



## Investigation of two shuttle vectors for cloning and expression of Interleukin 11 gene in *Bacillus subtilis*

Atena azarniosh<sup>1</sup>, Majid Moghbeli<sup>2</sup>, Farshid Kafilzadeh<sup>3</sup>, Mohammad Kargar<sup>4</sup>, Hooshang Jamali<sup>5</sup>

<sup>1</sup> PhD, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran. <sup>3</sup> Professor, Department of biology, Faculty of Basic Sciences, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>4</sup> Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. <sup>5</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** The recombinant human IL-11 is the only approved medicine used for treating chemotherapy-induced side effects. Platelet count decreases (thrombocytopenia) in cancer patients who undergo chemotherapy. Interleukin-11 (IL-11) is a platelet increasing cytokine. This study aimed to use two shuttle vectors of pHT43 and pMR12 for cloning the IL-11 gene and expression of its protein in *Bacillus subtilis* and the expression level in these two vectors was investigated.

**Materials & Methods:** In this study, the IL-11 gene was designed and synthesized as a closed structure with two restriction sites for *Bam*H1 and *Xba*I enzymes and a final length of 609 bp. Then the gene was cloned in two shuttle vectors of pHT43 and pMR12 and transferred to *B. subtilis* WB 600. The expression level of the recombinant IL-11 was evaluated with the Bradford incubation, the pMR12-int11-carrying bacteria expressed higher levels of the protein (75 µg/mL) than pHT43-int11-carrying bacteria.

**Results:** The results of PCR indicated that the IL-11 gene existed in shuttle vectors pHT43 and pMR12. The expression of this protein was about 75 /g / mL using pMR12 vector, which is higher than the bacterium carrying pHT43-int11.

**Conclusion:** The expression level of the recombinant IL-11 protein with pMR12 vector was higher than pHT43 vector. This amount has not been reported so far for IL-11. *B. subtilis* can express and produce IL-11 and can be used as a source for drug production.

**Keywords:** interleukin-11, shuttle vector, pHT43, pMR12, *Bacillus subtilis*.

Received: 28 June 2020

Revised: 31 August 2020

Accepted: 5 December 2020

Correspondence to: Majid Moghbeli

Tel: +98 9122218612

E-mail: [moghbeli552@gmail.com](mailto:moghbeli552@gmail.com)

Journal of Microbial World 2021, 13(4): 379 - 388.



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## استفاده از دو شاتل وکتور در کلون سازی و بیان ژن ایتنرلوکین ۱۱ در باسیلوس سوبتیلیس

آتنا آذرنيوش<sup>۱</sup>، مجيد مقبلي<sup>۲\*</sup>، فرشيد كفيل زاده<sup>۱</sup>، محمد كارگر<sup>۱</sup>، هوشنگ جمالي<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. <sup>۲</sup> استادیار، گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران. <sup>۳</sup> استاد، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. \* استادیار، گروه زیست شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** در بیماران سرطانی که تحت شیمی درمانی قرار می‌گیرند پلاکت خونشان پایین می‌آید ایتنرلوکین ۱۱، یک سایتوکین افزایش دهنده پلاکت خون است. ایتنرلوکین ۱۱ نوترکیب انسانی، تنها دارویی است که برای درمان اثرات ناشی از شیمی درمانی تأیید شده است. در این تحقیق از دو شاتل وکتور pHT43 و pMR12 جهت کلون کردن و بیان ژن ایتنرلوکین ۱۱ در باسیلوس سوبتیلیس استفاده شد و میزان بیان در این دو وکتور بررسی گردید.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه ژن ایتنرلوکین ۱۱ به صورت ساختاری بسته با دو جایگاه برش *BamHI* و *XbaI* با اندازه نهایی 609 bp طراحی و سنتز شد. سپس این ژن بر روی شاتل وکتورهای pHT43 و pMR12 کلون و به باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB600 انتقال یافت. میزان بیان پروتین نوترکیب ایتنرلوکین ۱۱ بوسیله معرف بردفورد مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** با روش PCR وجود ژن ایتنرلوکین ۱۱ را بر روی شاتل وکتورهای pHT43 و pMR12 نشان می‌دهد. میزان بیان توسط باکتری حامل pMR12-int11 پس از ۹ ساعت انکوباسیون بیشترین میزان یعنی حدود 75 µg/mL و باکتری حامل pHT43-int11 پس از ۴ ساعت، به میزان 61/4 µg/mL بوده است.

**نتیجه‌گیری:** میزان بیان پروتین نوترکیب ایتنرلوکین ۱۱ با استفاده از وکتور pMR12 نسبت به وکتور pHT43 بیشتر می‌باشد و تاکنون چنین میزان بیانی برای ایتنرلوکین ۱۱ گزارش نشده است. باسیلوس سوبتیلیس قادر به بیان و تولید پروتین ایتنرلوکین ۱۱ می‌باشد و می‌توان از آن به عنوان یک میزبان مناسب برای تولید دارو استفاده نمود.

