

Design, transformation and proliferation of VEGF111b recombinant isoform in *Escherichia coli* Top10 in order to produce recombinant drugs

Sadegi M^{1*}, Hojjati Z²

1- Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, I. R. Iran.

Received March 14, 2016; Accepted September 4, 2016

Abstract:

Background: The synthesis of recombinant proteins with the aim of inhibiting the tumor receptors is one of the new approaches in cancer treatment. The aim of this study was to design and clone the VEGF 111b recombinant isoform in pBudCE4.1 vector and assess its compatibility with *E.coli* Top10 in order to produce some recombinant drugs.

Materials and Methods: The VEGF111b new isoform designed using gene sequences available in the databases and oligo 7 software was digested by BglII and KpnI enzymes. Then it was cloned at downstream of the EF-1 promoter in the pBudCE4.1 vector.

Isolation of recombinant bacteria was done in LBA medium with the concentration of Zeocin antibiotic (3% and 5%). In the final step, the recombinant vector was extracted using DNA gel extraction kit and VEGF111b recombinant fragment was confirmed by enzyme digestion and sequencing.

Results: The ligation of 111b fragment in expected site was confirmed. The entire *E.coli* Top10 colonies were observed in Zeocin medium (5%) containing recombinant VEGF111b fragment and recombinant colonies (61.9%) were observed at Zeocin medium (3.0%). The existence of VEGF111b sequences in recombinant bacteria was confirmed by enzyme digestion and sequencing.

Conclusion: The present study is an important step in the production process of VEGF111b recombinant protein and evaluating its anticancer effect. Moreover, the pBudCE4.1 vector containing 2 cloning sites and 8 enzyme excision sites is a good candidate for cloning and expression of recombinant proteins in *E.coli* TOP10.

Keywords: *E.coli*, Recombinant Protein, VEGF111b

* Corresponding Author.

Email: ms.sadeghi@yahoo.com

Tel: 0098 21 8893 0684

Fax: 0098 21 8893 1228

Conflict of Interests: **No**

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2016; Vol. 20, No 5, Pages 453-447

Please cite this article as: Sadegi M, Hojjati Z. Design, transformation and proliferation of VEGF111b recombinant isoform in *Escherichia coli* Top10 in order to produce recombinant drugs. *Feyz* 2016; 20(5): 453-47.

طراحی، ترانسفورماسیون و تکثیر ایزوفرم نوترکیب VEGF111b در *E. coli* Top10 برای تولید داروی نوترکیب

مرتضی صادقی^{*۱}، زهره حجتی^۲

خلاصه:

سابقه و هدف: سنتز پروتئین‌های نوترکیب با خاصیت مهار گیرنده‌های رشد در تومورهای سرطانی یکی از راه‌های جدید درمان سرطان است. هدف مطالعه حاضر طراحی و کلون ایزوفرم نوترکیب VEGF111b در وکتور pBudCE4.1 و بررسی سازگاری این سازه با باکتری *E. coli* Top10 جهت تولید داروی نوترکیب است.

مواد و روش‌ها: ایزوفرم جدید VEGF111b با استفاده از توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی و نرم‌افزار 7 oligo طراحی شده و توسط آنزیم‌های BGLII و KpnI بریده شده و در پایین دست پروموتور EF-1 در وکتور pBudCE4.1 کلون شد. وکتور نوترکیب pBud.VEGF111b توسط روش کلرید کلسیم در باکتری *E. coli* Top10 ترانسفورم شد. جداسازی باکتری‌های نوترکیب در محیط LBA حاوی غلظت ۰/۳ و ۰/۵ درصد آنتی‌بیوتیک زئوسین انجام شد. در مرحله آخر وکتور نوترکیب با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (Thermo K0513) استخراج شده و وجود قطعه نوترکیب VEGF111b توسط هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. نتایج: الحاق قطعه 111b در جایگاه مورد نظر تأیید شد. تمامی کلونی‌های *E. coli* Top10 مشاهده شده در محیط حاوی غلظت ۰/۵ درصد زئوسین حاوی قطعه نوترکیب VEGF111b بودند و در غلظت ۰/۳ درصد زئوسین، ۶۱/۹ درصد کلونی نوترکیب مشاهده شد. وجود توالی VEGF111b در باکتری‌های نوترکیب توسط هضم آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر گامی مهم در جهت تولید داروی نوترکیب VEGF111b و بررسی عملکرد ضد سرطانی این پروتئین است. وکتور pBudCE4.1 با دارا بودن ۲ جایگاه کلونینگ و ۸ جایگاه برش آنزیمی کاندید مناسبی برای کلونینگ و بیان پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* Top10 است.

