[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

انتقال و بیان ژن GnRH نوترکیب ماهی در باکتری *E. coli* BL21 به منظور تولید هورمون نوترکیب

صدیقه محمدزاده[۱]، سکینه یگانه*[۱]، فاطمه مرادیان[۲]، بهرام فلاحتکار[۳]، سلواین میلا[۴]

s.yeganeh@sanru.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۲- گروه علوم پایه، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران

۳- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

٤- گروه بیولوژی، دانشکده علوم و تکنولوژی، دانشگاه لورین، نانسی، فرانسه: ٥٤٥٠٥

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۸

چکیده

هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) یک نوروپپتید موثر در تنظیم فرآیند تولیدمثل در مهره‌داران می‌باشد. آنالوگ‌های مختلفی از این هورمون به فرم سنتتیک با نیمه عمرهای مختلف برای تکثیر مصنوعی آبزیان در بازار موجود می‌باشند. هدف از این تحقیق بررسی بیان GnRH نوترکیب در باکتری *Escherichia coli* سویه BL21 به منظور تولید هورمون نوترکیب می‌باشد. در این تحقیق، توالی DNA مربوط به پپتید GnRH طراحی شده در وکتور بیانی $pET28a^{+}$ کلون شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به کمک آغازگرهای اختصاصی صحت کلونینگ را نشان داد. وکتور نوترکیب $pET28a^{+}$/GnRH به باکتری بیانی *E. coli* BL21 (DE3) انتقال داده شد و صحت انتقال با کلونی PCR سنجیده شد و باند ۱۸۶ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن بر ژل آگارز مشاهده گردید. سپس برای بررسی بیان، باکتری نوترکیب در محیط Luria Bertani (LB) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و با غلظت یک میلی‌مولار Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranpside (IPTG) القاء شد و بعد از القاء، باکتری در دو دما و زمان مختلف شامل ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. میزان بیان به کمک الکتروفورز ژل SDS-PAGE تعیین شد. بررسی SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان پپتید بوده و باند هشت کیلودالتونی مربوط به پپتید مورد نظر بر روی ژل قابل مشاهده بود. همچنین میزان بیان پپتید در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بیشتر از دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که هورمون GnRH قابلیت تولید در سیستم بیانی پروکاریوتی همانند اشریشیاکلی را دارد و پس از خالص سازی می‌تواند به‌عنوان یک همولوگ خاص برای درمان اختلالات تولید مثلی در آبزیان معرفی گردد.

لغات کلیدی: GnRH، اشریشیاکلی، القای هورمونی، آبزیان

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

مقدمه

تعداد گونه‌های آبزی برای تکثیر و پرورش مصنوعی با توجه به توسعه آبزی‌پروری تجاری در حال افزایش می‌باشد (Constantinos *et al*., 2001). مهم‌ترین گام جهت تکثیر مصنوعی ماهیان و مطلوب کردن مدیریت و فن‌آوری پرورش مولدین استحصال تخم و همزمان سازی استحصال سلول‌های جنسی از جنس نر و ماده می‌باشد. این عمل سبب کاهش هزینه، ساده کردن جمع‌آوری سلول‌های جنسی و انکوباسیون تخم می‌گردد. دستکاری هورمونی در آبزی‌پروری تجاری حتی در مورد گونه‌هایی که به صورت طبیعی مرحله تخمک‌گذاری و اسپرمیشن را طی می‌کنند نیز اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد، بطوریکه در بسیاری از کارگاه‌های تکثیر ماهیان جهت بهینه‌سازی و همزمانی تولید تخم و لارو، کاهش دستکاری و استرس وارده به ماهیان و نیز کاهش هزینه‌های تخمک‌گذاری و اسپرمیشن القاء هورمونی صورت می‌گیرد (سوداگر و همکاران، ۱۳۹۵). مطالعات نشان داده‌اند که پارامترهای مختلف تولیدمثلی از جمله زمان رسیدگی، هم‌آوری کاری، تعداد تخم، درصد لقاح و سطح استروئیدهای جنسی تحت تاثیر هورمون‌های مورد استفاده در تکثیر مصنوعی آبزیان قرار می‌گیرد (Aizen *et al*., 2005; Barrero *et al*., 2008; Falahatkar *et al*., 2013). هورمون‌های مختلفی برای تکثیر مصنوعی آبزیان در مراکز تکثیر و پرورش استفاده می‌شود و یکی از انواع این هورمون‌ها، آنالوگ‌های مختلفی از GnRH می‌باشد (Zohar *et al*., 2001).

