

## بررسی اثر القاء‌کنندگی لاکتوز و IPTG بر بیان ژن اینترفرون بتا ۱ بی در باکتری

### *Escherichia coli* BL21 (DE3)

کبری مرادیان<sup>۱\*</sup>، محمد رضا فاضلی<sup>۲</sup>، داریوش عابدی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲. گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** پروموتور *lac*<sup>۱</sup> یک ژن تنظیم کننده پروکاریوتی بیان پروتئین نو ترکیب در *Escherichia coli* می باشد. این پروموتور توسط لاکتوز و یا آنالوگ شیمیایی آن<sup>۲</sup> IPTG القا می شود. در این تحقیق تأثیر لاکتوز و IPTG بر میزان بیان ژن اینترفرون بتا، مقایسه شده است.

**مواد و روش‌ها:** باکتری *Escherichia coli* BL21 (DE3) کلون شده با ژن اینترفرون بتا کشت داده شد و با اضافه کردن غلظت مشخص IPTG و لاکتوز به طور جداگانه و یا با یکدیگر، بیان پروتئین القا گردید. میزان پروتئین اینترفرون تولید شده اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از ۰/۲٪ لاکتوز و IPTG ۰/۵ میلی مولار به طور هم زمان نسبت به هر کدام از القاء‌کننده‌ها به تنهایی افزایش داشت و برابر با ۳۴٪ کل پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری اشریشیاکلی نو ترکیب بود.

**نتیجه گیری:** در این تحقیق، با استفاده هم زمان لاکتوز و IPTG، در مقایسه با هر کدام از این القاء‌کننده‌ها به تنهایی، میزان بیش تر پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با هزینه کم تر تولید شد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری *Escherichia coli*، اینترفرون، پروموتور *lac* لاکتوز (lactose)، IPTG

### مقدمه :

ژن اینترفرون بتا در بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ انسان قرار گرفته است. در حال حاضر ترکیب فوق به روش مهندسی ژنتیک در *Escherichia coli* تولید شده و به طور وسیع مورد استفاده قرار می گیرد (۱۷). اینترفرون بتای نو ترکیب که توسط *Escherichia coli* تولید می شود Interferon  $\beta$ -1b نام داشته (۴) و به عنوان دارو در پیش گیری و کنترل عودهای مجدد بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) (۵،۷)، درمان بیماری‌های خودایمنی (۱۳)، مهار تکثیر سلولی و مهار رگ‌زایی

اینترفرون‌ها سایتوکاین‌های ضد ویروسی می باشند که توسط سلول‌های مهره داران ساخته و ترشح می شوند. اینترفرون بتا علاوه بر خواص ضد ویروسی و ضد تکثیری که در سایر اینترفرون‌ها مشاهده می شود قادر است پاسخ‌های سیستم ایمنی را تنظیم نماید. خصوصیت‌های ذکر شده فوق سبب شده است که علاوه بر کاربرد آن در درمان بیماری‌های ویروسی (انواع هپاتیت) و سرطان، در درمان بیماری‌هایی با علل ایمونولوژیک مانند MS<sup>۱</sup> نیز استفاده گردد (۱).

نویسنده مسئول

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی

تهران، ایران

پست الکترونیکی: s.moradian7@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴/۲/۱۳۹۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۳

<sup>1</sup> Lactose

<sup>2</sup> Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

در سلول کاهش می یابد، بنابراین لازم است که پس از افزودن لاکتوز در زمان شروع القاء، به طور مداوم، در فواصل زمانی مناسب لاکتوز به محیط کشت اضافه گردد. در تحقیق حاضر، تأثیر لاکتوز و IPTG به تنهایی و به طور هم زمان، بر میزان بیان ژن اینترفرون بتا ۱ بی، بررسی گردید. بیشترین میزان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در شرایطی حاصل شد که بخشی از IPTG با لاکتوز ۱۲٪ جایگزین گردید. جایگزینی بخشی از IPTG با لاکتوز سبب کاهش چشمگیر هزینه تولید این داروی نوترکیب می گردد.

## مواد و روش ها:

### میکروارگانیسم:

باکتری نوترکیب سوش *Escherichia coli* BL21 (DE3) کلون شده با ژن اینترفرون بتا از شرکت زیست دارو دانش تهیه شد.