واژگان کلیدی: *E. coli*، پروتئین نوترکیب، VEGF111b

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۵، صفحات ۴۴۷-۴۵۳

مقدمه

فرایند رگ‌زایی شامل شکل‌گیری و خروج رگ‌های خونی جدید از رگ‌های خونی قبلی است و این فرایند با رشد و متاستاز تومورها ارتباط مستقیم دارد [۱، ۲]. در روش‌های درمان جدید، مهارکننده‌های رگ‌زایی به یکی از کاندیداهای مهم در درمان سرطان و پیشگیری از متاستاز تومورها تبدیل شده‌اند [۳، ۴]. فاکتورهای رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) مهم‌ترین عوامل دخیل در رگ‌زایی تومورها هستند. در داخل سلول، mRNA اولیه ژن *VEGF* تحت تأثیر یک فرآیند پیرایش متناوب هشت ایزوفرم پروتئینی مختلف با طول‌های ۲۰۶، ۱۸۹، ۱۸۳، ۱۶۵، ۱۴۸، ۱۴۵، ۱۲۱، ۱۱۱ آمینواسید را پس از خروج سیگنال پپتید تولید می‌کند [۷-۵].

^۱ استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله

^۲ دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، بخش ژنتیک

تلفن: ۰۲۱ ۸۸۹۳۰۶۸۴ | دوره‌نویس: ۰۲۱ ۸۸۹۳۱۲۲۸

پست الکترونیک: ms.sadeghi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۲۴ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۵/۶/۱۴

پیرایش‌های متناوب mRNA اولیه ژن *VEGF* دو نوع از ایزو- فرم‌های VEGF که به صورت VEGF-xxx و VEGF-xxxx نشان داده می‌شوند را به وجود می‌آورد که xxx مشخص کننده تعداد اسید آمینه‌های ایزوفرم خاص بدون در نظر گرفتن سیگنال پپتید است. دو گروه ایزوفرم‌های VEGFxxx و VEGFxxxx از طریق پیرایش متناوب در اگزون انتهایی (اگزون ۸) ایجاد می‌شوند [۹، ۸]. عملکرد کنترلی جایگاه پیرایش نزدیک در اگزون ۸ منجر به تولید ایزوفرم‌های با خاصیت رگ‌زایی یا همان VEGFxxx می‌شود، درحالی‌که جایگاه پیرایش دور، باعث ایجاد ایزوفرم‌های ضد رگ‌زایی VEGFxxxx می‌شود که این ایزوفرم‌ها به گیرنده متصل می‌شوند، ولی به‌خاطر تغییر توالی اگزون ۸ مانع فعال شدن گیرنده می‌شوند [۱۰]. ایجاد این ایزوفرم‌های مختلف از طریق پیرایش متناوب در اگزون‌های ۶، ۷ و ۸ حاصل می‌شود و اگزون‌های ۵-۱ در تمام این ایزوفرم‌ها ثابت هستند [۱۱]. اخیراً استفاده از ایزوفرم‌های گروه xxxb به‌عنوان ایزوفرم‌های مهارکننده خانواده xxx گزارش شده و مشاهده شده است که استفاده از این ایزوفرم‌ها باعث مهار رگ‌زایی و رشد تومورها می‌شود [۱۲]. برای دست‌یابی به بازدهی بهتر در تولید پروتئین‌های نوترکیب، بهتر است توالی

طراحی، ترانسفورماسیون و تکثیر ایزوفرم، ...