**واژگان کلیدی:** ایتنرلوکین-۱۱، شاتل وکتور، pMR12، pHT43، باسیلوس سوبتیلیس.

پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۹/۱۵

ویرایش مقاله: ۱۳۹۹/۶/۱۰

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۴/۸

### مقدمه

استخوان بوده که متعلق به خانواده ایتنرلوکین ۶ است (۱). زمانی که بافت آسیب یا عفونت رخ می‌دهد IL-6 به سرعت تحریک و سنتز می‌شود و از طریق واکنش سیستم دفاعی بدن فاز حاد، در دفاع به میزبان کمک می‌کند (۲). علاوه بر سیستم خونسازی (هماتوپویتیک) در افزایش پاسخ‌های

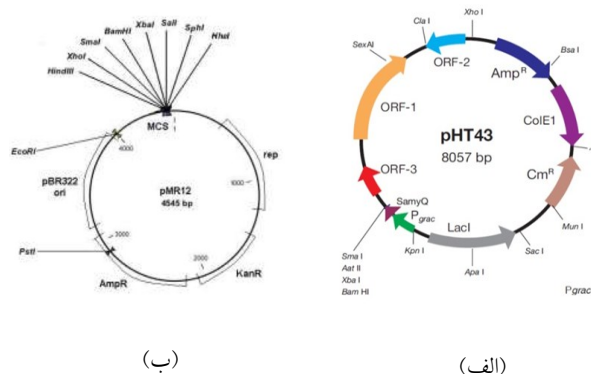
ایتنرلوکین-۱۱ انسانی، یک سایتوکاین پلی‌تروپیک مشتق شده از سلول‌های استرومال یا سلول‌های نگهدارنده موجود در مغز

(\* آدرس برای مکاتبه: دامغان، جاده چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده علوم پایه. تلفن: ۰۹۱۲۲۲۱۸۶۱۲ پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com



فیبروبلاست‌ها شده و همچنین منجر به ترشح عوامل رگ زایی مانند اندوتلیال عروقی می‌شود. فاکتور رشد (VEGF) به همراه IL-11 منجر به رگ زایی در مفصل بیماران آرتریت روماتوئید (RA) می‌شود (۲۳). همچنین مشخص شده است که IL-11 تنظیم شده ترین ژن در کل ژن فیبروبلاست‌های ماکروفاژ فعال شده در آرتریت روماتوئید (RA) است روی هم رفته این داده‌ها IL-11 را به عنوان یک هدف دارویی بالقوه نشان می‌دهند (۲۴). باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*) به دلیل ویژگی‌های غیر بیماریزا بودن و توانایی ترشح مقادیر بالای پروتین به عنوان یک میزبان خوب برای کلون سازی ژن و بیان پروتین در نظر گرفته می‌شود. اما کارایی انتقال DNA پلاسمیدی اتصال یافته به درون سلول‌های باسیلوس سوبتیلیس مستعد در مقایسه با سلول‌های *شریشیا کلی* مستعد شده با کلرید کلسیم پایین می‌باشد (۲۵ و ۲۶) بنابراین مراحل اولیه کلون سازی با استفاده از شاتل وکتور در *شریشیا کلی* انجام می‌شود.

وکتور pWB980، یک وکتور باسیلوسی است ولی شاتل نیست که بر این اساس مقبلی (Moghbeeli) و همکاران در سال ۲۰۱۳، با استفاده از ژن مقاومت آمپی سیلین و مبدا همانند سازی وکتور pBR322 و انتقال آن‌ها بر روی وکتور pW980 موفق به ساخت شاتل وکتور pMR12 شدند که دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین برای تکثیر در *شریشیا کلی* و ژن مقاومت به کانامایسین برای تکثیر در باسیلوس است (۲۶) که در این تحقیق از آن استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱: الف) نقشه وکتور pHT43، ب) نقشه وکتور pMR12

آنتی ژن-آنتی بادی، القای تمایز عصبی (۳)، القای پروتین‌های فاز حاد (۵ و ۴)، متابولیسم استخوان (۶ و ۷)، پاسخ‌های ایمنی و پاسخ‌های ایمنی و محافظت کننده سلولی (Cytoprotective) (۸ و ۱۰) و همچنین ممانعت از آدیپوژنریز یا چربی ساز (AGIF) (۱۱ و ۱۲) دارای نقش کلیدی است.