### بررسی کینتیک رشد باکتری اشیریشیاکلی در محیط کشت غنی LB مایع:

۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت<sup>۱</sup> LB به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر کانامایسین ۱۰ mg/ml، با ۱ میلی لیتر از بانک سلولی باکتری اشیریشیاکلی نوترکیب تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ rpm<sup>۲</sup> به مدت ۸ ساعت قرار داده شد. در فواصل زمانی ۱ ساعته هر بار ۱ میلی لیتر از کشت برداشته و جذب نوری آن در OD600nm خوانده شد.

### تهیه مایع تلقیح (کشت شبانه):

۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر کانامایسین ۱۰ mg/ml، با ۱ میلی لیتر از بانک سلولی باکتری اشیریشیاکلی نوترکیب تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ rpm به مدت ۸ ساعت قرار داده شد تا به جذب نوری حدود ۳ (OD600~3) برسد.

### کشت باکتری و بیان شدن پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی:

در انواع سرطان (۱،۱۹) و درمان عفونت های ویروسی استفاده می شود (۲،۸). جهت تولید پروتئین های نوترکیب در اشیریشیاکلی، پلاسمید *pET* نوترکیب که دارای پروموتور *lac* می باشد به سویه هایی از *Escherichia coli* حاوی یک کپی کروموزومی از ژن RNA پلی مرز T7 منتقل می شود، این آنزیم بسیار فعال بوده و RNA را هشت بار سریع تر از RNA پلی-مرز *Escherichia coli* تولید می سازد (۲۰). پروموتور *lac* یک ژن تنظیم کننده پروکاریوتی بیان پروتئین نوترکیب در *Escherichia coli* می باشد. رونویسی از پروموتور *lac* توسط یک پروتئین مهار کننده یعنی *lac I* (که محصول ژن *lac I* می باشد) تنظیم می شود و در حضور ترکیب های القاکننده (لاکتوز و یا آنالوگ شیمیایی آن IPTG) اثر مهار *lac I* بر فرایند رونویسی از بین می رود و در عدم حضور ماده القاکننده، مهار کننده *lac I* با اتصال به ناحیه اوپراتور از اتصال آنزیم RNA پلی-مرز به ناحیه پروموتور ممانعت کرده و شروع رونویسی را مهار می کند (۱۸).

به طور کلی، حضور القاء کننده در محیط و غلظت آن تأثیر غیر قابل انکاری بر میزان تولید پروتئین دارد. IPTG القاء کننده ای است که به طور معمول برای بیان ژن های نوترکیب استفاده می گردد، به هر حال، مشکل اصلی این ترکیب گران بودن و سمیت آن برای انسان است. هم چنین به دلیل این که IPTG برای باکتری میزبان سمی است، غلظت بالای آن به طور معمول منجر به افزایش بیان ژن و کاهش میزان سلول های باکتری می شود (۳،۲۴) و کاهش میزان سلول های باکتری نیز به نوبه خود سبب کاهش بیان ژن خواهد شد. به منظور ایجاد تعادل بین این دو تأثیر متضاد، میزان بهینه غلظت IPTG برای هر پروتئین باید به طور اختصاصی تعیین گردد. مطالعه های گذشته نشان می دهند که میزان غلظت IPTG مورد استفاده برای القا بیان ژن از ۰/۰۵ تا ۵ میلی مولار می باشد (۲۳).

لاکتوز، القاء کننده طبیعی اوپران *lac*، را می توان به جای IPTG استفاده نمود. مشخص گردیده است که لاکتوز به اندازه IPTG برای القاء بیان ژن نوترکیب در *Escherichia coli* مؤثر می باشد (۶). لازم به ذکر است که چون باکتری *Escherichia coli* لاکتوز را به عنوان منبع کربن استفاده می نماید، با گذشت زمان مقدار لاکتوز

<sup>1</sup> Luria-Bertani medium

<sup>2</sup> Revolutions per minute

تعیین وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب اینترفرون بتا با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید استفاده شود.