بخش ژنتیک دانشکده علوم دانشگاه اصفهان توسط دکتر زهره حاجتی تهیه و تخلیص شده بود، استفاده شد. باکتری *E. coli* Top10 نیز از انسیتو پاستور تهران تهیه شد.

طراحی قطعه نو ترکیب VEGF111b

طراحی قطعه VEGF111b با استفاده از داده‌های موجود در ژن بانک NCBI و نرم‌افزار Oligo 7 انجام شد. با توجه به اینکه قطعه مورد نظر به صورت طبیعی در سلول وجود ندارد، طراحی قطعه به صورت زیر انجام شد: توالی اگزون‌های ۱-۴ ژن *VEGF* به توالی اگزون 8b که خاصیت ضد رگ‌زایی ایجاد می‌کند، متصل شد؛ بدین ترتیب اگزون‌های ۵، ۶ و ۷ از توالی اصلی حذف شد و به جای اگزون ۸ اگزون 8b قرار داده شد. کدون آغاز ATG در اگزون ۱ و کدون پایان TGA در انتهای اگزون ۸ طراحی شد و قبل از کدون آغاز جایگاه برش آنزیم محدودگر BglIII و بعد از کدون پایان جایگاه برش آنزیم KpnI قرار داده شد. طول نهایی توالی پس از برش توسط آنزیم‌های محدودگر برابر ۴۲۹ جفت باز در نظر گرفته شد. توالی توسط نماینده کمپانی فرمتاز در ایران سنتز شد (شکل شماره ۱).

مورد نظر بعد از طراحی و کلونینگ در وکتور مناسب در هر دو سیستم بیانی پروکاریوتی و یوکاریوتی بررسی شده و در مرحله اول کارایی و صحت فرایند روی یک سیستم پروکاریوتی بررسی شود. باکتری *E. coli* Top10 با قدرت ترانسفورماسیون و تکثیر بالای در محیط آزمایشگاه و همچنین قدرت تکثیر مناسب پلازمید خارجی در باکتری یکی از گزینه‌های پروکاریوتی مناسب برای بررسی صحت و میزان کارایی وکتورها است [۱۴،۱۳]. با توجه به اهمیت VEGFها در سرطان‌های مختلف و امکان استفاده از ایزو-فرم‌های گروه xxxb در مهار بیان ایزوفرم‌های گروه xxx در سرطان‌های مختلف و نیز کارایی بالای *E. coli* Top10 در ترانسفورماسیون و تکثیر وکتورهای نو ترکیب، در این مطالعه ما به بررسی امکان طراحی و کلون کردن ایزوفرم جدید VEGF111b در وکتور pBudCE4.1 و بررسی میزان ترانسفورماسیون و تکثیر این وکتور در باکتری *E. coli* Top10 پرداختیم.

مواد و روش‌ها

تهیه وکتور و باکتری

در این مطالعه تجربی از وکتور pBudCE4.1 که قبلاً در

```
AAGCTT ACC ATGA AACTCC TGCTGAGCTG GGTGCACTGG AGCCTGGCCC TGCTGCTGTA
CCTGCACCAC GCCAAGTGGG GCCAGGCCGCCCCATG GCCGAGGGCG GCGGCCAGAA
CCACCACGAGGTGGTGAAGT TCATGGACGT GTACCAGCGC AGCTACTGCC ACCCCATCGA
GACCCTGGTG GACATCTTCC AGGAGTACCC CGACGAGATC GAGTACATCT TCAAGCCCAG
CTGCGTGCCC CTGATGCGCT GCGGCGGCTG CTGCAACGAC GAGGGCCTGG AGTGCGTGCC
CACCGAGGAG AGCAACATCA CCATGCAGAT CATGCGCATC AAGCCCCACC AGGGCCAGCA
CATCGGCGAG ATGAGCTTCC TGCAGCACAA CAAGTGCAG TGCCGCAGCC TGACCCGCAA
GGACTGAGGATCCAAGCTT
```

kpnI

5'...GGTACC...3'
3'...CCATGG...5'

BglIII

5'...AGATCT...3'
3'...TCTAGA...5'

شکل شماره ۱- توالی نو ترکیب VEGF111b. کدون‌های آغاز و پایان با رنگ قرمز، جایگاه‌های برش آنزیم محدودگر با رنگ صورتی و اگزون‌ها با رنگ زرد و آبی مشخص شده‌اند.

