مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره نوزدهم - تابستان ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

ارزیابی بیان فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت نوترکیب انسانی با کدون بهینه شده در دو سویهٔ بیانی اشریشیاکلی Origami و BL21

سید حمید رضا خاتمی[۱]، رامین فلاح زاده[۱*]، جلیل فلاح مهرآبادی[۲]، محمد داود غفاری[۳]

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲. استادیار مرکز ژن و سلول، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت (G-CSF) به عنوان فاکتور رشد هماتوپوئیتیک می تواند سلول های بالغ خونی را تحریک نمایند و امروزه نوع نوترکیب آن در درمان نوتروپنی ناشی از شیمی درمانی سرطان های سرکوبگر میلوئید، پیوند مغز استخوان، شیمی درمانی در لوسمی میلوئید حاد و نوتروپنی مزمن و شدید به کار می رود. هدف از این مطالعه، مقایسهٔ بیان G-CSF نوترکیب انسانی در دو سویه از اشریشیاکلی بوده است.

مواد و روش ها: ژن G-CSFانسانی با تغییر کدون های آن به صورت بهینه شده برای بیان در سیستم پروکاریوتی، در وکتور pGEM سنتز شده و در وکتور بیانی pET23a همسانه سازی شد. سپس وکتور pET/G-CSF در دو سویهٔ بیانی از اشریشیاکلی به نام Origami و BL21، ترانسفرم شد و بیان آن در این دو میزبان مقایسه گردید.

یافته ها: نتایج هضم آنزیمی، صحت مراحل کلونینگ را در وکتور pET23a نشان داد. همچنین تحت شرایط یکسان و بعد از القای میزبان ها با IPTG، بیشترین بیان پروتئین rhG-CSF در سویه *E. coli* Origami مشاهده گردید..

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سویه *E. coli* Origami سویه مناسبی جهت بیان G-CSF انسانی می باشد و این سویه می تواند به عنوان یک میزبان مناسب جهت بیان این پروتئین در مقیاس بالاتر پیشنهاد گردد.

کلمات کلیدی: فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت انسانی، پروتئین نوترکیب، بهینه سازی کدون، سویه های بیانی اشریشیا کلی

مقدمه

فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت (G-CSF) گلیکوپروتئینی است که مولد کلنی سلول های خون ساز در کشت سلول های مغز استخوان می باشد. G-CSF بدلیل نقش تنظیمی در رشد، تمایز، بقا و فعال سازی نوتروفیل ها و پیش ساز های آنها یک فاکتور مهم در سیستم دفاعی- ایمنی مبتنی بر نوتروفیل ها محسوب می شود (۳). آنالیز DNA ژنومیک انسان مشخص کرد که ژن G-CSF انسانی به اندازه ۲/۵ کیلو باز روی کروموزوم ۱۷ قرار گرفته و متشکل از ۵ اگزون و ۴ اینترون می باشد (۷، ۹، ۱۳). فاکتور محرک کلنی گرانولوسیت به عنوان پلوریپوئیتین [۱]و β-CSF نیز شناخته می شود. دو گونه از پروتئین G-CSF با کمی تفاوت شناخته شده اند که یکی حاوی ۱۷۴ آمینواسید و دیگری دارای ۱۷۷ آمینواسید می باشد که قطعه پلی پپتید کوچکتر دارای وزن مولکولی۸ /۱۸ کیلودالتون بوده و نقش عمده تری را در فعالیت های بیولوژیکی ایفا می کند. این گلیکوپروتئین توسط دو پیوند دی‌سولفید پایدار می شود و این پیوندها نقش مؤثری را در ساختار سه بعدی فشرده ترکیب دارند. hG-CSF نوترکیب بیان شده در میزبان *E .coli* دارای یک زنجیره پلی پپتیدی مونومر غیرگلیکوزیله ۱۷۵ آمینواسیدی است که دارای وزن مولکولی ۱۸۷۹۹ دالتون بوده و واجد دو پیوند دی سولفیدی داخل مولکولی ($cys^{۴۳}$ - $cys^{۳۷}$ و $cys^{۷۵}$ - $cys^{۶۵}$) و متیونین در انتهای

۱ Pluripoietin

*نویسنده مسئول: پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
پست الکترونیک: Raminfallah2009@yahoo.com

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۲/۳۰
تاریخ پذیرش : ۱۳۹٤/۰۲/۰۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.11.3]

آمین است. دو پیوند دی سولفید داخلی مسئول کنفورماسیون اکتیو hG-CSF از لحاظ بیولوژیکی می باشند. یک سیستئین در موقعیت اسیدآمینه ۱۸ بصورت آزاد در پروتئین موجود می باشد (۱۶).