### تفکیک و تعیین وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب اینترفرون بتا با استفاده از SDS-PAGE<sup>۲</sup>

تانک الکتروفورز عمودی ساخت شرکت با یورد (Bio-Rad) برای شناسایی پروتئین اینترفرون بتا استفاده شد. ژل الکتروفورز به صورت دو قسمتی، در بالا ژل متراکم کننده ۴٪ و در پایین ژل جداکننده ۱۴٪ درصد تهیه شد. ۰/۲ گرم از انکلوژن بادی وزن شد و ۵۰۰ میکرولیتر آب ۲ بار تقطیر به آن افزوده گردید. ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون با ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه حاوی ۵٪ بتامرکاپتواتانول، مخلوط شد و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و ۱۰ میکرولیتر از آن توسط سرنگ همیلتون درون چاهک ژل آکریل آمید تزریق گردید.

**بررسی مقدار بیان پروتئین نو ترکیب اینترفرون بتا :**  
با استفاده از دستگاه دانسیومتر نوری (Bio-Rad) و نرم افزار Quantity One و بر اساس شدت باند ایجاد شده روی ژل در بخش ۱۸/۴ کیلودالتون انجام گرفت.

**وسترن بلا تینگ پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی**  
پروتئین های الکتروفورز شده با روش semi-dry و با استفاده از کیت (Invitrogen, western detection (CA, USA) به غشاء نیتروسولوز منتقل گردید. غشاء به مدت یک ساعت با آلومین سرم گاوی ۲٪ در فسفات بافر سالین/ Tween 20 (PBST) انکوبه شد. سپس یک ساعت با آنتی بادی اولیه (Anti-β-IFN Mouse mAb, Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) در 1 % BSA/PBST و سپس به مدت یک ساعت با آنتی بادی ثانویه (Goat Anti-Mouse Total Ig Peroxidase conjugate, Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) در 1 % BSA/PBST انکوبه شد. پس از هر بار انکوباسیون غشاء سه بار با PBST شسته شد. سپس بلات با استفاده

۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB به اضافه ۱۰۰ میکرولیتر کانامایسین ۱۰ mg/ml، با ۱ میلی لیتر از کشت شبانه تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد و دور ۲۵۰ rpm قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان حدود ۳ ساعت و رسیدن به OD600nm برابر ۰/۶ با اضافه کردن القاء کننده ( IPTG و لاکتوز ۰/۲٪ به تنهایی یا با یکدیگر) به محیط کشت، باکتری وارد فاز بیان پروتئین شد. پس از ۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۲۵۰ rpm، جمع آوری سلول های باکتری از محیط کشت با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور rpm ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و توده سلولی با بافر<sup>۱</sup> PBS شستشو داده شد، پس از سانتریفیوژ و دور ریختن مایع رویی توده سلولی به دست آمد. توده سلولی در ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری می باشد تا بعد برای استخراج پروتئین مورد نظر استفاده شود.

### تخریب دیواره سلولی باکتری :

با افزودن بافر PBS به توده سلولی، سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. فالكون حاوی سوسپانسیون سلولی در ظرف یخ قرار داده شد و با کمک دستگاه سونیکیتور به مدت ۲۰ دقیقه (۳۰ ثانیه روشن و ۳۰ ثانیه خاموش) دیواره سلولی باکتری تخریب گردید. قرار دادن روی یخ به منظور جلوگیری از بالا رفتن دما و ممانعت از دناتور شدن پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی صورت می گیرد.

### شست و شوی اجسام سلولی و دستیابی به انکلوژن بادی (پروتئین نو ترکیب اینترفرون بتا):

سوسپانسیون حاوی سلول های باکتری که دیواره آن ها توسط دستگاه سونیکاتور شکسته شده بود با دور rpm ۱۰۳۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب (انکلوژن بادی) که همان پروتئین نو ترکیب اینترفرون بتا می باشد در ۲۰- درجه سانتی گراد قابل نگهداری است تا بعد برای بررسی و