تحت القاء پروموتور EF-1 قرار گیرد. سپس، وکتور برش یافته به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت القاء آنزیم آلکالین فسفاتاز (FastAP EF0654, Thermo) قرار گرفت. در مرحله بعد وکتور با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل ساخت فرمتاز (Thermo, K0513) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل جداسازی و تخلیص شد (شکل شماره ۳). قبل از الحاق وکتور و قطعه 111b با استفاده از اسپکتوفوتومتر (Bio-photometer Plus, Germany) تعیین غلظت شدند و توالی

تهیه وکتور نو ترکیب pBud.VEGF111b

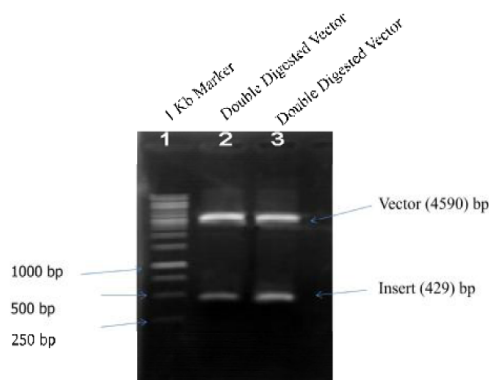
برای ترانسفورم قطعه نو ترکیب 111b به داخل سلول‌های باکتری از وکتور pBudCE4.1 استفاده شد که دارای طول ۴/۶ کیلوباز و حاوی دو پروموتور CMN و EF-1 در دو طرف، و نیز حاوی ژن مقاومت به ژنوسین است (شکل شماره ۲). وکتور توسط آنزیم‌های محدودگر BglIII و KpnI (Thermo) طبق دستورالعمل شرکت سازنده برش داده شد (شکل شماره ۳). جایگاه برش طوری انتخاب شد که توالی 111b بعد از کلونینگ

های A و B) در دمای ۳۷ درجه کشت داده شد و ۱۲ ساعت بعد از کشت تعداد کلونی‌های رشد یافته در هر دو محیط بررسی شد.

تائید ترانسفورم و تکثیر شدن وکتور نو ترکیب pBud.VEGF111b برای تائید واکنش الحاق، ترانسفورماسیون و تکثیر وکتور نو ترکیب، کلونی‌های *E. coli* Top10 رشد یافته روی محیط LBA حاوی زئوسین انتخاب شده و در محیط LB حاوی زئوسین رشد داده شدند. سپس، وکتور با استفاده از کیت جداسازی پلازمید (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo) طبق دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی شد و با هضم آنزیم‌های محدودگر KpnI و BglIII و توالی‌یابی وجود وکتور نو ترکیب تائید شد (شکل شماره ۴).

نتایج

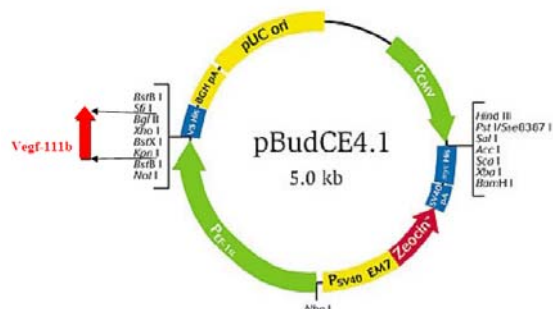
کلونینگ قطعه VEGF111b در جایگاه مورد نظر وکتور pBudCE4.1 بررسی هضم آنزیمی وکتور استخراج شده از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک زئوسین با دو آنزیم محدودگر BglIII و KpnI نشان‌گر دو باند با طول‌های ۴۲۹ و ۴۵۹۰ جفت‌باز است. همان‌طور که انتظار می‌رفت، وجود توالی ۴۲۹ جفت‌باز مربوط به قطعه VEGF111b و توالی ۴۵۹۰ جفت‌باز مربوط به وکتور بریده شده pBudCE4.1 است (شکل شماره ۴).



