-۲ که پس از استخراج پلاسمید از باکتری ترانسفرم شده حدود ٦ کیلوباز بر روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید (ستون A: نمونه و ستون B: لدر).



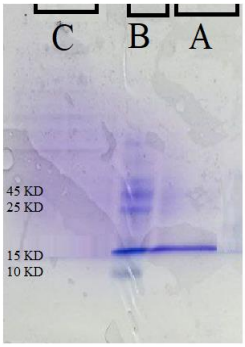
شکل ۲. ژل الکتروفورز محصول PCR ژن اینترلوکین-۲ با پرایمرهای اختصاصی، باند ٤٦٢ bp حاصل و DNA لدر ۱۰۰ جفت بازی



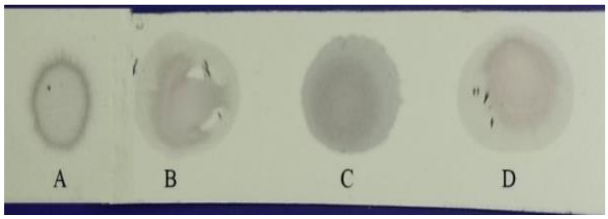
شکل ۳. تصویر میکروسکوپی رده سلولی CHO-k1 کشت داده شده در محیط کامل با بزرگنمایی X10

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

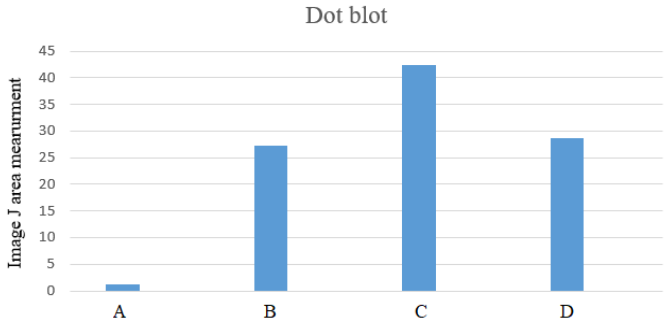
بررسی کمی و کیفی غلظت پروتئین بیان شده در سیستم بیان بدون سلول: پس از ترکیب لیز سلول‌های CHO-K1 با محلول بیانی و افزودن وکتور واجد ژن اینترلوکین ۲ به این مخلوط، انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه و به مدت ۲۰ ساعت انجام شد و خوانش غلظت پروتئین توسط دستگاه نانودراپ غلظت µg/ml ۱۷/۸ که پس از کسر عدد خوانش شده در مخلوط بیانی بدون وکتور به دست آمده است (شکل ۴). قابل ذکر است که برای اندازه گیری مقدار کمی پرتئین بیانی از روش الایزا استفاده می‌شود و در این مطالعه الایزا انجام شد ولی نتیجه‌ای در بر نداشت و کیت درست کار نکرد لذا از اختلاف پروتئین موجود در مخلوط واکنش با لوله‌های بلانک به طور غیر مستقیم اعداد فوق به دست آمده است. پروتئین بیان شده در محلول بیانی و لیزات سلولی برای آنالیز SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت و وجود باند ۱۵ کیلو دالتونی موید سنتز پروتئینی با این اندازه بود (شکل ۵). برای اثبات بیان اینترلوکین ۲ در محلول بیانی و در باند ۱۵ کیلودالتونی مشاهده شده در تکنیک SDS-PAGE، محلول بیانی مورد نظر با تکنیک بلاتینگ دات بلات به روش نانوذره طلا آزموده شد. استفاده از آنتی بادی مونوکلونال اینترلوکین ۲ کونژوگه شده با نانوذره طلا در این تکنیک و اتصال آن به اینترلوکین ۲ به عنوان آنتی ژن و ایجاد لکه رنگی اثبات کننده بیان اینترلوکین ۲ در این محلول بیانی است (شکل ۵). میزان رنگ دات‌های تکنیک دات بلات با نرم افزار ImageJ آنالیز شدند (شکل ۶).



شکل ٤. ژل پلی آکریل آمید. در این تصویر A اینترلوکین ۲ سنتز شده و B پروتئین سایزمارکر و C محلول cell extract به عنوان کنترل منفی می‌باشد.