GnRH یک نوروهورمون دکاپپتیدی است که از هیپوتالاموس ترشح شده و سبب تحریک سنتز و ترشح گنادوتروپین‌ها از هیپوفیز می‌شود (Okubo and Nagahama, 2008). ساختار معمولی پروتئین پیش‌ساز GnRH از یک سیگنال پپتیدی در ناحیه انتهای آمینی (N-terminal) (تقریباً ۲۸ اسیدآمینه)، یک بخش ده اسیدآمینه‌ای (دکا پپتید) که قسمت فعال پپتید محسوب می‌شود و به دنبال آن یک بخش با سه اسیدآمینه گلایسن، لیزین و آرژینین برای هضم با آنزیم پروتئولیتیک وجود دارد و در انتها در قسمت کربوکسیل (C-terminal) بخش وابسته به پپتید با عنوان GnRH-associated peptide (GAP) به طول تقریبی ۶۰ اسیدآمینه‌ای وجود دارد (Zemora *et al*., 2002). با توجه به ساختار پپتیدی هورمون GnRH، این هورمون در معرض انواعی از اندوپپتیدازها در بدن قرار دارد که سبب کاهش نیمه عمر آن می‌شود، بطوریکه GnRH طبیعی به مدت پنج دقیقه در بدن باقی می‌ماند و سپس توسط پپتیدازها تخریب می‌شود (Gothilf and Zohar, 1991). آنالوگ‌های مختلفی از GnRH با نیمه عمرهای متفاوت در بازار وجود دارند که در القاء رسیدگی نهایی جنسی در ماهیان پرورشی استفاده می‌شوند. تزریق GnRHa سنتتیک همیشه در همه گونه‌ها سبب تخمک‌گذاری ۱۰۰ درصد نمی‌شود و در گونه‌هایی با توسعه تخمدانی غیر همزمان، تناوب تخم‌ریزی روزانه و اوولاسیون طولانی‌مدت فقط در درصد کمی از مولدین سبب القاء می‌شود. عدم پاسخ‌دهی تزریق یکباره GnRHa در القاء رسیدگی نهایی جنسی ماهیان مربوط به نیمه‌عمر کوتاه آن در گردش خون می‌باشد (Constantinos *et al*., 2001). با توجه به نیمه عمر پایین هورمون‌های سنتتیک و نظر به آنکه بدست آوردن مقادیر زیادی از این پروتئین از منابع طبیعی کاری سخت، زمان‌بر و پر هزینه است و همچنین پروتئین طبیعی نیمه عمر پایینی دارد، توجه محققان به سمت تولید این پروتئین نوترکیب در میزبان‌های مختلف معطوف شده است که نیمه‌عمری بالاتر داشته باشد و نیازی به تزریق متعدد برای القاء رسیدگی جنسی در ماهیان نباشد. ابزارهای مولکولی و روش‌های متنوعی از جمله استفاده از حامل‌های بیانی، گونه‌های مهندسی ژنتیک شده و استراتژی‌های مختلف کشت منابع میکروبی برای تولید پروتئین‌های هترولوگ در مقیاس بالا وجود دارند. تعدادی از عوامل تاثیرگذار در بازده نهایی تولید پروتئین نوترکیب، ترکیب محیط کشت، زمان و دمای القاء پروموتر می‌باشد. استفاده از باکتری *E. coli* با تراکم سلولی بالا با استفاده از محیط‌ها و غلظت‌های مختلف Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranpside (IPTG) برای تولید پروتئین‌های نوترکیب متنوعی گزارش شده است (German *et al*., 2014). بنابراین، هدف از این

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

مطالعه تولید پروتئین GnRH به فرم نوترکیب در باکتری *E.coli* BL21 (DE3) و بهینه‌سازی عوامل موثر در بیان آن به منظور دستیابی به بیان بالا در این میزبان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیک

توالی DNA مربوط به هورمون GnRH ماهیان مختلف از بانک اطلاعاتی NCBI (National Center Biotechnology Information) استخراج گردید. توالی پپتیدی این هورمون در انواع مختلف ماهیان نیز بررسی شد و بهترین توالی به لحاظ پایداری بیشتر در برابر هضم آنزیم‌های پروتئولیتیک و ماندگاری بیشتر در سیستم زنده در نظر گرفته شد. سپس با توجه به توالی انتخابی برای این پپتید، توالی ژنی آن ترجمه شد. پس از انتخاب توالی ژنی و نواحی مورد نظر از جمله ناحیه دکاپپتید (پپتید فعال) و ناحیه GAP، جهت تسهیل در امر کلونینگ و بیان ژن، تغییراتی از جمله افزودن کدون شروع و خاتمه بر توالی ژن و افزودن جایگاه برش آنزیم‌های محدود کننده در هر دو انتهای ژن صورت گرفت. با مجموعه تغییرات صورت گرفته، توالی مورد نظر با ۱۸۶ جفت باز به شرکت Shainegene کشور چین برای سنتز بیوشیمیایی ارسال شد و به صورت کلون شده در وکتور بیانی $pET28a^+$ دریافت گردید.