<sup>2</sup> Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

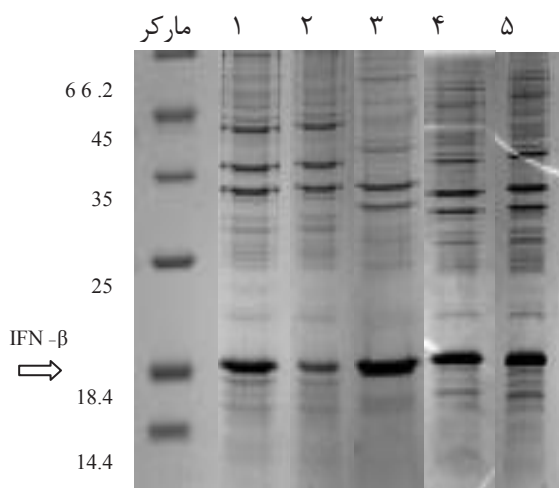
<sup>1</sup> Phosphate-buffered saline

در این مطالعه به منظور افزایش میزان بیان پروتئین و کاهش هزینه IPTG، از لاکتوز ۲٪ به عنوان القاء کننده به همراه مقادیر مختلف IPTG استفاده گردید. و بیشترین میزان اینترفرون بتا در سلول های باکتری اشیشیالکی زمانی مشاهده شد که ۱٪ اینترفرون بتا با ۰/۵ میلی مولار IPTG و ۲٪ لاکتوز به طور همزمان القاء گردید و پس از آنالیز با SDS-PAGE (شکل ۱) میزان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با دستگاه دانسیومتر تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسه میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از لاکتوز و IPTG به عنوان القاء کننده

میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی (%)	میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی (%)
۱۹	۱ IPTG ۰/۵ میلی مولار
۱۴	۲ لاکتوز ۲٪
۳۴	۳ IPTG ۰/۵ میلی مولار و لاکتوز ۲٪
۳۰	۴ IPTG ۱ میلی مولار
۳۲	۵ IPTG ۱ میلی مولار و لاکتوز ۲٪

پس از افزودن ۲٪ لاکتوز در ابتدا، هر یک ساعت یک بار نیز ۲٪ لاکتوز به کشت افزوده گردید.



شکل ۱- آنالیز سلول شکسته شده اشیشیالکی با روش ژل پلی آکریل آمید: ستون اول: مارکر بر اساس وزن مولکولی پروتئین (۶۶,۲, ۴۵, ۳۵, ۲۵, ۱۸,۴, ۱۴,۴ کیلو دالتون)، شماره بالای ستون ها نشانه شماره آزمایش است. (۱ IPTG ۰/۵ میلی مولار) لاکتوز ۲٪ (۳ IPTG ۰/۵ میلی مولار و لاکتوز ۲٪) (۴ IPTG ۱ میلی مولار) (۵ IPTG ۱ میلی مولار و لاکتوز ۲٪).

diaminobenzidine (DAB) tetrahydrochloride

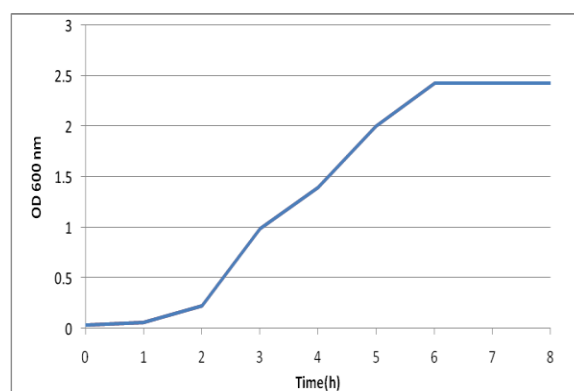
پروکسید هیدروژن تهیه شد.

## یافته ها:

بررسی کینتیک رشد باکتری اشیشیالکی در محیط

کشت غنی LB مایع

بررسی کینتیک رشد باکتری اشیشیالکی در محیط کشت غنی LB مایع به منظور تعیین زمان القاء (OD600nm) در زمان القاء و طول مدت زمان انکوباسیون انجام شد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که حدود ۱ ساعت طول می کشد تا باکتری اشیشیالکی با محیط کشت LB مایع آداپته شود (Lag phase). پس از گذشت حدود ۲ ساعت به OD600nm برابر با ۰/۳ می رسد و وارد فاز رشد لوگاریتمی (Log phase) می شود. و پس از گذشت ۶ ساعت و رسیدن به OD600nm برابر با ۲/۴ وارد فاز سکون (Stationary phase) می شود (نمودار ۱). بنابراین القاء بیان ژن در OD600nm برابر ۰/۶ (اوایل فاز رشد لوگاریتمی) انجام شد و طول مدت انکوباسیون ۶ ساعت در نظر گرفته شد (نمودار ۱).