شکل ۵. تصویر تکنیک دات بلات با نانوذره طلا. A: کنترل و B: آنتی بادی اختصاصی اینترلوکین ۲ و محلول بیانی و آنتی بادی IgG-anti goat کونژوگه، C: آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی اینترلوکین-۲ و IgG-anti goat کونژوگه، D: آنتی بادی anti IgG-goat و محلول بیانی و آنتی بادی اختصاصی اینترلوکین-۲ کونژوگه



شکل ٦. نمودار میزان غلظت پروتئین در تکنیک دات بلات با نرم افزار Image J. A، B، C و D بر اساس لکه‌های شکل ۵ می‌باشد و لکه C بالاترین میزان شدت رنگ را دارد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های حاصل از پژوهش نشان داد که سیستم بیان بدون سلولی با لیزات ۵۰ میلیون سلول CHO به همراه محلول بیانی و افزودن غلظت مناسبی از وکتور بیانی حاوی قطعه ژنی اینترلوکین ۲ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ ساعت قابلیت سنتز و بیان پروتئین اینترلوکین ۲ را دارد.

اینترلوکین ۲ در ایران، با سیستم بیانی داخل سلولی و در سلول باکتریایی E.coli BL21 در برخی مطالعات بیان گردید (۱۳). بیان و تولید ایترلوکین ۲ نوترکیب انسانی با روش درون سلولی پروکاریوتی، موجب تشکیل تجمعات inclusion-body می‌شود که در ادامه نیازمند مراحل سخت تخلیص سازی پروتئین با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی می‌باشد (۱۴) در حالی که روش سنتز پروتئین بدون سلول به دلیل نداشتن غشای سیتوپلاسمی سلول میزبان، تجمعات انکلوزیون بادی تشکیل نمی‌شود و تخلیص پروتئین راحت‌تر و با سرعت بالاتری انجام می‌شود. نمونه دارویی اینترلوکین ۲ (پرولوکین) و نمونه بیوسیمیلار داخلی تولید شده توسط شرکت شفامل که در سیستم پروکاریوتی تولید شده اند و دارای عملکرد هستند. اینترلوکین ۲ توسط سلول‌های یوکاریوتی مانند Pichia Pastoris و CHO (شرکت پپروتک) نیز تولید شده و برای تکثیر لنفوسیت‌های T در محیط کشت استفاده می‌شوند. بیان مبتنی بر سلول E.coli نسبت به بیان بدون سلول E.coli اغلب منجر به بازده کم پروتئین محلول به ویژه برای پروتئین‌های پیچیده می‌شود (۷). سنتز دومین scFv RIT با منشا موشی در سیستم بیان بدون سلولی بر پایه E.coli BL21 StarTM نسبت به بیان بدون سلولی بر پایه لیزات سلول CHO حجم و بازده کمتری دارد (۷).

امروزه ۷۰٪ از داروهای پروتئینی نوترکیب موجود در بازار با استفاده از سلول‌های یوکاریوتی CHO تولید می‌شوند. سلول‌های CHO به سرعت رشد می‌کنند، تغییرات پس از ترجمه مورد نیاز برای فعالیت زیستی را به خوبی انجام می‌دهند (۱۰). در روش شیمیایی سنتز اینترلوکین ۲، گلیکوزیلاسیون این پروتئین صورت نمی‌گیرد. با اینکه گلیکوزیلاسیون در فعالیت پروتئین تاثیر زیادی ندارد اما عدم گلیکوزیلاسیون آن، نیمه عمر اینترلوکین ۲ را کاهش می‌دهد که یکی از معضلات استفاده از اینترلوکین ۲ به روش سنتز شیمیایی می‌باشد در حالی که استفاده از روش بیان بدون سلولی لیزات سلول‌های یوکاریوتی همچون CHO امکان گلیکوزیله کردن پروتئین را فراهم می‌کند (۱۵). به دلیل شباهت زیاد پروتئین‌های بیان شده در سلول‌های یوکاریوتی CHO به پروتئین‌های انسانی و همچنین فعالیت بالای پروتئین‌های تولید شده در سیستم بیان بدون سلول بر پایه سلول‌های CHO در مقایسه لیزات سلول‌های Sf21 و رتیکولوسیت خرگوشی و جوانه گندم، در مطالعه حال حاضر از لیزات این سلول‌ها به عنوان محیط مناسب برای سنتز اینترلوکین ۲ استفاده شد (۱۷و۱۶و۱۰).