تهیه باکتری مستعد و ترانسفورماسیون وکتور در باکتری *E.coli* BL21(DE3)

باکتری *E. coli* BL21(DE3) از شرکت سیناژن (تهران، ایران) خریداری شد و یک کلونی از باکتری مورد نظر در پنج میلی‌لیتر محیط کشت اختصاصی Luria Bertani (LB) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۵۰ rpm در انکوباتور شیک‌دار به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت یک میلی‌لیتر از کشت اولیه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB تازه تا هنگامی که تراکم باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶-۰/۴ رسید، انکوباسیون گردید. محیط کشت حاصل در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۰/۱ مولار سرد حل گردید و در دور g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ لایه رویی دور ریخته شده و رسوب حاصله در چهار میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار حل گردید. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری مستعد شده *E. coli* BL21(DE3) حدود پنج میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) از پلاسمید نوترکیب اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد و سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی داده شد و بلافاصله به مدت پنج دقیقه درون یخ قرار گرفت. سپس محیط کشت LB تازه که فاقد آنتی‌بیوتیک بود به میکروتیوپ حاوی باکتری اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۲۵۰ کشت داده شد. سپس در دور g ۲۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط LB به صورت سوسپانسیون درآمده و بر روی محیط جامد LB حاوی کانامایسین با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه داده شد. پس از تشکیل کلنی‌های باکتری نوترکیب جهت صحت وجود وکتور نوترکیب $pET28a^+$/GnRH غربالگری کلنی صورت گرفت (Jagdish *et al*., 2017).

تایید وکتور نوترکیب با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

برای تایید صحت توالی ژن سنتز، حضور آن در وکتور نوترکیب و باکتری نوترکیب لازم بود تا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تکثیر ژن انجام شود. آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت سیناژن به صورت شیمیایی سنتز گردید (جدول ۱). برای اطمینان از وجود وکتور نوترکیب در باکتری میزبان یک کلنی از باکتری ترانسفورم شده در۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید. سپس کوکتل واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد (جدول ۲) و واکنش PCR مطابق با برنامه ذیل در دستگاه PCR (BioRad، کالیفرنیا، آمریکا) انجام شد (جدول ۳). جهت بررسی محصولات تکثیر ژن، محصول PCR بر ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی بافر TBE (1X) برده شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید‌رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از دستگاه ژل داک (BioRad، کالیفرنیا، آمریکا) باندهای مربوط به ژن تکثیر شده و نشانگر وزن مولکولی استاندارد مشاهده گردید.

جدول ۱: توالی و مشخصات آغازگرهای سنتزشده جهت واکنش

Table 1: Primer pairs used in the amplification.

آغازگرها	سکانس	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	طول قطعه (جفت باز)
Forward	5 -CCATGGGAACATTGGAGCCATAGC-3´	۵۹/۱	۱۸۶
Revers	5´ -AAGCTTCTTCTTCCTCTGCATCTG-3´	۵۵/۷	۱۸۶

جدول ۲: اجزای واکنش PCR

Table 2: PCR reaction.

اجزای واکنش	حجم (میکرولیتر)
مستر میکس PCR	۱۲
پرایمر Forward	۲
پرایمر Reverse	۲
کلنی حل شده	۲
آب مقطر استریل	۷

جدول ۳: برنامه واکنش PCR

Table 3: PCR program.

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	چرخه (تعداد)
واسرشت‌سازی DNA	۹۴	۱۰	۳۰
تک رشته‌ای شدن DNA	۹۴	۱	
اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای	۵۷	۱	
تکثیر آغازگر	۷۲	۱/۳۰	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	
نگهداری	۴	بی‌نهایت	

بهینه سازی میزان تولید پپتید نوترکیب

ابتدا یک کلونی از باکتری‌های نوترکیب در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به صورت شبانه کشت داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از کشت اول در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۲۵۰ انکوبه گردید تا زمانی که OD کشت مورد نظر در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۸-۰/۶ برسد. جهت تعیین دما و زمان بهینه القاء برای تولید میزان بیشتر پپتید نوترکیب، محیط کشت باکتری در غلظت‌های ۰/۵، یک و پنج میلی‌مولار IPTG در دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت بترتیب در دمای ۳۷ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. پس از القاء و رشد، باکتری‌ها در g ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و لایه رویی جهت بررسی وجود پپتید نوترکیب در آن نگهداری شد. رسوب باکتری در ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده (Tris ۱۰۰

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

میلی‌مولار، NaCl ۱۰۰ میلی‌مولار، مهارکننده‌های پروتئازی، ۰/۵ درصد تریتون با pH = ۸ حل گردید و تخریب دیواره سلولی باکتری‌ها با دستگاه سونیکاتور (Hielscher، آلمان) در سه مرحله، هر مرحله ۳۰ ثانیه با ۴۵ ثانیه توقف بین هر مرحله درون یخ انجام شد. سپس محلول بدست آمده در دور g ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانترفیوژ و لایه رویی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (Xu *et al.*, 2006).