نمودار ۱: منحنی رشد باکتری نو ترکیب سویه *Escherichia coli* BL21 (DE3) در محیط کشت LB

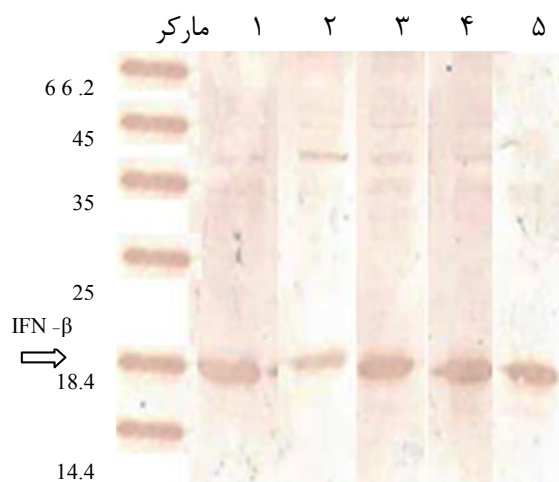
افزایش میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از لاکتوز و IPTG به طور همزمان به عنوان القاء کننده

پروتئین‌هایی که از منابع طبیعی تهیه می‌شوند، ارزان‌تر و سالم‌تر هستند، در مقیاس بیش‌تر تولید می‌شوند و اثرهای جانبی کم‌تری دارند (۱۴).

باکتری اش‌ریشیاکلی به دلیل تکثیر سریع و نیازهای تغذیه‌ای ساده و ارزان به‌طور گسترده به عنوان میزبان برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱) اما چون قادر نیست تغییرهای پس از ترجمه مانند گلیکوزیلاسیون را انجام دهد استفاده از آن برای تولید پروتئین‌های یوکاریوتی دارای محدودیت می‌باشد. اینترفرون بتا که توسط *Escherichia coli* تولید شده **Interferon  $\beta$ -1b** نام داشته و در حال حاضر کاربرد درمانی دارد (۳). **Interferon  $\beta$ -1b** یک متیونین کم‌تر از فرم طبیعی آن داشته و سیستمین شماره ۱۷ آن با سرین جایگزین شده است و پایداری بیش‌تری دارد. از آنجا که *Escherichia coli* فاقد آنزیم‌های لازم برای گلیکوزیلاسیون می‌باشد پروتئین فوق فاقد زنجیره کربوهیدرات موجود در پروتئین طبیعی می‌باشد (۱۵). مطالعه‌ها نشان داده که زنجیره قندی اینترفرون بتای گلیکوزیله برای تاخوردگی صحیح و یا خواص بیولوژیکی آن ضروری نمی‌باشد (۲۲). این ویژگی سبب می‌شود که بتوان از باکتری اش‌ریشیاکلی به عنوان میزبان ترجیحی جهت تولید اینترفرون بتا استفاده نمود. لازم به ذکر است که تولید **Interferon- $\beta$**  در این میزبان به صورت انکلوژن بادی می‌باشد (۲۵) و این موضوع سبب می‌شود که مراحل استخراج و خالص سازی این پروتئین تسهیل گردد. طبق گزارش‌های حاصل از مطالعه‌های گذشته، سیستم‌های بیانی مختلفی برای بیان اینترفرون بتای نو ترکیب در *Escherichia coli* استفاده شده و میزان تولید اینترفرون بتای نو ترکیب همواره کم بوده است (۱۶،۱۲،۱۰).

تاکنون تلاش‌های زیادی برای بهینه سازی و افزایش مقیاس تولید پروتئین‌های نو ترکیب صورت گرفته است (۱۴). بهینه سازی مراحل مختلف فرایند تولید داروهای پروتئینی نو ترکیب سبب می‌شود که این داروها

چنان که در نتایج وسترن بلاتینگ مشاهده می‌شود، پروتئین تولید شده با آنتی بادی **rabbit-anti-hINF- $\beta$**  واکنش داد. وزن مولکولی اینترفرون بتا ۱ بی ۱۸،۴ kDa می‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲- وسترن بلاتینگ پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی : ستون اول : مارکر بر اساس وزن مولکولی پروتئین ( ۶۶،۲ ، ۴۵ ، ۳۵ ، ۲۵ ، ۱۸،۴ ، ۱۴،۴ کیلو دالتون )، شماره بالای ستون‌ها نشانه شماره آزمایش است. (۱) IPTG ۰/۵ میلی‌مولار (۲) لاکتوز ۰/۲٪ (۳) IPTG ۰/۵ میلی‌مولار و لاکتوز ۰/۲٪ (۴) IPTG ۱ میلی‌مولار (۵) IPTG ۱ میلی‌مولار و لاکتوز ۰/۲٪ .