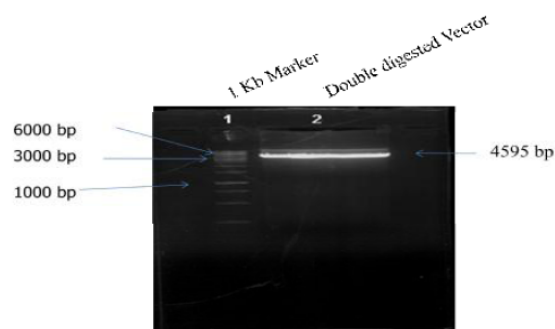
شکل شماره ۴- نتایج ژل الکتروفورز تائید وکتور نو ترکیب استخراج شده از باکتری *E. coli* Top10. ستون ۱: مارکر ۱ کیلوبازی، ستون-های ۲ و ۳: وکتور نو ترکیب برش یافته با طول ۴۵۹۰ جفت‌باز به همراه قطعه 111b (insert) با طول ۴۲۹ جفت‌باز

میزان ترانسفورماسیون و بیان ژن مقاومت به زئوسین در *E. coli* Top10 برای بررسی میزان ترانسفورماسیون و شرایط بهینه انتخاب کلونی‌های نو ترکیب حاوی pBud.VEGF111b در محیط

VEGF111b با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase (Thermo, EL0014) طبق دستورالعمل شرکت به داخل وکتور الحاق شد.



شکل شماره ۲- ساختار وکتور pBudCE4.1 و جایگاه الحاق قطعه VEGF111b. جایگاه و جهت الحاق قطعه VEGF111b در پائین دست پروموتور EF-1 با رنگ قرمز مشخص شده است.



شکل شماره ۳- هضم دوگانه وکتور pBudCE4.1 توسط آنزیم‌های محدودگر KpnI و BglIII. ستون ۱ مارکر 1kb و ستون ۲ وکتور برش یافته با طول ۴۵۹۵ جفت‌باز (۵ جفت‌باز در بین دو جایگاه برش آنزیم‌ها بعد از برش حذف می‌شود).

ترانسفورماسیون وکتور نو ترکیب به داخل *E. coli* Top10 سلول مستعد (Competent Cells) باکتری *E. coli* Top10 مورد نیاز برای ترانسفورماسیون به صورت دستی و طبق پروتکل استاندارد تهیه شد [۱۵]. ترانسفورماسیون به روش تیمار CaCl₂ روی یخ و شوک حرارتی انجام شد [۱۵]. و از وکتور pBudCE4.1 فاقد قطعه 111b به عنوان کنترل مثبت و باکتری *E. coli* Top10 بدون ترانسفورماسیون به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جداسازی باکتری‌های نو ترکیب

جهت جداسازی باکتری‌های نو ترکیب و سنجش میزان موفقیت ترانسفورماسیون، ۲۰۰ میکرولیتر از سلول‌های ترانسفورم شده در شرایط استریل روی دو محیط جامد LBA حاوی غلظت-های ۰/۳ و ۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک زئوسین (محیط-

شد (شکل شماره ۴)، قطعه نو ترکیب VEGF111b در تمامی ۹ کلونی مشاهده شد.

نتایج تعیین توالی

نتایج تعیین توالی قطعه VEGF111b استخراج شده از باکتری‌های نو ترکیب نشان دهنده مطابقت ۱۰۰ درصدی توالی این قطعه با توالی آگزون ۱ تا ۴ و آگزون 8b ژن VEGFA موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد DQ229900 است (شکل شماره ۵).