بطور کلی بیان اختصاصی پروتئین های نوترکیب در سویه هایی از *E. coli* انجام می شود که رایج ترین آن سویه های Origami و BL۲۱ می باشد. بیان پروتئین نوترکیب hG-CSF در *E. coli* به صورت سیتوپلاسمی و اجسام توده ای است. ایجاد اجسام توده ای پروتئین hG-CSF یکی از مشکلات عمده در مسیر تولید این پروتئین به صورت سیتوپلاسمی است، چرا که تاخوردگی مجدد[۲] پروتئین های مجتمع شده[۳] کار مشکل و دشواری می باشد. عدم اطمینان از اینکه پروتئین های دناتوره، فعالیت زیستی خود را بدست می آورند و کم شدن بازده پروتئین تاخورده و تخلیص شده، از جمله مشکلات بیان سیتوپلاسمی این پروتئین می باشد. بطور کلی پروتئین های سیتوپلاسمی باکتری ها دارای زیر واحد های سیستئین و پل های دی سولفیدی کمی می باشند. اغلب پروتئین هایی که دارای پل های دی سولفیدی پایدار هستند به خارج از سیتوپلاسم ترشح می شوند. بنابراین آن دسته از پروتئین های پستانداران که دارای ساختار چهارم پیچیده و پل های دی سولفیدی می باشند، ممکن است در سیتوپلاسم باکتری به طرز صحیحی تولید نشوند. Bardwell و همکارانش پیشنهاد کردند که تعداد کم پل های دی سولفیدی در پروتئین های سیتوپلاسمی ممکن است به دلیل عدم وجود سیستمی در سیتوپلاسم برای ایجاد این پل ها باشد مانند پروتئین های DsbA و DsbB. امروزه سویه های جهش یافته ی *E. coli* که قادر به ایجاد پل های دی سولفیدی در سیتوپلاسم هستند، جدا شده اند (۱۵). یکی از این میزبان ها سویه مهندسی شده اوریگامی، مشتق از سویه K-۱۲، است که در دو ژن تیرودوکسین ردوکتاز (trxB) و گلوتاتیون ردوکتاز (gor) دارای جهش می باشد که به شدت تشکیل باند دی سولفیدی در سیتوپلاسم را تقویت می نماید (۱). سویه BL۲۱ نیز یک سویه بیانی با کاربرد زیاد است که از مهمترین مزیت آن غیرفعال بودن ژن پروتئاز lon و ompt می باشد. این سویه که دارای ژن های پروتئاز جهش یافته می باشد و می تواند پروتئین نوترکیب را به میزان زیاد در داخل سلول تولید کند و تجزیه آن در هنگام خالص سازی را به کمترین مقدار رساند. تاکنون مطالعات انجام گرفته بر روی بیان نوترکیب ژن hG-CSF در بسیاری از سویه های *E. coli* بررسی شده است که در این مطالعه نیز هدف ما مطالعه مقایسه بیان پروتئین نوترکیب hG-CSF در دو سویه بیانی *E. coli* (Origami و BL۲۱) بود (۵).

روش کار

ژن بهینه شده hG-CSF درون وکتور pGEM توسط شرکت Bioneer کره سنتز شد که در توالی پپتیدی این ژن تغییری لحاظ نشده بود و تنها بر اساس Codon usage، *E. coli* حاصل شده بود. توالی ژن hG-CSF دارای ۵۳۷ جفت باز است که در طراحی این ژن در توالی پیشرو[۴] جایگاه I *Nde* و در توالی انتها[۵] I *BamH* قرار داده شده بود (شکل ۱). وکتور pET۲۳a از پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، DH۵a و Origami و BL۲۱ از شرکت سیناژن ایران خریداری شد.