## بحث:

نظر به اهمیت اینترفرون بتا در درمان بیماری‌های مختلف از جمله بیماری MS تولید بهینه پروتئین فوق ضروری به نظر می‌رسد. در ابتدا اینترفرون بتا از خون اسب گرفته می‌شد. اما میزان اینترفرون بتای به دست آمده بسیار ناچیز بود به طوری که ۹۰/۰۰۰ واحد خون برای به دست آوردن ۱ گرم اینترفرون مورد نیاز بود، هم‌چنین به دلیل مشکل بودن روش‌های خالص سازی و آلودگی‌های بالقوه خطرناک که اغلب به طور کامل حذف نمی‌شوند و از طرفی آلرژن بودن پروتئین‌های حیوانی برای انسان و امکان بروز اثرهای جانبی، موارد استفاده از این پروتئین دارویی بسیار محدود بود. با گسترش فن‌آوری DNA نو ترکیب، ژن اینترفرون بتا در میزبان‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی کلون شد. پروتئین‌های نو ترکیب در مقایسه با

شوند سبب می شود که غلظت درون سلولی آنها افزایش یابد و در نتیجه بیان ژن مورد نظر نیز افزایش یابد. به طور خلاصه با استفاده از این روش میزان بیش تر پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با هزینه کم تر تولید شد. این روش می تواند برای تولید پروتئین های نو ترکیب دیگر نیز مورد بررسی و استفاده قرار گیرد.

### سپاسگزاری:

بدین وسیله از تمامی همکاران محترم مرکز رشد دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت فراهم نمودن امکانات و تجهیزات لازم برای این پژوهش کمال تشکر را داریم.

با قیمت ارزان تر در اختیار بیماران قرار گیرد. به این منظور کارهای زیادی مانند بهینه سازی وکتور بیانی، بهینه سازی شرایط تولید، افزایش قدرت تولید کنندگی سلول و بهینه سازی محیط کشت برای بهبود بیان پروتئین IFN- $\beta$  صورت گرفته است (۹).

در این تحقیق، از باکتری *Escherichia coli* حاوی پلاسمید *pET* نو ترکیب، که دارای پروموتور *lac* می باشد، برای تولید پروتئین اینترفرون بتا استفاده شد و تأثیر لاکتوز و IPTG بر میزان بیان ژن اینترفرون بتا، بررسی گردید.

هم لاکتوز و هم IPTG می توانند بیان پروتئین های نو ترکیب را، توسط پروموتور *lac* در باکتری اشیریشیاکلی القاء کنند. با این وجود، راه های ورود آنها به درون سلول و روش تأثیرشان متفاوت است. اول این که، لاکتوز با کمک *lac permease* وارد سلول می شود، در صورتی که IPTG به روش انتشار وارد سلول می شود. دوم این که، لاکتوز قبل از اتصال به پروتئین مهار کننده *lac* باید توسط بتاگالاکتوزیداز، به الولاکتوز تبدیل شود. در حالی که IPTG بدون هیچ تغییری، به طور مستقیم به پروتئین مهار کننده *lac* متصل می شود (۵).

در این مطالعه، با هدف افزایش دادن میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا و کاهش هزینه IPTG، بخشی از IPTG با لاکتوز جایگزین گردید. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان بیان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی با استفاده از ۰/۲٪ لاکتوز و ۰/۵ IPTG میلی مولار به طور هم زمان، نسبت به هر کدام از القاء کننده ها به تنهایی، افزایش داشت و برابر با ۳۴٪ کل پروتئین های تولید شده توسط باکتری اشیریشیاکلی نو ترکیب بود (جدول ۱).