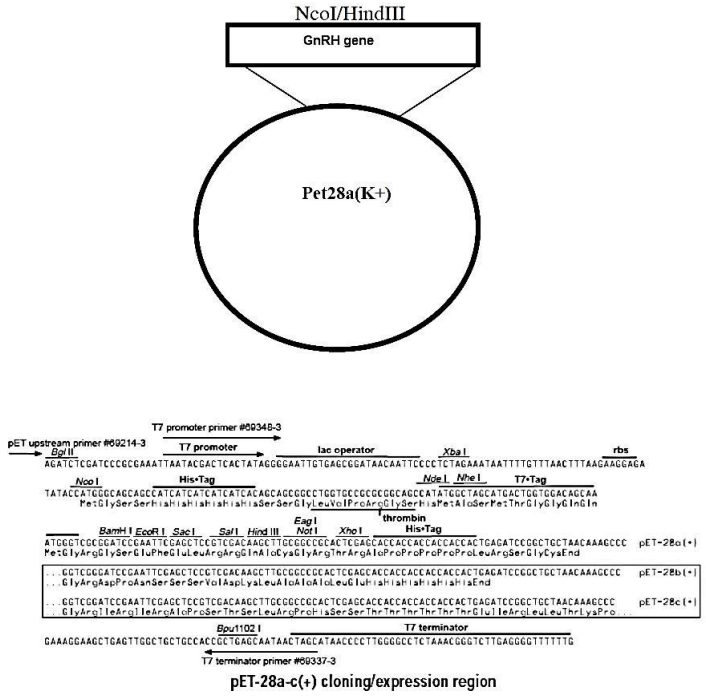
ردیابی پپتید نوترکیب با استفاده از ژل SDS-PAGE

جهت مشاهده باند مربوط به پپتید نوترکیب تولیدی، نمونه‌های تهیه شده در ژل ۱۵٪ SDS-PAGE الکتروفورز شدند. ژل SDS-PAGE از دو قسمت تشکیل شده که ابتدا ژل آماده گردید و سپس نمونه‌ها بارگذاری شدند. نمونه‌هایی که شامل پروتئین استخراج شده از باکتری القاء شده در زمان‌های مختلف و باکتری القاء نشده بودند، الکتروفورز گردید. با پایان یافتن زمان الکتروفورز رنگ‌آمیزی ژل به کمک کوماسی برلیان‌بلو انجام گرفت و برای مشاهده باندهای پروتئینی رنگ بری از ژل با استفاده از محلول رنگ بر شامل ۱۰ درصد استیک اسید و ۱۵ درصد متانول انجام شد (Laemmli, 1970).

نتایج

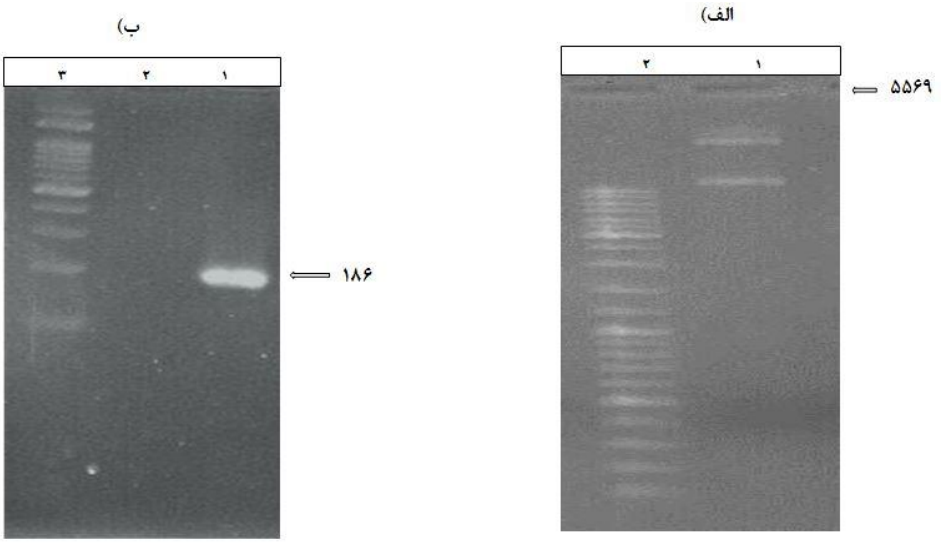
نقشه وکتور و مکان ژن درون آن در شکل ۱ قابل مشاهده است. در شکل دو، باند حاصل از وکتور دریافتی بر روی ژل آگارز قابل مشاهده می‌باشد. صحت انتقال وکتور نوترکیب با واکنش PCR سنجیده شد و باند ۱۸۶ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن در واکنش PCR بر ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۲).

پس از استخراج پروتئین از باکتری نوترکیب در القاء با IPTG یک میلی‌مولار در دو زمان و دمای متفاوت نتیجه وجود باند مربوط به پپتید نوترکیب در شکل ۳ ارائه شده است. باند پروتئینی حدود هشت کیلو دالتون در باکتری نوترکیب تولید شده در حالی‌که این باند در باکتری بدون القاء به عنوان کنترل منفی دیده نشد. همچنین نتایج نشان داد که میزان بیان در باکتری نوترکیب میزبان در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت بعد از القاء بالاتر می‌باشد.