آنزیم های برشی اندونوکلئاز، آنزیم T۴ DNA ligase، کیت استخراج وکتور و مواد شیمیایی از شرکت Roche آلمان خریداری شد. نشانگر مولکولی ۱ Kbp و نشانگر پروتئینی Prestained marker (با غلظت ۶۲۵ میکروگرم در ۵۰۰ میکرولیتر) از شرکت فرمنتاز لیتوانی خریداری و به میزان ۱۰ میکرولیتر برای SDS-PAGE استفاده شد.

به منظور تکثیر ژن hG-CSF، وکتور pGEM حاوی این ژن با آنزیم های اندونوکلئاز برشی I *BamH* و I *Nde* برش داده شد. تمام مراحل خالص سازی قطعه ژن و وکتور به روش الکتروفورز و استخراج از ژل آگارز انجام گردید. در نهایت قطعه مورد نظر با فرآیند لیگاسیون[۶] در وکتور pET۲۳a (تحت کنترل پروموتور فاژ T۷) که با آنزیم های اندونوکلئاز برشی مشابه خطی شده بود، همسانه سازی شد. وکتور pET۲۳a دارای توالی کد کننده هیستدین (۶XHis-Tag) می باشد که به صورت فیوژن در انتهای C-ترمینال ژن خارجی بیان می گردد (شکل ۲). کلیه دستکاری های ژنتیکی همانند هضم آنزیمی، لیگاسیون و الکتروفورز ژل آگارز از روش Sambrook و Russel (۲۰۰۱) انجام گرفت (۱۹).

پس از ترانسفورم محصول لیگاسیون در سلول مستعد[۷] DH۵α و کشت آن درون محیط کشت LB Agar حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰mM) و به دنبال آن کلنی های رشد یافته به عنوان کلون های واجد وکتور و احتمالا واجد قطعه ژن انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در وکتور، این کلنی ها به صورت تصادفی انتخاب و درون محیط کشت Broth LB حاوی آمپی سیلین (۱۰۰mM) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل شیکر انکوباتور کشت داده شد تا به چگالی نوری ۰/۷ در طول

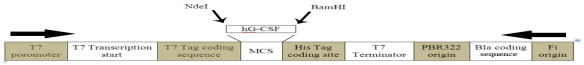
۲ Refolding
۳ Aggregate
۴ Forward
۵ Reverse
۶ Ligation
۷ Competent

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.11.3]

موج ۶۰۰ نانومتر برسد. پس از انجام استخراج وکتور، صحت استخراج وکتور توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شدند (شکل ۳). تایید قرارگیری صحیح قطعه ژنی در قسمت جایگاه همسانه سازی چندگانه (MCS)، به وسیله آزمایش هضم با دو آنزیم برشی I *BamH* و I *Nde* (بایستی توالی نوکلئوتیدی حدود ۵۳۷ جفت باز مشاهده گردد) انجام شد (شکل ۴).

TTGACCGGCCTGGTTCACCCCAGTATAC
GTGAACTCGTTTTTACTAACTCCATTGC
GGAACCTAAAACGCGTGAACAAGATTT
TTAAAGAGGACATTGCGCCGAGGCAGC
CCCACTGTGTTAAACATCCAACGTGTA
TCTTACTGGATTATTATGCTCAAGGAGA
CGAATTGCCTCGGGTGCCTTAAGGGTT
ATTGACGTCGCGAACTGATCCCGTCGA
CGACACATTGACACTATTCGTCGGACG
CATTATTCGGAACTATGTCCTTTTCCGG
TTGAGCCCCCTATATGGAAGTTCCCGGA
TCAACTTCGCATAGATTACAACCGGGA
TTATCAACATCGTTTTAGACGTTGTAGT
GTAAGGATTAAGAAGGTAGACGACGGT
TGGAACTCACCCGACGTCCCGTCCGCG
CTTTACGTCTGCGTTTTCGGCCGTAACG
GTTGATCCTGTGGGGGACGGGCTGCAA
TGAAGATTTTTTGAGACGTCTACACTTC
ACGGTCTACAGAGTTTTGTGCTATGCTG
CTTAAGAATTCCGAC



شکل ۲- نمایش وکتور نوترکیب خطی شده PET۲۳a حامل ژن بهینه شده hG-CSF. این ژن درون جایگاه I *NdeI*/*BamH* واقع در MCS وکتور وارد شد.