در این پژوهش اینترلوکین ۲ تولید شده در سیستم خارج سلولی بر پایه لیزات سلول‌های CHO از نظر وزن مولکولی و آنالیز SDS-PAGE ساختار مناسبی داشت و با آنتی بادی اختصاصی علیه اینترلوکین ۲ در تکنیک دات بلات با نانوذره طلا واکنش داد که نشان از صحت حضور اینترلوکین ۲ در محلول بیانی مورد آزمایش بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل به جهت حمایت از طرح، همچنین از شرکت دانش بنیان شفازیست آزمون آمل، مستقر در مرکز رشد فناوری و نوآوری دانشگاه علوم پزشکی بابل، به دلیل حمایت‌های دانشی و فنی قدردانی می‌گردد.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]

References

1.Shao M, He J, Zhang R, Zhang X, Yang Y, Li C, et al. Interleukin-2 Deficiency Associated with Renal Impairment in Systemic Lupus Erythematosus. J Interferon Cytokine Res. 2019;39(2):117-24.

2.Hosseinian H, Mahnam K, Shakhsi-Niaei M. The c.305del3 in IL-2 gene in Homonoidea theoretically affects IL-2/IL-2Rα interaction as well as lymphocyte homeostasis. Cytokine. 2018;108:232-8.

3.Nirschl CJ, Brodkin HR, Hicklin DJ, Ismail N, Morris K, Seidel-Dugan C, et al. Discovery of a Conditionally Activated IL-2 that Promotes Antitumor Immunity and Induces Tumor Regression. Cancer Immunol Res. 2022;10(5):581-96.

4.Brookwell A, Oza JP, Caschera F. Biotechnology Applications of Cell-Free Expression Systems. Life (Basel). 2021;11(12):1367.

5.Maharjan A, Park JH. Cell-free protein synthesis system: A new frontier for sustainable biotechnology-based products. Biotechnol Appl Biochem. 2023;70(6):2136-49.

6.Gao W, Bu N, Lu Y. Efficient Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins with a Robust Cell-Free System. Methods Protoc. 2019;2(1):16.

7.Krebs SK, Stech M, Jorde F, Rakotoarinoro N, Ramm F, Marinoff S, et al. Synthesis of an Anti-CD7 Recombinant Immunotoxin Based on PE24 in CHO and *E. coli* Cell-Free Systems. Int J Mol Sci. 2022;23(22):13697.

8.Yue K, Chen J, Li Y, Kai L. Advancing synthetic biology through cell-free protein synthesis. Comput Struct Biotechnol J. 2023;21:2899-908.

9.Thoring L, Wüstenhagen DA, Borowiak M, Stech M, Sonnabend A, Kubick S. Cell-Free Systems Based on CHO Cell Lysates: Optimization Strategies, Synthesis of "Difficult-to-Express" Proteins and Future Perspectives. PLoS One. 2016;11(9):e0163670.

10.Brödel AK, Sonnabend A, Kubick S. Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. Biotechnol Bioeng. 2014;111(1):25-36.

11.Glinšek K, Bozovičar K, Bratkovič T. CRISPR Technologies in Chinese Hamster Ovary Cell Line Engineering. Int J Mol Sci. 2023;24(9):8144.

12.Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. Nat Biotechnol. 2018;36(12):1136-45.

13.Sarkandy SY, Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Sadeghizadeh M, Farnoud AM, Babaeipour V, et al. A novel amino acid supplementation strategy based on a stoichiometric model to enhance human IL-2 (interleukin-2) expression in high-cell-density Escherichia coli cultures. Biotechnol Appl Biochem. 2010;57(4):151-6.

14.Esfandiar S, Hashemi-Najafabadi S, Shojaosadati SA, Sarrafzadeh SA, Pourpak Z. Purification and refolding of Escherichia coli-expressed recombinant human interleukin-2. Biotechnol Appl Biochem. 2010;55(4):209-14.

15.Murar CE, Ninomiya M, Shimura S, Karakus U, Boyman O, Bode JW. Chemical Synthesis of Interleukin-2 and Disulfide Stabilizing Analogues. Angew Chem Int Ed Engl. 2020;59(22):8425-9.

16.Zemella A, Thoring L, Hoffmeister C, Kubick S. Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems. Chembiochem. 2015;16(17):2420-31.

17.Brödel AK, Kubick S. Developing cell-free protein synthesis systems: a focus on mammalian cells. Pharm. Bioprocess. 2014;2(4):339-48.

[DOI: 10.22088/jbums.27.1.45]