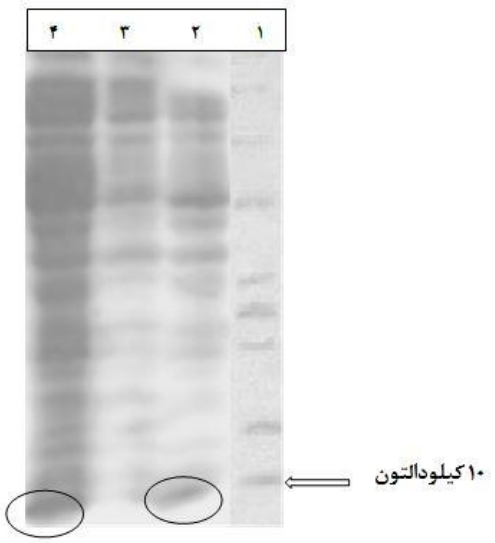
شکل ۱: نقشه وکتور و جایگاه ژن کلون شده درون آن

Figure 1: Vector map and region of gene cloned .



شکل۲: محصول PCR. الف) ستون ۱: وکتور دریافتی، ستون ۲: نشانگر مولکولی (شرکت سیناژن SL7041,PR911653)، ب) بعد از انتقال وکتور نوترکیب به باکتری میزبان. ستون ۱: محصول کلونی PCR، ستون ۲: کنترل منفی واکنش PCR، ستون ۳: نشانگر مولکولی (شرکت سیناژن، SL7041, PR911653).

Figure 2: PCR product, A) line 1. Recived vector, line 2. DNA molecular weight marker (CinnaGen, SL7041, PR911653). B) After transformation. Line 1. Colony PCR product, line 2. Negative control, line 3. DNA molecular weight marker (CinnaGen, SL7041, PR911653)



شکل ۳: بیان پروتئین نوترکیب در باکتری میزبان. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی پروتئینی (شرکت Biocompare، MBS355495)، ستون ۲: باکتری القاء شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ستون ۳: باکتری القاء نشده (کنترل منفی)، ستون ۴: باکتری القاء شده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد.

Figure 3: SDS-PAGE gel electrophoresis of protein extraction of the recombinant bacteria cells. Line 1. Protein molecular weight marker (Biocompare MBS355495); line 2. Induce bacteria cell in 37 ° C, 3. Uninduce bacteria cell (control), line 4. Induced bacteria cell in 20 ° C.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

بحث

امروزه نیاز به استفاده از القاءکننده‌های تکثیر از قبیل عصاره غده هیپوفیز، گنادوتروپین جفت انسانی، GnRH و LHRH در تکثیر مصنوعی آبزیان به اثبات رسیده است و بکارگیری موفق این هورمون‌ها در مطالعات مختلفی گزارش شده است (کلیاسی و همکاران، ۱۳۹۱). در میان القاءکننده‌های تکثیر در آبزیان استفاده از آنالوگ‌های مختلف GnRH زایای بیشتری در مقایسه با سایر القاءکننده‌ها دارند (Constantinos *et al*., 2001). آنالوگ‌های مختلفی از GnRH با نیمه‌عمرهای متفاوت در بازار وجود دارند که به روش سنتز شیمیایی تولید شدند. روش سنتز شیمیایی روش کارآمدی برای تولید مولکول‌های کوچک است، ولی فرآیند پیچیده و پرهزینه می‌باشد و برای تولید پروتئین بسیار پیچیده مناسب نمی‌باشد. بنابراین، تولید در مقیاس بالای پروتئین‌ها به طور عمده مستلزم تولید در سیستم‌های زنده است. از سوی دیگر، ایزوله کردن پپتیدها و پروتئین‌ها از منابع طبیعی فرآیندی فشرده و زمان‌بر می‌باشد و تولید در مقیاس بالا را با مشکل مواجه می‌کند (Gerngross, 2004; Li, 2011). امروزه با ظهور تکنولوژی DNA نوترکیب ابزاری مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌ها فراهم گردید. در این مطالعه امکان تولید فرم نوترکیب این هورمون در میزبان پروکاریوتی به منظور تولید یک آنالوگ با هدف افزایش پایداری در سیستم زنده برای درمان اختلالات تولیدمثلی در آبزیان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا توالی اسیدآمینه‌ای این هورمون مربوط به ماهیان مختلف از پایگاه اطلاعات داده‌ها NCBI انتخاب شد. سپس بهترین توالی با در نظر گرفتن اسیدهای‌آمینه حفظ شده و اسیدهای‌آمینه پایدارتر انتخاب شدند و توالی پروتئینی در سایت www.expasy.org/tools/translate ترجمه شده تا توالی ژنی آن بدست آید. توالی ژنی مطابق با کدون‌های باکتری میزبان بیانی *E. coli* در نظر گرفته شد و بعد از سنتز در وکتور بیانی $pET28a^+$ کلون گردید. وکتورهای بیانی مختلفی برای کلونینگ وجود دارد، اما در این مطالعه از وکتور بیانی $pET28a^+$ استفاده شد. این وکتورها دارای پروموتور قوی T_7 می‌باشند و بیان بالایی از ژن پایین دست خود را حمایت می‌کند. در مطالعه حاضر برای تولید GnRH نوترکیب با توجه به ویژگی این پروتئین که فاقد تغییرات پس از ترجمه می‌باشد، از باکتری بیانی *E. coli* BL21(DE3) استفاده شد. Raina و همکاران (۲۰۰۴) و Jagdish و همکاران (۲۰۱۷) برای تولید LHRH نوترکیب و Xu و همکاران (۲۰۰۶) برای تولید GnRH نوترکیب انسانی از باکتری *E. coli* BL21(DE3) استفاده کردند. کیفیت پروتئین، عملکرد، سرعت تولید و بازده مهم‌ترین عوامل هنگام انتخاب سلول میزبان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب هستند. این باکتری به عنوان یک کارخانه سلولی در تولید پروتئین نوترکیب شناخته شده است و محبوب‌ترین سیستم بیانی می‌باشد (German *et al*., 2014). استفاده از باکتری *E. coli* به‌عنوان ارگانسیم میزبان دارای مزیت‌هایی می‌باشد که می‌توان به رشد سریع و بی‌نظیر آن در محیط کشت های ارزان، قابل دسترس و در شرایط محیطی مطلوب اشاره کرد بطوریکه به مدت ۲۰ دقیقه به حجم دو برابر می‌رسد و تراکم سلولی بالا براحتی بدست خواهد آمد (Shiloach and Fass, 2005; Sezonov *et al*., 2007). علاوه بر سرعت رشد بالا، روش کشت آن ساده‌تر و بیان پروتئین نوترکیب در این میکروارگانیسم‌ها با القاء متابولیک همراه است که موجب کاهش زمان تولید می‌گردد و همچنین انتقال DNA خارجی سریع و راحت است و در زمان کمتر از پنج دقیقه انجام خواهد شد و همچنین با توجه به گرم منفی بودن، روش لیز کردن باکتری ساده‌تر می‌باشد (German *et al*., 2014).