بیان hG-CSF نوترکیب

وکتور بیانی pET۲۳aحاوی ژن hG-CSF به سلول های مستعد BL۲۱ و Origami ترانسفورم شد. تایید ترانفسورم شدن این سویه ها توسط کشت بر روی محیط LB Agar حاوی آمپی سیلین (۱۰۰mM) انجام شد و به دنبال آن، کلنی های خالص رشد کرده بر روی محیط کشت به محیط کشت LB Broth حاوی آمپی سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل شیکر انکوباتور کشت داده شد تا به چگالی نوری ۰/۷ در طول موج ۶۰۰ نانومتر رسید ($OD_{۶۰۰}$). بیان hG-CSF به واسطه اضافه کردنIsopropyl β-D-۱-thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار القا شد. سلول های باکتری بعد از گذشت چهار ساعت به وسیله سانتریفوژ با دور ۹۰۰۰ rpm به مدت سه دقیقه در دمای ۸°C رسوب داده شد. برای استخراج پروتئین های سلولی، مقدار ۱ml از نمونه کشت داده شده را رسوب و سپس به آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه (۸۰ mM Tris-HCl (pH ۶.۸)، SDS ۲٪ (w/v)، β-mercaptoethanol ۵٪ (v/v)، glycerol ۱۰٪ (v/v) و bromophenol blue ۰.۰۰۱) اضافه و به مدت پنج دقیقه جوشانده شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از این نمونه های پروتئینی روی ژل پلی اکریلامید (SDS-PAGE) ۱۲.۵٪ (w/v) با ولتاژ ۹۰ به مدت دو ساعت انجام گردید.

وسترن بلات

به منظور شناسائی و تائید باند منسوب به پروتئین hG-CSF، پس از الکتروفورز نمونه های پروتئینی در کنار مارکر عمل انتقال آنها به غشاء نیترو سلولزی صورت گرفت. پس از انکوباسیون غشاء با رقت ۱/۱۰۰۰ از آنتی بادی ضد His-tag، اتصال آن به برچسب هیستیدینی با استفاده از آنتی بادی ثانویه goat_anti.mouse IgG متصل به HRP، پس از افزودن محلول DAB بررسی شد. با مقایسه غشاء رنگ شده وسترن بلات و ژل SDS-PAGE هم ارز آن مشاهده شد که تنها پروتئین های ردیابی شده در روی غشاء باند های منسوب به hG-CSFدر ستون بعد از القاء بودند.

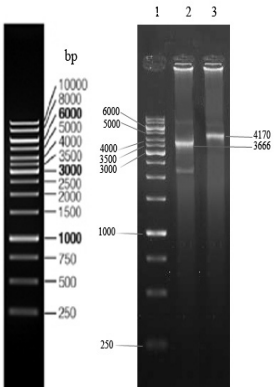
نتایج

نتایج استخراج وکتور

ژن hG-CSF با فرآیند لیگاسیون (Ligation) در جایگاه برشی I *BamH* و I *Nde* وکتور pET۲۳a تحت کنترل پروموتور فاژ T۷ همسانه سازی شد. پس از ترانسفورم محصول لیگاسیون در سلول مستعد DH۵α و کشت آن درون محیط کشت L.B Agar حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰mM) و به دنبال آن کلنی های رشد یافته به عنوان کلون های واجد وکتور و احتمالا واجد قطعه ژن انتخاب شدند. برای اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در وکتور، این کلنی ها به صورت تصادفی انتخاب و درون محیط کشت LB broth حاوی آمپی سیلین (۱۰۰mM) کشت داده شد. پس از انجام استخراج وکتور، صحت استخراج وکتور توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شدند (شکل ۳)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