اینترلوکین ۱۱ یک سایتوکاکن چند منظوره است که سلول‌های خونی را تحریک کرده و باعث افزایش تعداد پلاکت می‌شود و تنها دارویی است که جهت کاهش اثرات ناشی از شیمی درمانی تأیید شده است (۱۳). ژن IL-11 انسانی با طول 7 Kb شامل ۵ اگزون و ۴ اینترون بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۹ واقع شده است. این ژن توسط ۱۹۹ آمینو اسید کد شده و ایجاد پروتین ۲۳KD با نقطه ایزوالکتریک بالا و فاقد سیستین و نواحی قابل گلیکوزیله شدن می‌باشد (۱۴). اتصال اینترلوکین ۱۱ به گیرنده‌اش باعث فسفوریلاسیون تیروزین درون سلولی می‌شود که به طریقی فعالیت‌های زیستی مشاهده شده اینترلوکین ۱۱ را افزایش می‌دهد. استدلال برای ارزیابی اینترلوکین ۱۱ به عنوان یک داروی درمانی بالقوه عمدتاً به توانایی آن در القای سنتز پلاکت است. نمونگا نام تجاری یک محصول بر پایه اینترلوکین ۱۱ است که در سلول‌های *شریشیا کلی* (*E. coli*) مهندسی شده تولید و برای پیشگیری از ترومبوسایتوپنیا تصویب شده است (۱۵). طبق تحقیقی که در سال ۲۰۱۹ انجام گرفت، بر روی سطوح بالاتر IL-11 در پلاسما به طور قابل توجهی حضور حوادث قلبی را افزایش و نتیجه بدی را نشان می‌دهد. بنابراین میزان IL-11 را باید مورد توجه قرارداد (۱۶ و ۱۷).

فعالیت ضد ویروسی اینترلوکین ۱۱ به عنوان یک پاسخ به یک عفونت اسهال ویروسی همه گیر در خوک مورد تحقیق قرار گرفت که نقش موثری در درمان این بیماری داشته است (۱۸). از نظر تاریخی، IL-11 به عنوان ضد التهاب توصیف شده است (۱۹). کاهش التهاب در مدل‌های جوندگان آرتریت روماتوئید (RA) (۲۱)، بیماری لایم، (۲۲) التهاب ریه، هپاتیت، التهاب مخاطی و کولیت مشاهده شده است (۱۷).

اخیراً، مطالعه‌ای بر روی تاثیر IL-11 در بیماران آرتریت روماتوئید انسانی (RA) انجام گرفت. IL-11 منجر به فعال شدن

۱٪ گلوکوز، ۰/۰۱٪ منیزیم سولفات (mgso4)، ۰/۰۱۴٪ کلسیم کلرید (cac12)، ۰/۰۰۱٪ (Feso4) با ۵ میکروگرم/میلی لیتر کلرامفنیکل و LB Broth تلقیح و به مدت ۳-۲ ساعت همراه با هم زدن در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد تا کدورت محیط در طول موج ۶۰۰ به حدود ۰/۸-۰/۶ رسید. سپس بیان پروتیین در پلاسمید نوترکیب pHT43-int11 با اضافه کردن IPTG (PouyaGene Azma, Iran) تا غلظت نهایی 1mM القا شد. لازم به ذکر است پلاسمید pMR12 قابل القا نیست لذا به ارلن های حاوی باکتری های حامل این پلاسمید IPTG اضافه نمی شود.

۰/۵ میلی لیتر از هر نمونه پلاسمید pHT43 به ترتیب بعد از ۱ تا ۶ ساعت بعد از القا جدا شد و در مورد نمونه های حامل پلاسمید pMR12 از ۵ تا ۱۲ ساعت جدا گردید و بعد از ۳ دقیقه میکروفیوژ با دور ۱۳۰۰۰rpm محلول رومانند دور ریخته شد و به لوله جدید انتقال یافت و سپس نمونه ها در یخچال نگهداری شدند. غلظت پروتیین در هر نمونه بوسیله روش بردفورد بررسی شد. به عنوان کنترل منفی و بلانک در بررسی میزان پروتیین از باسیلوس سوبتیلیس حامل پلاسمید pHT43، pMR12 بدون ژن استفاده شد.

### یافته ها

طراحی ژن: سکانس ژن اینترلوکین طراحی و سنتز شده بر اساس کدون های مورد استفاده در باسیلوس سوبتیلیس (شکل ۲).

```

ggatccAACTGCGTTTGCCGCTCTGTTCTTGTGTCTTCTCTTTGGCCTGA 50
TACAGCTGTGTCTCCTGGCCCTCCTCGTGTCTCTCCTG 100
ATCCTCGTGCTGAACCTTGATTCTACAGTCTCTTACACGTTCTCTTCT 150
GCTGATACACGTCAACTTGCTGCTCAACTCGTGATAAAATCCCTGCTGA 200
TGGCGATCATAACCTTGATTCTCTCTACACTTGCTATGCTGCTGGCG 250
CTCTTGGCGCTCTCAACTCTCGCGTCTTACACGCTCTCGTGCTGAT 300
CTTCTTCTTACCTTCGTCATGTTCAATGGCTTCGTCGTGCTGGCGGCTC 350
TTCTCTTAAACACTTGAACCTGAACCTGGCACACTTCAAGCTCGTCTTG 400
ATCGTCTCTCTCGTCTTCAACTCTTATGCTCTGCTCTGCTCTTCTCT 450
CAACCTCCTCCTGATCCTCCTGCTCCTCTCTTGTCTCTCTCTCTCTGCT 500
    
```