### نتیجه گیری:

در این مطالعه بیش ترین میزان پروتئین اینترفرون بتا ۱ بی در شرایطی حاصل گردید که بخشی از IPTG با لاکتوز جایگزین گردید. به نظر می رسد که حضور هم زمان هر دو القاء کننده، که با روش های متفاوتی وارد سلول می -

## منابع

1. Antonetli FA, Comparison of biological activity of two recombinant IFN beta preparations used in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. *J Interferon cytokine*, 2002; 22(12): 1181-4.
2. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, et al. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 2 and high virus load. *Intern Med*, 2010; 49(11): 965-70.
3. Bentley WE, Davis RH, Kompala DS, Dynamics of CAT expression in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1991; 38: 749-60.
4. Brickel maier M. Elisa methods for the analysis of antibody responses induced in multiple Sclerosis patient treated with recombinant Interferon- $\beta$ . *J Immunol methods*, 1999; (1-2): 121-35.
5. Donovan RS, Robinson CW, Glick BR, Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the *lac* promoter. *J Ind Microbiol* 1996; 16: 145-54.
6. Foor F, Morin N, Bostian KA. Production of Ldihydroxy phenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gene cloned from *Erwinia herbicola*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3070-5.
7. Goldberg LD, Edwards NC, Fincher C, Doan QV, Al-Sabbagh A, Meletiche DM. Comparing the cost-effectiveness of disease-modifying drugs for the first-line treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Manag Care Pharm*, 2009; 15(7): 543-55.
8. Haasbach E, Droebner K, Vogel AB, Planz O. Low-dose interferon Type I treatment is effective against H5N1 and swine-origin H1N1 influenza A viruses in vitro and in vivo. *J Interferon Cytokine Res*, 2011; 31(6): 515-25.
9. Han YK, Koo TY, Lee GM. Enhanced interferon beta production by CHO cells through elevated osmolality and reduced culture temperature. *Biotechnol Prog*, 2009; 25(5): 1440-7.
10. Itoh S, Mizukimi T, Matsumoto T, Tatsunari N, Satto A, Efficient expression in *Escherichia coli* of a mature and modified human Interferon- $\beta$ . *DNA*, 1984; 3(2): 157-165.
11. Lin W, High level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of *E. coli*. *J Chem Biotechnol*, 2001; 76: 1030-1037.
12. Mashko S V, Veikjo V P, Lapidus A L, Lebedeva MI, TGATG vector: A new expression system for cloned foreign genes in *E. coli* cells. *Gene*, 1990; 88: 121-126.
13. Meyer O. Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine*, 2009; 76(5): 464-73.
14. Muller N, Derouazi M, Van TF, Wulhfard S, Hacker DL, Jordan M, et al. Scalable transient gene expression in Chinese hamster ovary cells in instrumented and non-instrumented cultivation systems. *Biotechnol Lett*, 2007; 29(5): 703-11.
15. Pallarol J, Two dimensional polyacrylamid gel electrophoresis of proteins. *Method in molecular Biology*, 1984; 1: 88-88.
16. Porter A G, Bell L D, Adair J, Novel modified  $\beta$ - Interferons: gene cloning, expression, and biological activity in bacterial extracts. *DNA*, 1986; 5(2): 137-148.
17. Runkel L, Meier W, Pepinsky R, Karpusas M. Structural and functional difference between Glycosylated and nonglycosylated form of human interferon beta. *Pharmaceutical Research*, 1998; 15(4).
18. Sambrook J, Fritsch EJ, *Molecular cloning a laboratory manual*, 2002.

19. Sims TL, McGee M, Williams RF, Myers AL, Tracey L, Hamner JB, et al. IFN-beta restricts tumor growth and sensitizes alveolar rhabdomyosarcoma to ionizing radiation. *Mol Cancer Ther*, 2010; 9(3): 761-71.
20. Tabor S. A bacteriophage T7 RNA Polymerase promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *J PNAS USA*, 1985; 82:1074-1078.
21. Taylor KL, Leaman DW, Grane R, Mechti N, Borden EC, Lindner DJ. Identification of interferon-beta-stimulated genes that inhibit angiogenesis in vitro. *J Interferon Cytokine Res*, 2008; 28(12): 733-40.
22. Utsumi j, Ogama EM, Nagahata T, Kasamak. Carbohydrate dependent biological activities of glycosylated human Interferon  $\beta$  on human Hepatoblastoma cell invitro. *Microbial Immunol*, 1995; 39(1): 81-86.
23. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Zivadinov R. Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*, 2008; 8(9): 1435-47.
24. Wood TK, Peretti SW, Effect of chemically induced, cloned gene expression on protein synthesis in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1991; 38:397-412.
25. Zean R, Knauf M, Croze E. The use of zwittergent 3-14 in the purification of recombinant human IFN  $\beta$  -. *J of Interferon and cytokine*, 1995; 15:31-37.