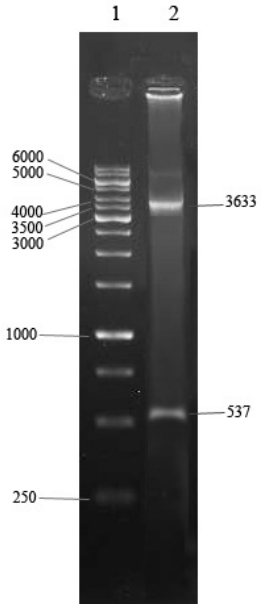
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.11.3]



شکل ۳- نتایج استخراج وکتور، جاهک ۱: نشانگر وزنی DNA ۱Kbp. چاهک ۲: وکتور PET۲۳a با اندازه ۳۶۶۶ bp، چاهک ۳: وکتور PET۲۳a واجد ژن hG-CSF با اندازه ۴۱۷۰ bp

نتایج هضم آنزیمی

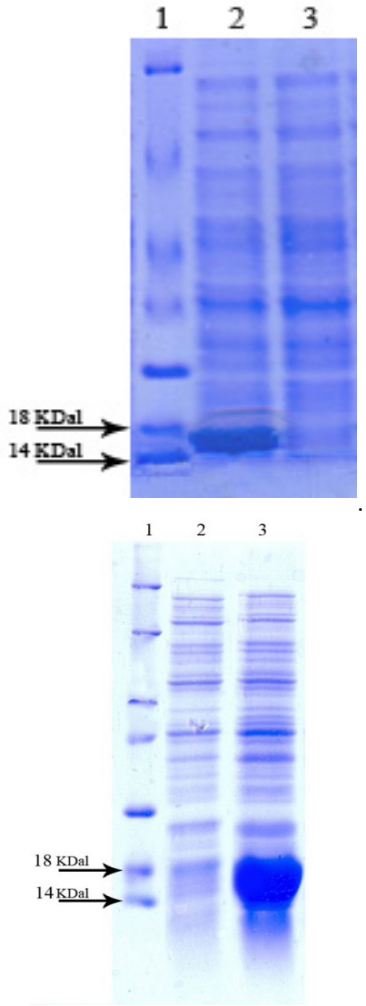
پس از استخراج وکتور تایید قرار گیری صحیح قطعه ژنی در قسمت جایگاه همسانه سازی چندگانه (MCS)، به وسیله آزمایش هضم با دو آنزیم برشی *BamH* I و *Nde* I بررسی شد. هضم با این دو آنزیم شامل دو قطعه با اندازه ی ۵۳۷ bp (ژن hG-CSF) و ۳۶۳۳ bp (وکتور خطی شده PET۲۳a) بود (شکل ۴).



شکل ۴- تایید حضور و صحت قرارگیری قطعه ژن توسط آزمایش هضم دوطرفه: ستون ۱ نشانگر وزنی ۱Kbp DNA، چاهک ۲ نتیجه هضم با آنزیم های Nde I و BamH I یک قطعه با اندازه ۳۶۳۳ bp (وکتور pET۲۳a فاقد ژن مورد نظر)و یک قطعه با اندازه ۵۳۷ bp(ژن hG-CSF) مشاهده می شود.

نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات

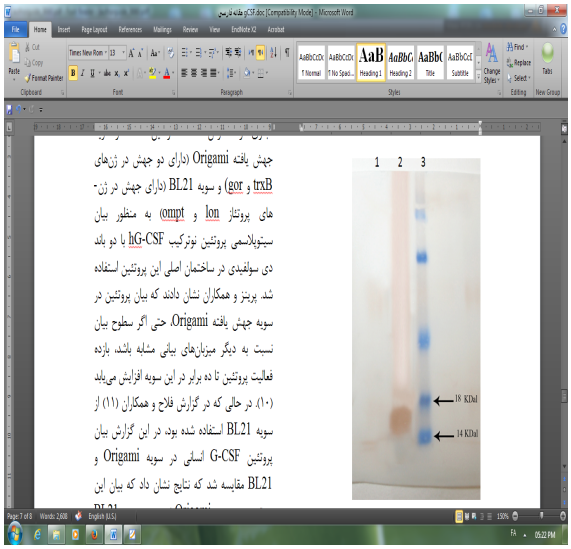
ژن hG-CSF پس از اینکه از وکتور pGEM برش داده شد، درون وکتور بیانی pET۲۳a تحت کنترل پروموتور فاژ T۷ جایگزین شد. این وکتور نوترکیب (pET۲۳a-hG-CSF) به سویه *E. coli* Origami و BL۲۱ ترانسفورم شد و پس از القا با IPTG، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد. به منظور انجام SDS-PAGE سلول ها را رسوب داده و سپس لیز شدند. پروتئین نوترکیب hG-CSF بیان شده در سویه های Origami و BL۲۱ حاوی pET۲۳a-hG-CSF با وزن مولکولی ۱۸/۸ کیلو دالتون قابل مشاهده بود (شکل ۵). هم چنین برای تایید بیان پروتئین از وسترن بلات استفاده شد که نتیجه آن در شکل ۶ آمده است.