LBA حاوی مقادیر متفاوت زئوسین به صورت زیر کشت داده شد: محیط A: حاوی ۰/۳ میکرولیتر بر میلی لیتر زئوسین، تعداد ۴۲ کلونی در کشت این محیط مشاهده شد که از ۲۱ کلونی به صورت تصادفی پلازمید استخراج شد و بعد از هضم روی آگاروز بررسی شد (شکل شماره ۴). از ۲۱ کلونی ۱۳ کلونی (۶۱/۹ درصد) دارای قطعه نو ترکیب و ۷ کلونی (۳۸/۱ درصد) فاقد این قطعه (مثبت کاذب) بودند. محیط B: حاوی ۰/۵ میکرولیتر بر میلی لیتر زئوسین، تعداد ۹ کلونی در کشت این محیط مشاهده شد، از هر ۹ کلونی پلازمید استخراج شد و بعد از هضم روی آگاروز بررسی

Gene alignment report 1/1

sadeghi

temp-M13F-40+	AAGAGGATCTGGAATTCGATGGTACCCACCATGAACCTCCTGCTGAGCTGGGTGCACTGGA	60
temp+	GGTACCACCATGAACCTCCTGCTGAGCTGGGTGCACTGGA	40
consensus		
temp-M13F-40+	GCCTGGCCCTGCTGCTGTACCTGCACCACGCCAAGTGGAGCCAGGCCGCCCCCATGGCCG	120
temp+	GCCTGGCCCTGCTGCTGTACCTGCACCACGCCAAGTGGAGCCAGGCCGCCCCCATGGCCG	100
consensus		
temp-M13F-40+	AGGGCGGGCCGAGAACCCACCGAGGTGGTGAAGTTCATGGACGTGTACCAGCGCAGCT	180
temp+	AGGGCGGGCCGAGAACCCACCGAGGTGGTGAAGTTCATGGACGTGTACCAGCGCAGCT	160
consensus		
temp-M13F-40+	ACTGCCACCCCATCGAGACCCTGGTGGACATCTCCAGGAGTACCCCGACGAGATCGAGT	240
temp+	ACTGCCACCCCATCGAGACCCTGGTGGACATCTCCAGGAGTACCCCGACGAGATCGAGT	220
consensus		
temp-M13F-40+	ACATCTTCAAGCCAGCTGCGTGCCCTGATGCGCTGCGGCCGCTGCTGCAACGACGAGG	300
temp+	ACATCTTCAAGCCAGCTGCGTGCCCTGATGCGCTGCGGCCGCTGCTGCAACGACGAGG	280
consensus		
temp-M13F-40+	GCCTGGAGTGCCTGCCACCGAGGAGCAACATCACCATGCAGATCATGCGCATCAAGC	360
temp+	GCCTGGAGTGCCTGCCACCGAGGAGCAACATCACCATGCAGATCATGCGCATCAAGC	340
consensus		
temp-M13F-40+	CCCACCGGGCCAGCACATCGGCGAGATGAGCTTCTGCAGCACAACAAGTGCAGTGC	420
temp+	CCCACCGGGCCAGCACATCGGCGAGATGAGCTTCTGCAGCACAACAAGTGCAGTGC	400
consensus		
temp-M13F-40+	GCAGCCTGACCCGCAAGGACTGAAGATCTATCGAATCTATCCTTATGACGTGCCTGACT	480
temp+	GCAGCCTGACCCGCAAGGACTGAAGATCT	429
consensus		

شکل شماره ۵- نتیجه تعیین توالی قطعه 111b بعد از جداسازی از کلونی‌های نو ترکیب Top 10 *E. coli*