بعد از انتقال یکی از مهم‌ترین مراحل برای تولید پروتئین نوترکیب، بیان پروتئین در سلول میزبان می‌باشد. بیان پروتئین در باکتری *E. coli* با مشکلاتی از جمله عدم بیان پروتئین یا بیان به میزان کم، شکل‌گیری انکلوژن بادی و غیرفعال بودن پروتئین همراه است که راه‌حل‌های مختلفی برای غلبه بر این مشکلات وجود دارد که می‌توان به فاکتوهای موثر بر بیان (دما، دوره القاء، غلظت القاءکننده) اشاره نمود (Rosano and Ceccarelli, 2014).

در این مطالعه، ابتدا غلظت بهینه IPTG بدست آمد سپس بعد از القاء باکتری نوترکیب با IPTG یک میلی‌مولار، میزان بیان در دو دمای مختلف ۳۷ و ۲۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد. نتایج نشان داد با کاهش دما از ۳۷ به ۲۰ درجه سانتی‌گراد، پروتئین مورد نظر در سیتوپلاسم به فرم محلول بیان می‌شود و میزان بیان بالا می‌باشد. به دلیل مصرف انرژی بالا برای ترجمه پروتئین نوترکیب، سلول در دمای بالا بعد از القاء با کاهش انرژی مواجه شده است و از سویی، سمیت پروتئین برای سلول باعث می‌شود تا سلول زودتر وارد فاز سکون گردد و مرحله به مرحله تولید پروتئین نوترکیب را در دمای بالا کاهش دهد رشد سلول‌ها در دمای بالاتر، افزایش می‌یابد و افزایش رشد برای بیان پروتئین نوترکیب مضر می‌باشد و می‌تواند موجب از بین رفتن پلاسمید و نیز سبب بیان پروتئین‌های باکتری شود (Hayat et *al*., 2018).

به طور کلی، دماهای پایین‌تر بعد از القاء موجب کاهش تجزیه پروتئین‌های حساس به پروتئولیتیک می‌شود، زیرا پروتئازهای باکتری در شرایط دمایی پایین‌تر، فعالیت کمتری دارند و هضم پروتئین نوترکیب صورت نمی‌گیرد (Qing *et al*., 2004; Walsh, 2014). بنابراین، بازده بیان پروتئین در دمای پایین‌تر افزایش می‌یابد (Schlegel *et al*., 2012; Rosano and Caccarelli, 2014).

یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در تولید پروتئین نوترکیب در باکتری *E.coli* تجمع پروتئین به فرم انکلوژن بادی در سیتوپلاسم می‌باشد. سرعت تولید زیاد فرم نوترکیب پروتئین در باکتری بیانی *E. coli* BL21(DE3) منجر به تجمع پروتئین در سیتوپلاسم میزبان به فرم انکلوژن بادی می‌شود (محمدی و همکاران، ۱۳۹۳). این تجمعات علاوه بر تحمیل بار متابولیک وسیع به سلول میزبان، دارای اثرات سمی نیز می‌باشند و سلول زودتر وارد فاز سکون و درنهایت فاز مرگ می‌شود. با استفاده از روش‌هایی چون کنترل دمایی در زمان القاء و بعد از القاء، تغییر سوش میزبان، هوادهی مناسب می‌توان به کاهش تجمع پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم باکتریایی کمک کرد (Rodriguez *et al*., 2010; Alfasi *et al*., 2011).

یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای به حداقل رساندن شکل‌گیری انکلوژن بادی‌ها کاهش دماست. معمولاً بیان در دمای پایین منجر به افزایش حلالیت می‌شود. این امر ناشی از این مساله است که میان‌کنش‌های هیدروفوبیک تعیین کننده انکلوژن بادی‌ها، وابسته به دما می‌باشند. در این مطالعه با کاهش دما پروتئین به فرم محلول در سیتوپلاسم بیان شده است.کاهش دما بعد از القاء می‌تواند موجب کاهش میزان سنتز پروتئین و در نتیجه مانع از تشکیل انکلوژن بادی شود. برای افزایش تولید هورمون نوترکیب در میزبان از القاءکننده‌های مختلف (IPTG و لاکتات) استفاده می‌کنند. در این مطالعه از غلظت یک میلی‌مولار IPTG برای بیان استفاده شده است که حداکثر توانایی بکارگیری اپرون Lac و پروموتور T_7 می‌باشد. غلظت‌های پایین القاءکننده می‌تواند سبب القاء ناکافی بیان پروتئین و کارایی پایین‌تر تولید گردد. اگرچه غلظت‌های بالا موجب مرگ سلول‌ها و مانع بیان پروتئین در آنها با توجه به اثرات سمی بر سلول‌ها می‌شود مطالعات نشان داد که غلظت‌های بین صفر تا یک میلی‌مولار IPTG اثر سمی بر رشد باکتری *E. coli* ندارند و استفاده از غلظت‌های کمتر به بیان پروتئین به فرم محلول کمک می‌کند که در این مطالعه غلظت یک میلی‌مولار غلظت مطلوبی برای بیان پروتئین به فرم محلول بوده است (Hayat *et al*., 2018).

با توجه به نتیجه بدست آمده از مطالعه حاضر می‌توان استنباط کرد که هورمون GnRH قابلیت تولید را در سیستم بیانی پروکاریوتی همانند اشریشیاکلی به میزان زیاد و در سطح انبوه دارد. این هورمون نوترکیب پس از مطالعات تکمیلی در خصوص ایمن بودن و تحریک تخم‌ریزی می‌تواند در دسترس پرورش‌دهندگان برای تکثیر مصنوعی آبزیان قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در آزمایشگاه سلولی و مولکولی و آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. از همکاران در این آزمایشگاه‌ها جهت همکاری و فراهم نمودن تسهیلات کمال سپاس و قدردانی را داریم.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

منابع

سوداگر، م.، صدق‌پورثابت، س.، ذکریائی، ح. و دادگر، ش.، ۱۳۹۵. بررسی اثر هورمون‌های اواپریم (sGnRHa + دامپریدون)، اوافکت (آنتاگونیست دوپامین + GnRH) و عصاره هیپوفیز بر بازده تکثیر مصنوعی ماهی سفید (*Rutillus kutum*). پژوهش‌های ماهی شناسی کاربردی. دوره چهارم، شماره سوم، صفحات ۵۳ تا ۶۴.

کلباسی، م.ر.، لرستانی، ر. و غفله مرمضی، ج.، ۱۳۹۱. تاثیر هورمون‌های LHRHA2 و عصاره هیپوفیز کپور معمولی بر برخی از شاخص‌های لقاح و کیفیت اسپرماتوزوای ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*). مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۱، شماره دوم، صفحات ۹۹ تا ۱۰۴.

محمدی، ن.، کریمی، ج.، شباب، ن.، نادری، س.، یادگارآذری، ر. و سعیدی‌جم، م.، ۱۳۹۳. کلونینگ و بررسی بیان ژن کد کننده BMP-2 انسانی در باکتری *E. coli* به منظور تولید یک داروی نوترکیب. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی همدان. دوره ۲۱، شماره سوم، صفحات ۱۹۶ تا ۲۰۲.

Aizen, J., Meiria, I., Tzchoria, I., Levavi-Sivan, B. and Rosenfeld, H., 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142: 212-221. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.01.002

Alfasi, S.N., 2011. Physiological aspects underpinning recombinant protein production in *Escherichia coli*. Birmingham, University of Birmingham,

Barrero, M., Small, B.C., Dabramo, L.R., Waldbieser, G.C., Hanson, L.A. and Kelly, A.M., 2008. Effect of carp pituitary extract and luteinizing hormone releasing analog hormone on reproductive indices and spawning of 3-year-old channel catfish. *North American Journal of Aquaculture*, 70: 138-146. DOI: org/10.1577/A06-072.1

Constantinos, C., Mylonas, C. and Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 10: 463-491.

Falahatkar, B., Poursaeid, S., Langroudi, H.E., Efatpanah, I., Meknatkhah, B. and Rahmati, M., 2013. Spawining induction in Kutum, *Rutilus frisii kutum* (Kamensky), with different hormones: Analysis of hormone profiles and induced spawning success. *Archive of Polish Fisheries*, 21: 271-281. DOI: 10.2478/aopf-2013-0028.