شکل ۲: توالی ژن اینترلوکین طراحی و سنتز شده بر اساس کدون های مورد استفاده در باسیلوس سوبتیلیس: ترادفهایی که در زیر آنها خط کشیده است جایگاه های آنزیمی است که در انتهای ۵ جایگاه BamHI و در انتهای ۳ جایگاه XbaI می باشد.

وکتور pHT43 یک شاتل وکتور/شریشیا کلی - باسیلوس سوبتیلیس است، که/شریشیا کلی را به آمپیسیلین و باسیلوس سوبتیلیس را به کلرامفنیکول مقاوم می کند (۲۷). حسن آن نسبت به pMR12 داشتن پروموتور قابل القا با IPTG است در حالی که پروموتور pMR12 قابل القا نیست و بیان آن دائمی است. در این تحقیق از pHT43 نیز استفاده شد و میزان بیان آن باهم مقایسه شد.

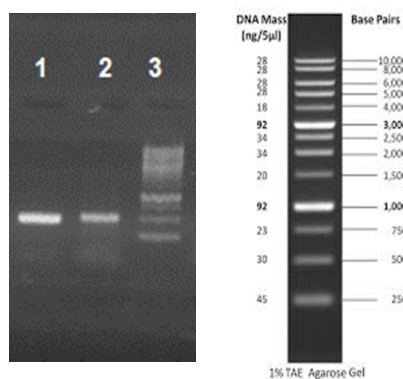
### مواد و روش ها

الف) طراحی ژن: سکانس ژن اینترلوکین ۱۱ از بانک ژن و مقالات مختلف استخراج شد و بعد از انتخاب سکانس مناسب، سکانس سیگنال پپتید حذف و سپس جایگاه BamHI در ابتدا و جایگاه XbaI در انتهای ژن قرار داده شد و جهت افزایش میزان بیان، کدون های مورد استفاده با استفاده از نرم افزار J-CAT بر اساس کدون های باسیلوس سوبتیلیس بهینه سازی گردید. ژن با اندازه نهایی ۶۰۹ bp بوسیله شرکت Genray (چین) سنتز و بر روی وکتور pGH تحویل گرفته شد.

ب) کلون کردن ژن بر روی شاتل وکتورهای pHT43، pMR12: ژن اینترلوکین ۱۱ سنتز شده از روی وکتور pGH با هضم آنزیمی بوسیله آنزیم های BamHI (Thermo scientific, USA) و XbaI خارج و بعد از خالص سازی با کیت خالص سازی DNA از ژل (پویا ژن آزما، ایران) بر روی شاتل وکتورهای pHT43 (MoBiTec, Germany) و pMR12 در جایگاه های BamHI و XbaI کلون و با روش شوک حرارتی به سلول گیرنده/شریشیا کلی (DH5α) انتقال داده شد. وجود ژن بر روی پلاسمید با هضم آنزیمی و PCR بررسی شد. پلاسمید های نوترکیب حامل ژن pMR12-int11، pHT43-int11 نامگذاری شدند.

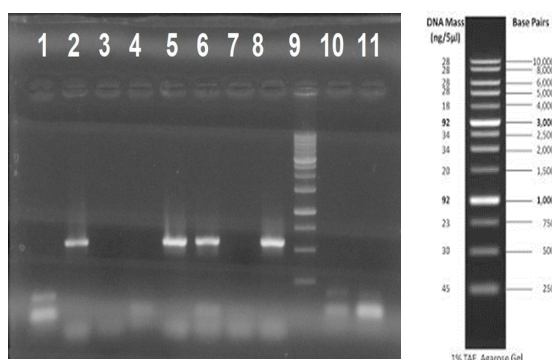
پ) بیان پروتیین نوترکیب: پلاسمید های نوترکیب pMR12-int11، pHT43-int11 با استفاده از کیت خالص سازی پلاسمید از/شریشیا کلی (DH5α) جدا شدند و با استفاده از بافر OTB1000 ml به طور جداگانه به باسیلوس سوبتیلیس (WB600) انتقال داده شدند (۲۸). باکتری های نوترکیب در ۵ میلی لیتر محیط MFA (۰/۵٪ عصاره مخمر، ۰/۵٪ پپتون،

ژن خالص شده از ژل در شکل ۵ مشخص شده است.