شکل ۵ – نتایج SDS-PAGE. (پایین) سویه نوترکیب *E. coli* Origami. چاهک شماره ۱ نشانگر وزنی مولکولی پروتئینی، چاهک شماره ۲ و ۳ کلون سویه Origami واجد وکتور pET۲۳a-hG-CSF به ترتیب قبل و ۴ ساعت پس از القا با IPTG. (بالا) سویه نوترکیب *E. coli* BL۲۱ چاهک شماره ۱ نشانگر وزنی مولکولی پروتئینی، چاهک شماره ۲ و ۳ کلون سویه BL۲۱ واجد وکتور *pET۲۳a*-hG-CSF به ترتیب ۴ ساعت پس از القا با IPTG و قبل از القا با IPTG

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.11.3]



شکل ۶– بررسی الگوی پروتئینی hG-CSFبیان شده در *E. coli* Origami با روش وسترن بلات. ستون ۱ نمونه غیر القا شده، ستون ۲ نمونه القا شده و ستون ۳ نشانگر وزنی مولکولی پروتئینی Prestain

بحث

G-CSF موشی ابتدا در سال ۱۹۸۳ توسط نیکولا شناسایی شد و تا حدودی تخلیص شد (۱۰). یکی از مهم ترین مصارف درمانی hG-CSF در جهت درمان بیماری کاهش نوتروفیلی است. این بیماری همراه با کاهش تعداد نوتروفیل های خون از حد طبیعی $۱/۵\times۱۰^{۹}$در هر لیتر است که در افرادی با نقص های ژنتیکی، سرکوب مغز استخوان به دنبال دستکاری های فارماکولوژیکی، عفونت ها و بیماران سرطانی که تحت شیمی درمانی می باشند، مشهود است (۱۷).

بیان بالای پروتئین نوترکیب hG-CSF ممکن است به کدون بهینه شده ژن این پروتئین مربوط باشد. جایگزینی کدون های نادر با کدون های بهینه شده ژن ها می تواند بیان پروتئین را به طور معنی دار افزایش دهد (۸، ۱۰ و ۱۴). در واقع امروزه، این راهبرد به منظور تولید پروتئین نوترکیب hG-CSF در سطوح بیان بالاتر انجام می شود (۴، ۱۱ و ۱۲). هم چنین بیان بالای پروتئین به صورت اجسام توده ای نامحلول ممکن است به دلیل حفاظت پروتئین از پروتئاز ها باشد (۱۴). از طرفی ممکن است کدون های بهینه شده در حفاظت پروتئین های تازه تولید شده از پروتئولیز نقش داشته باشند (۹).