coli Top10 پرداختیم. برای این منظور، قطعه VEGF111b بعد از طراحی و برش با آنزیم‌های BglIII و KpnI تحت کنترل پروموتور EF-1 در وکتور pBudCE4.1 قرار گرفت. این وکتور با داشتن دو جایگاه کلونینگ و ۸ جایگاه برش آنزیمی برای بیان هم‌زمان ژن‌ها و هم‌چنین ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک زئوسین کاندید مناسبی برای بیان ژن‌های یوکاریوتی است. در چندین مطالعه کلونینگ ژن‌های مختلف یوکاریوتی در نقاط متفاوت این وکتور گزارش شده است [۲۲-۲۰]. Kazemi و همکاران با کلون کردن ژن VEGF در وکتور pTZ57R/T و ترانسفورماسیون در باکتری *E. coli* Top10، با تخلیص موفق وکتور نو ترکیب حاوی ژن VEGF، وکتور pTZ57R/T و این سویه را برای تولید VEGF مناسب گزارش کرده‌اند [۲۳]. Leopold و همکاران نیز با کلون کردن گیرنده VEGF در وکتور pET28a و ترانسفورم باکتری *E. coli*، بیان بالای این پروتئین نو ترکیب را گزارش

بحث

با توجه به اهمیت فرایند رگ‌زایی در رشد و متاستاز دادن تومورهای سرطانی به نواحی جدید، در سال‌های اخیر تولید و به-کارگیری مهارکننده‌های رگ‌زایی به‌عنوان کاندیداهای مهم درمان سرطان در حال مطالعه است [۱۶، ۱۷]. در این روش با جلوگیری از دست‌یابی تومور به رگ‌های خونی مورد نیاز برای رشد و گسترش تومور، تومور در حالت اولیه و غیر متاستازی باقی می‌ماند [۱۸]. VEGFها به‌عنوان مهم‌ترین عوامل رگ‌زایی، یکی از اهداف این نوع درمان هستند؛ در همین راستا، تولید VEGFهای خانواده xxxb با توانائی اتصال و مهار کردن گیرنده VEGF و در نتیجه مهار کردن فرایند رگ‌زایی به‌عنوان گروهی از داروهای مهار کننده تومور مورد توجه محققین است [۱۹]. در این مطالعه ما به بررسی امکان کلونینگ VEGF111b در وکتور pBudCE4.1 و هم-چنین میزان سازگاری این وکتور با سیستم تکثیر و سیستم بیانی *E.*

نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه تطابق ۱۰۰ درصدی نتایج تعیین توالی قطعه 111b نوترکیب با توالی اگزون ۱ تا ۴ و اگزون 8b ژن *VEGFA* موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشانگر بهینه بودن شرایط الحاق و هم‌چنین سازگاری کامل این وکتور با سیستم تکثیر و بیان باکتری *E. coli* Top10 است و در تحقیقات بعدی روی تولید پروتئین‌های نوترکیب در سویه TOP10 وکتور pBudCE4.1 می‌تواند با کارایی بالا مورد استفاده قرار گیرد. هم‌چنین، به‌علت خاصیت دوگانگی وکتور pBudCE4.1 (شامل وکتور) در مطالعات آتی می‌توان برای تولید داروی نوترکیب *VEGF111b* در سلول‌های یوکاریوتی از همین سازه استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

از بخش تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان به‌خاطر فراهم کردن تجهیزات مورد نیاز برای انجام این مطالعه صمیمانه تشکر می‌شود.

References:

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43: 175-203.
- [2] Gazdar AF, Minna JD. Angiogenesis and the multistage development of lung cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1611-2.
- [3] Cardones AR, Banez LL. VEGF inhibitors in cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2006; 12(3): 387-94.
- [4] Zondor SD, Medina PJ. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. *Ann Pharmacother* 2004; 38(7-8): 1258-64.
- [5] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1): 4-25.
- [6] Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 1997; 79: 233-69.
- [7] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13(1): 9-22.
- [8] Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62(14): 4123-31.
- [9] Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEG-