شکل ۵: ژن خالص شده از ژل. چاهک ۱ و ۲) نمونه‌های ژن خالص شده از ژل، چاهک ۳) 1kb ladder

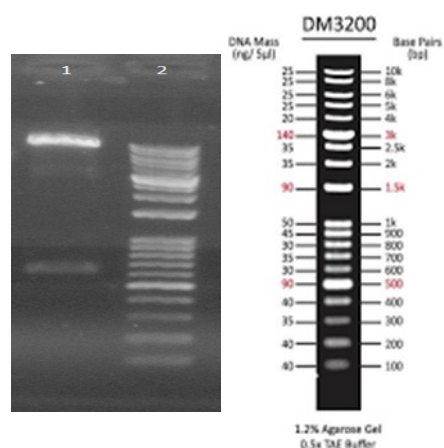
وجود ژن بر روی وکتورهای pMR12 و pHT43 در شکل ۶ ثابت شده است.



شکل ۶: الکتروفورز محصول PCR بر روی نمونه‌های احتمالی پلاسمید حامل ژن. چاهک‌های ۱ تا ۳ و ۵) پلاسمیدهای pMR12 احتمالی حامل ژن، چاهک ۴) پلاسمید pMR12، چاهک‌های ۶ تا ۸ و ۱۱) پلاسمیدهای pHT43 احتمالی حامل ژن، چاهک ۱۰) پلاسمید pHT43، چاهک ۹) 1kb ladder

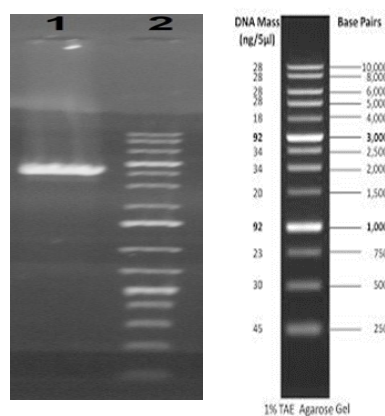
بررسی بیان پروتئین نوترکیب: تنها بر روی یک نمونه از باسیلوس سوتیلیس دارای پلاسمید pHT43-int11 در محیط‌های LBbroth و MFA و یک نمونه باکتری حامل پلاسمید pMR12-int11 فقط در محیط MFA بررسی بیان انجام شد لازم به ذکر است با توجه به نتایج قبلی و همکاران که وکتور pMR12 را ساختند این وکتور در محیط LB بیان خیلی پایینی دارد از این رو در این پژوهش میزان بیان بر روی این محیط بررسی نشد (جداول ۱ و ۲).

کلون کردن ژن ایتترلوکین در باسیلوس سوتیلیس: بعد از هضم آنزیمی ژن از روی وکتور PGH، ژن بر روی وکتورهای pMR12 و pHT43 به صورت جداگانه، کلون گردید و به باسیلوس سوتیلیس انتقال داده شد. وجود ژن بر روی وکتورهای pMR12 و pHT43 بوسیله هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xba*I و PCR ثابت شد. در شکل ۳ هضم آنزیمی pHT43 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xba*I تایید شده است.



شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمید pHT43: چاهک ۱) پلاسمید هضم شده چاهک ۲) 1kb plus ladder

و در شکل ۴ هضم آنزیمی pMR12 با آنزیم‌های *Bam*HI و *Xba*I تایید شده است.



شکل ۴: هضم آنزیمی پلاسمید pMR12: چاهک ۱) پلاسمید هضم شده چاهک ۲) 1kb plus ladder

### بحث

در مطالعه حاضر، ژن اینترلوکین ۱۱ در وکتورهای بیانی Pmr12, pHT43 کلون شد که منجر به تولید پلاسمید بیانی نو ترکیب گردید. پلاسمید بیانی نو ترکیب با هضم توسط آنزیم های *Bam*HI و *Xba*I تایید گردید. میزان بیان توسط باکتری حامل pMR12-int11 بعد از ۹ ساعت گرماگذاری بیشترین میزان یعنی حدود ۷۵ میکروگرم در هر میلی لیتر بوده است که نسبت به باکتری حامل pHT43-int11 بیشتر بوده است.

شاتل وکتور pMR12 به دلیل داشتن ۸ جایگاه منحصر بفرد پلی لینکر و با اندازه مناسب ۴/۵ می تواند یک سیستم کارآمد به منظور کلون سازی آسان ژن محسوب گردد (۲۶).

با اینکه pHT43 یک شاتل وکتور است و با القاگر IPTG تحریک شده بیان افزایش میابد ما شاهد بیان بیشتر در باکتری حامل pMR12-int11 بودیم که خود نشانگر کارآمدی وکتور pMR12 است.