اخیرا سویه های بیانی جدیدی از *E. coli* بصورت تجاری در دسترس هستند. در این مطالعه از سویه جهش یافته Origami (دارای دو جهش در ژن های trxB و gor) و سویه BL۲۱ (دارای جهش در ژن های پروتئاز lon و ompt) به منظور بیان سیتوپلاسمی پروتئین نوترکیب hG-CSF با دو باند دی سولفیدی در ساختمان اصلی این پروتئین استفاده شد (۱۸). پرینز و همکاران نشان دادند که بیان پروتئین در سویه جهش یافته Origami، حتی اگر سطوح بیان نسبت به دیگر میزبان های بیانی مشابه باشد، بازده فعالیت پروتئین تا ده برابر در این سویه افزایش می یابد (۱۴). در گزارش فلاح و همکاران از سویه BL۲۱ استفاده شده بود (۶)، در حالی که در این مطالعه بیان پروتئین G-CSF انسانی در سویه Origami و BL۲۱ مقایسه شد که نتایج نشان داد که بیان این پروتئین در سویه Origami نسبت به سویه BL۲۱ بهتر می باشد. از جنبه کاربرد بالینی، Shyu و همکارانش گزارش کردند که استفاده از G-CSF می تواند منجر به بهبودی Rat ها از سکته مغزی شود. تزریق زیرپوستی G-CSF به Rat های دارای ischemia مغزی می تواند عملکرد عصبی جدید را برانگیزد. هم چنین تولید G-CSF کارآمد در مقیاس صنعتی از جنبه بالینی می تواند برای درمان بیماری پارکینسون و ischemia مغزی حاد و اختلالات عصبی دیگر مفید باشد (۲).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که جهت بیان پروتئین نوترکیب G-CSF انسانی، سویه *E. coli* Origami سویه مناسبی برای این منظور می باشد و این سویه می تواند به عنوان یک میزبان مناسب جهت بیان این پروتئین در مقیاس بالا استفاده گردد. پیشنهاد می شود، بیان این پروتئین نوترکیب در میزبان های بیانی یوکاریوتی نیز بررسی شود و در نهایت برای کاربردی نمودن جنبه بالینی آن، در مدل حیوانی آزمون شود.

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای تأمین منابع مالی این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.11.3]

منابع

1. Bessette PH. Aslund F. Beckwith J. et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1999; 96: 13703–13708.
2. Chien S. Cloning and expression of bioactive human granulocyte colony stimulating factor in *Pichia pastoris*. JCCS2010 ; 57: 850-856.
3. Dale DC. Colony-stimulating factors for the management of neutropenia in cancer patients. J Drugs 2002; 62(Suppl 1): 1–15.
4. Devlin PE. Drummond RJ. Toy P. et al. Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows efficient processing by methionine aminopeptidase in *Escherichia coli* 1988;Gene 65: 13–22.
5. Donahue Jr. Robert L. BL21-SI ™ Competent Cells for Protein Expression in *E.coli*. Robert A. Bebee Life Technologies. 1999; 21: 44-51.
6. Fallah MJ. Akbari B. Saeedinia AR. Et al. Overexpression of recombinant human granulocyte colony-ctimulating factor in *E. coli* 2003; 28(3).
7. Fernández-Varón E. Villamayor L. Granulocyte and granulocyte macrophage colony-stimulating factors as therapy in human and veterinary medicine. J Vet 2007; 174: 33-41.
8. Fredrick K. Ibba M. How the sequence of a gene can tune its translation. J cell 20; 41: 227-229.
9. Gomes FR. Maluenda AC. Tapias JO. *et* al. Expression of recombinant human mutant granulocyte colony stimulating factor (Nartograstim) in *Escherichia coli*. J Microbiol Biotechnol 2012; 28(7): 2593–2600.
10. Jana S. Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia *coli*. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 67: 289–298.
11. Jevsevar S. Gaberc-Porekar V. Fonda I. et al. Production of nonclassical inclusion bodies From which correctly folded protein can be extracted. Biotechnol Prog 2005; 21: 632–639.
12. Kang SH. Na KH. Park CII. *et* al. High Level expression and simple purification of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *E.coli*. Biotechnol Lett 1995; 17: 687–692.
13. Klingemann Hans-G. Clinical applications of recombinant human colony-stimulating factors. J CMA 1989; 140: 137-142.
14. Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 1996; 60: 512–538.
15. Marco A. Stratebiogies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. J Microb Cell Fact 2009; 8-26.
16. Nagata SH. Tsuchiya M. Asano S. et al. The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony stimulating factor. J EMmBO 1986; 5(3): 575-81.
17. Nicola NA. Metcalf D. Matsumoto M. et al. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. 1983; 258(25): 9017-9023.
18. Prinz WA. Aslund F. Holmgren A. et al. J Biol. Chem 1997; 272: 15661–15667.
19. Sambrook J. Russel DW. Molecular cloning. a laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA. 2001. 587-592.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.11.3]