کرده‌اند [۲۴]. Behdani و همکاران در مطالعه‌ای هم‌راستا با مطالعه حاضر ایزوفرم VEGF121 را در وکتور pET-26b کلون کرده و موفق به بیان و تخلیص آن در باکتری *E. coli* BL-21 شدند [۲۵]. در این مطالعه بعد از تایید صحت کلونینگ، ما به بررسی میزان ترانسفورماسیون روی محیط انتخابی LBA با غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ژنوسین پرداختیم. طبق یافته‌های ما پروموتور ویروس Psv40 بیان‌کننده ژن مقاومت با سیستم بیانی باکتری Top10 سازگاری بسیار خوبی دارد و بهترین حالت برای جداسازی باکتری‌های نوترکیب رشد در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۱۲ ساعت در محیط LBA حاوی ۰/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ژنوسین است. در باکتری *E. coli* نوترکیب بیان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک بستگی مستقیم به میزان آنتی‌بیوتیک موجود در محیط دارد و کاهش میزان آنتی‌بیوتیک محیط کشت می‌تواند باعث رشد باکتری‌های غیر نوترکیب و ایجاد حالت مثبت کاذب شود [۲۶]. در صورت ایجاد جهش در پروموتور یا توالی ساختاری ژن ژنوسین، بیان ناقص این ژن باعث عدم رشد کلونی‌ها روی محیط دارای غلظت استاندارد آنتی‌بیوتیک می‌شود [۲۷].

- F165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004; 64(21): 7822-35.
- [10] Cui TG, Foster RR, Saleem M, Mathieson PW, Gillatt DA, Bates DO, et al. Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4): 767-73.
- [11] Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2002; 22(2): 143-152.
- [12] Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351(27): 2805-16.
- [13] Molinkova D. Purification of Escherichia coli-expressed HIS-tagged Maedi-Visna p25 core antigen by Ni²⁺-chelate affinity chromatography. *Vet Med-Czech* 2001; 46(2): 50-4.
- [14] Bitazar R, Taghi Naserpour F, Hajikhani B, Bagheri R, Salimi A. Cloning and expression of truncated chlamydia major outer membrane protein in *E. coli*: A miniature step forward. *J Vaccines Vaccin* 2014; 5: 1.

- [15] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- [16] Ziche M, Donnini S, Morbidelli L. Development of new drugs in angiogenesis. *Curr Drug Targets* 2004; 5(5): 485-93.
- [17] Glade-Bender J, Kandel JJ, Yamashiro DJ. VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3(2): 263-76.
- [18] Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med* 1975; 82(1): 96-100.
- [19] Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002; 29 (6 Suppl 16): 3-9.
- [20] Norouzi R, Hojati Z. Construction of pBud.CE4.1 IFN β (Human Beta Interferon) and Analysis of its Expression Level in Transfected HEK293 Cell via This Construct. *J Isfahan Med Sch* 2015; 33(354): 1691-700.
- [21] Yazdanpanah-Samani M, Mahmoudi Maymand E, Jahangeerfam T, Ghaderi A. Construction of CTLA-4-Ig Fusion Gene in pBudCE4.1 Expression Vector. *Avicenna J Med Biotechnol* 2015; 7(4): 179-81.
- [22] Jia X, Cheng K, Mahato RI. Coexpression of Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-1 Receptor Antagonist for Improved Human Islet Survival and Function. *Mol Pharm* 2007; 4(2): 199-207.
- [23] Yazdanfar M, Bandehpour M, Yarian F, Koochaki A, Parivar K, Kazemi B. Cloning and expression of human vascular endothelial growth factor gene and inhibition of its expression by antisense in prokaryotic system. *Daru* 2010; 18(4): 281-5.
- [24] Leopold AV, Baklaushev VP, Pavlov KA, Chekhonin VP. Expression of a Recombinant Extracellular Fragment of Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor VEGFR1 in *E. coli*. *Experi Biol Med* 2011; 151(3): 322-7.
- [25] Kazemi-Lomedasht F, Behdani M, Pooshang Bagheri K, Habibi Anbouhi M, Abolhassani M, Khanahmad H, et al. Expression and Purification of Functional Human Vascular Endothelial Growth Factor-A121; the Most Important Angiogenesis Factor. *Adv Pharm Bull* 2014; 4(4): 323-8.
- [26] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York; 1993.
- [27] Van Blokland HJ, Kwaks TH, Sewalt RG, Verhees JA, Klaren VN, Siersma TK, et al. A novel, high stringency selection system allows screening of few clones for high protein expression. *J Biotechnol* 2007; 128(2): 237-45.