شیمی درمانی دارای عوارض اجتناب ناپذیری است که از شایع ترین و مهم ترین این عوارض، کاهش شمار سلول های خونی از جمله پلاکت ها می باشد. در این راستا اثرات فاکتورهای رشد متعددی بر بهبود تولید پلاکت ها مورد بررسی قرار گرفته و شناسایی اثرات درمانی سودمند IL11 نقطه عطفی در مطالعات محسوب می گردد (۲۹). در سال ۱۹۹۴ هیرایاما (Hirayama) و همکارانش بیان کردند که اینترلوکین ۱۱ از گروه فاکتورهای تشدید کننده خون سازی بوده و به عنوان محرک مگاکاریوسیتوژنز، ترومبوپوئیس، میلوپوئیس و لنفوپوئیس در محیط کشت معرفی شد (۳۰).

در سال ۲۰۱۹، یانچن (Yuchen) و همکاران، افزایش BNP ناشی از درمان اینترلوکین ۱۱- انسانی نو ترکیب در بیماران مبتلا به ترومبوسیتوپنی ناشی از شیمی درمانی، مورد بررسی قرار گرفت نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که اگرچه rhIL-11 برای درمان ترومبوسیتوپنی ناشی از شیمی درمانی مفید است، کنترل وضعیت بالینی بیماران و بررسی مجدد سطح

جدول ۱: میزان پروتئین نو ترکیب اینترلوکین ۱۱ بیان شده در محیط های LB و MFA در ۶ ساعت. میزان بیان بر اساس میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت می باشد.

ساعت	LB	MFA
صفر	۰/۵	۱/۵
اول	۳/۶	۱۸/۸
دوم	۱۶/۳	۶/۶
سوم	۲۱/۸	۱/۱
چهارم	۲۴/۱	۶۱/۴
پنجم	۲۲/۹	۵۸/۱
ششم	۲۲	۵۴/۷

میزان بیان توسط باکتری حامل پلاسمید pHT43-int11، در محیط MFA بیشتر از محیط LB بوده است. همچنین در ساعت چهارم بیشترین بیان در هر دو محیط بدست آمده است.

جدول ۲: جذب نمونه ها و مقدار پروتئین محاسبه شده مربوط به باکتری حامل pMR12-int11

ساعت	جذب	مقدار پروتئین (µg)	مقدار پروتئین در هر ml (µg)
۵	۰/۰۳	۳/۸۷	۳۸/۷
۶	۰/۰۴۴	۴/۷	۴۷
۷	۰/۰۶۵	۵/۶	۵۶
۸	۰/۰۸۴	۶/۶	۶۶
۹	۰/۱۰۱	۷/۴۶	۷۴/۶
۱۱	۰/۰۹۸	۷/۳	۷۳
۱۲	۰/۰۹۰	۶/۹	۶۹

همان طور که در (جدول ۲) مشخص است میزان بیان توسط باکتری حامل pMR12-int11 بعد از ۹ ساعت گرماگذاری بیشترین میزان یعنی حدود ۷۵ میکروگرم در هر میلی لیتر بوده است که نسبت به باکتری حامل pHT43-int11 پس از ۴ ساعت، به میزان ۴/۶۱ µg/mL بوده است، بیشتر می باشد.

باسیلوس سوبتیلیس کلون شد. این مطالعه، اولین گزارش کلونینگ ژن *ansB* در باسیلوس سوبتیلیس بود (۳۴).

در ایران در سال ۲۰۱۶ صادقی (Sadeghi) و همکاران، توانستند در گیاه توتون کلونینگ و بیان ژن IL-11 را با موفقیت به انجام برسانند. توالی ژنی ایتروکین ۱۱ توسط شرکت mwg سنتز شد. انتقال ژن به ناقل بیانی گیاهی pBI121 منتقل گردید. پس از تکثیر ناقل و ژن در باکتری اشریشیا کلی DH5 $\alpha$ ، تخلیص پلاسمید صورت گرفته و این سازه به آگروباکتریوم ترانسفورم شده و سپس به توتون منتقل گردید. انتقال ژن به گیاه از طریق PCR و بیان پروتین در آن از طریق وسترن بلات تایید شد (۳۵).

در مطالعه حاضر، توالی ژن ایتروکین ۱۱ توسط شرکت چینی Gen Ray سنتز شد. سپس به ناقل بیانی وکتور pGH منتقل گردید. میزان بیان پروتین در باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از معرف بردفورد ارزیابی شده است.

فرج نیا (Farajnia) و همکاران در سال ۲۰۱۰، برای بررسی بیان پروتین نوترکیب، سازه ژنی به سویه BI21 که دارای ژن کد کننده RNA T7 پلیمرز تحت کنترل LacI است، تراریزش گردید. سپس سلولها در محیط کشت کانامایسین دار کشت داده شده و نمونه برداری قبل و بعد از القا (با) IPTG انجام شد. نمونه قبل از القا ۳ ساعت بعد از کشت و نمونه بعد از القا ۳ ساعت بعد از افزودن IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار، برداشته شدند. نتایج PAGE-SDS نشان داد که بعد از افزودن IPTG، پروتین نوترکیب ایتروکین ۱۱ با اندازه تقریبی ۲۴KDa بیان شده است (۳۶).