German, L.R. and Eduaedo, A.C., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172

Gerngross, T.U., 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature biotechnology*, 22: 1409-1414. DOI: 10.1038/nbt1028

Gothilf, Y. and Zohar, Y., 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. *In*: (Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E. and Rolfe M.S) Reproductive Physiology of Fish. *Fish Symposium* 91, Sheffield. pp. 35-37.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

Hayat, S.M., Farahani, N., Golichenari, B. and Sahebkar, A., 2018. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What we need to know. *Current Pharmaceutical Design*, 24: 718-725. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940.

Jagdish, C., Rohit, S., Sahai, P. and Talwar, G.P., 2017. Development of a novel recombinant LHRH fusion protein for therapy of androgen and estrogen dependent cancer. *Protein purification and expression*, 17: S1046-5928. DOI: 10.1016/j.pep.2017.04.003.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Li Y., 2011. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 80: 260-267. DOI: 10.1016/j.pep.2011.08.001.

Okubo, K. and Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica*, 193: 3-15. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2008.01832.

Qing, G., Ma, L.C., Khorshid, A., Swapna, G., Mal, T.K., Takayama, M.M., Xia, B., Phadtare, S., Ke H., Acton, T., Montelione, T. and Ikura, M., 2004. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22: 877-882. DOI: 10.1038/nbt984.

Raina, K., Panda, A.K., Ali, M.M. and Talwara, G.P., 2004. Purification, refolding, and characterization of recombinant LHRH-T multimer. *Protein Expression and Purification*, 37: 8-17. DOI:10.1016/j.pep.2004.03.008.

Rodriguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A. and Garcia-Fruitos, E., 2010. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 9:71. DOI:10.1186/1475-2859-9-71.

Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Recombinant Protein Expression in Microbial Systems*, 5:172. DOI:10.3389/fmicb.2014.00172

Schlegel, S., Lofblom, J., Lee, C., Hjelm, A., Klepsch, M., Strous, M., Drew D., Slotboom, D.J. and Degier, J.W., 2012. Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21 (DE3). *Journal of Molecular Biology*, 423: 648-659. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.07.019

Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. and Dari, R., 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria Bertani broth. *Journal of Bacteriology*, 189: 8746-8749. DOI**:** 10.1128/JB.01368-07.

Shiloach, J. and Fass, R., 2005. Growing *E. coli* to high cell density a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, 23: 345-357. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.04.004

Walsh, G., 2014. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology*, 32(10): 992-1000.

Xu, J., Zhu, Z., Duan, P., Li, W., Zhang, Y., Wu, J., Hu, Z., Roque, S.R. and Liu, J., 2006. Cloning, expression, and purification of a highly immunogenic recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) chimeric peptide. *Protein Expression and Purification*, 50: 163-170. DOI: 10.1016/j.pep.2006.08.016.

Zemora, N., Gonzalea, M.D., Munoz, J.A., Madigou, T., Sanchez, E., Doste, S.Z. and Zohar, Y., 2002. The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Endocrinology*, 172: 105-116.

Zohar, Y. and Mylonas ,C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197: 99-136. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00584-1.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.3.18.3]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119131]

Transformation and gene expression study of recombinant fish GnRH in *E. coli* BL21 in order to produce recombinant hormone

Mohammadzadeh S.[1]; Yeganeh S.[1*]; Moradian F.[2]; Falahatkar B.[3]; Milla S.[4]

[*]s.yeganeh@sanru.ac.ir

1- Fisheries Department, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2- Department of Basic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3- Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Guilan, Iran.
4-University of Lorraine, Unit of Animal Research and Functionalities of Animal Products, USC INRA 340, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) is a neuropeptide known to regulate reproduction in vertebrates. Different analogues of synthetic GnRH are used to induce final sexual maturation in fish breeders. The purpose of this research was to evaluate the expression of recombinant GnRH (rGnRH) in *Escherichia coli* BL21 to produce recombinant hormone. In the present research, the sequence of DNA related to designed fish GnRH was cloned in pET28a^{+}. The cloning was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and specific primers. Recombinant vector pET28a^{+}/GnRH was transformed into the expression host, *E.coli* BL21 (DE3). The transformation was confirmed using colony PCR. The transformed bacteria were cultured in LB medium containing kanamycin antibiotic at 37°C at overnight then, induced with 1 mM IPTG. After induction, the bacteria were cultured in two different times and temperatures including 37°C for 6 h and 20° C for 24 h. The protein expression was determined by SDS-PAGE analysis. A band of expected size (186 base pair) of amplification from the gene transmitted to the bacteria was detected on the agarose gel. The 8-kD band of peptide expression was observed in the SDS-PAGE gel and the expression level in 20° C for 24 h was higher than 37° C for 6 h. The result showed that GnRH from fish had the possibility of producing in the prokaryotic expression system and after optimization, it can be introduced as a specific homologous for the treatment of reproductive disorders in fish.

Keywords: GnRH, *E.coli*, Aquatic animals, Hormonal induction

[*]Corresponding author