در مطالعه حاضر از القاء کننده IPTG، برای القای بیان پروتین، باکتری باسیلوس سوبتیلیس حامل پلاسمید pHT43-int11 استفاده شد. میزان بیان توسط باکتری حامل پلاسمید pHT43-int11، در محیط MFA ۶۱ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. این نتایج با یافته‌های مطالعات دیگر سازگاری داشته و نشانگر اینست که این سیستم القائی می‌تواند برای القای بیان ایتروکین ۱۱ نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد.

BNP در طول استفاده از rhIL-11 مهم است. علاوه بر این، بیماران سالخورده باید مورد توجه ویژه قرار گیرند (۱۸).

نظر به قیمت بالای ایتروکین ۱۱ نوترکیب خارجی (با نام تجاری نئومگا) ما را بر آن داشت تا بر روی کلون سازی ژن ایتروکین ۱۱ تحقیقی انجام شود با تولید آزمایشگاهی ایتروکین ۱۱ نوترکیب می‌تواند قدم مفیدی برای تولید این داروی ارزشمند باشد.

در سال ۱۹۹۵ توسط مایو (Miao) و همکاران ژن ایتروکین ۱۱ انسانی درون وکتور طراحی شده pEx31 ایتروکین ۱۱ توسط هضم آنزیم‌های برش دهنده کلون شد و پلاسمید نوترکیب حاصل به درون باکتری اشریشیا کلی سویه HB101 منتقل و بیان تحت سیستم پروموتور PL در دمای تنظیم شده صورت گرفت (۳۱). در سال ۲۰۰۵، تن (Tan)، ژن ایتروکین ۱۱ بالغ انسانی (HuIL-11) را پس از بهینه سازی درون وکتور pGEX-2T بین جایگاه برشی *Bam*H1 و *Eco*R1 کلون کردند و پس از انتقال به اشریشیا کلی سویه BL21 در محل انتشار آنزیمی توسط ترومبین، خالص سازی ۹۶٪ صورت گرفت (۳۲).

چون کارایی انتقال DNA پلاسمیدی به درون باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس مستعد در مقایسه با باکتری‌های اشریشیا کلی مستعد شده با کلرید کلسیم پایین می‌باشد، بهتر است مراحل اولیه کلون سازی با استفاده از یک شاتل وکتور در اشریشیا کلی انجام شود و بعد به باسیلوس منتقل گردد.

حسینیان (Hosseinian) و برزمینی (Borzamin)، در سال ۲۰۱۴، وکتور نوترکیب با روش شوک با CaCl<sub>2</sub> سرد به اشریشیا کلی JM101 ترانسفورم شد (۳۳).

در مطالعه حاضر جهت ترانسفورم، از روش شوک حرارتی با CaCl<sub>2</sub> به اشریشیا کلی DH5 $\alpha$  انجام شد. این روش یک روش رایج برای ترانسفورم بوده و در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.

حسینیان (Hosseinian) و برزمینی (Borzamin)، در سال ۲۰۱۴، با استفاده از شاتل وکتور بیانی pMR12 ژن *ansB* را در

## نتیجه گیری

در این مطالعه ژن اینترلوکین ۱۱ طراحی و سنتز شد و برای اولین بار بوسیله دو شاتل وکتور باسیلوسی pMR12 و pHT43 در باسیلوس سوبتیلیس کلون و بیان گردید. میزان بیان این پروتین با استفاده از باکتری حامل pHT43-int11 بعد از ۴ ساعت به بیشترین میزان،  $4/61 \mu\text{g/mL}$  بوده است و با استفاده از وکتور pMR12 حدود ۷۵ میکروگرم در میلی لیتر بدست آمد که نسبت به باکتری حامل pHT43-int11 بیشتر می باشد و تاکنون چنین میزان بیانی برای اینترلوکین ۱۱ گزارش نشده است.

## ملاحظات اخلاقی

نویسندگان مقاله، تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم شرکت پویاژن تهران به منظور در اختیار قرار دادن محیط آزمایشگاه و حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند.

## تعارض در منافع

وجود ندارد.

## References

1. Kobayashi S, Teramura M, Oshimi K, Mizoguchi H. Interleukin-11, Leukemia & lymphoma. 1994;15(2-1): 9-45.
2. Tanaka.T, Kishimoto.T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. Cancer Immunol Res; 2(4) April 2014 chemistry. 1993;268(29) 21527-32.
3. Orazi A, Du X, Yang Z, Kashai M, Williams DA. Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1996;75 (1): 33-42.
4. Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, Spray DC, Kessler JA. Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. Nature. 1993;362(6415):625.
5. Baumann H, Schendel P. Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6. J. biol. chem. 1991;266(30): 2042-7.
6. Fukuda Y, Sassa S. Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG hepatoma cells. Bioche. Bioph. Res. Commun. 1993;193(1): 297- 302.
7. Girasole G, Passeri G, Jilka RL, Manolagas SC. Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. J. clinic. invest. 1994;93(4): 1516-24.
8. Maier R, Ganu V, Lotz M. Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases. J. biolog. 1993 ;15;268(29):21527-32.



9. Peterson RL, Bozza MM, Dorner AJ. Interleukin-11 induces intestinal epithelial cell growth arrest through effects on retinoblastoma protein phosphorylation. *American j. patho.* 1994;149(3) 895-902.
10. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia.* 1999;13(9): 1307-15.
11. Kawashima I, Ohsumi J, Mita-Honjo K, Shimoda-Takano K, Ishikawa H, Sakakibara S, et al. Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS letters.* 1991;283(2):199-202.
12. Keller DC, Du XX, Srouf EF, Hoffman R, Williams DA. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood.* 1993;82(5):1428-35.
13. Montazeri-Najafabady N, Ghasemi Y, Ali Mobasher M, Ghasemian A, Rasoul-Amini S, Ebrahimi. Codon Optimization, Cloning and Expression of Interleukin 11 in Two Different *E. coli*. *Sys.J.Pure App. Microb.* 2016;7(4):2717-2722.
14. McKinley D, Wu Q, Yang-Feng T, Yang YC. Genomic sequence and chromosomal location of human interleukin-11 gene (IL11). *Genomic.* 1993; 814(3),13.
15. Shabani D, Kermani SH. Interleukins and tumor tissue death factor. The first international conference on new findings in biotechnology. 2017; <https://civilica.com/doc/633058>
16. Ye J, Wang Z, Ye D, et al. Increased interleukin-11 levels are correlated with cardiac events in patients with chronic heart failure. *Mediators Inflamm.* 2019;15754-10
17. Cook S.A, Schafer S. Hiding in Plain Sight: Interleukin-11 Emerges as a Master Regulator of Fibrosis, Tissue Integrity, and Stromal Inflammation. *Annu. Rev. Med.* 2020; 71:263–76
18. Yuchen Li, Qingxin Wu, Yuxin Jin and Qian Yang. Antiviral activity of interleukin-11 as a response to porcine epidemic diarrhea virus infection. *Vet. Res.* 2019; 50:111
19. Widjaja AA, Dong J, Adami E, et al. Redefining interleukin 11 as a regeneration-limiting hepatotoxin. *bioRxiv* 830018. <https://doi.org/10.2019.1101/830018>
20. Hirayama F, Katayama N, Neben S, Donaldson D, Nickbarg EB, Clark SC, et al. Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood.* 1994;83(1):8-92
21. Walmsley M, Butler DM, Marinova-Mutafchieva L, et al. An anti-inflammatory role for interleukin11 in established murine collagen-induced arthritis. *Immunology,* 1998; 95(1):31–37.
22. Anguita J, Barthold SW, Samanta S, et al. Selective anti-inflammatory action of interleukin-11 in murine Lyme disease: arthritis decreases while carditis persists. *J. Infect. Dis.* 1999;179(3):734–37

23. Elshabrawy HA, Volin MV, Essani AB, et al. IL-11 facilitates a novel connection between RA joint fibroblasts and endothelial cells. *Angiogenesis*.2018; 21(2):215–28
24. Kuo D, Ding J, Cohn IS, et al. HBEGF+ macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness. *Sci. Transl. Med.* 2019; 11(491): 85-87.
25. Luan C, Zhang HW, Song DG, Xie YG, Feng J, Wang YZ. Expressing antimicrobial peptide cathelicidin-BF in *Bacillus subtilis* using SUMO technology. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(8):3651-8.
26. Rashidi M R, Moghbeli M. Construction of an expression shuttle vector for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. microbial word.* 2013, 3(16), 188-197. [In Persian]
27. Martinez M. A, Dezar C, Baigori M, Sineriz F. Simple method for plasmid mediated transformation of different *Bacillus* species. *Biotech. Tech.*1999; 13(5):337-340.
28. Tepler I, Elias L, Smith JW, et al. A randomized placebo-controlled trial of recombinant human interleukin- 11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy. *Blood.*, 1996, (87): 3607- 3614.
29. Hirayama F, Katayama N, Neben S, Donaldson D, Nickbarg EB, Clark SC, et al. Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood.* 1994; 83(1):8-92
30. Liu N-W, Huang X, Liu S, et al. Elevated BNP caused by recombinant human interleukin-11 treatment in patients with chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Supp. Care Cancer.* 2019;27(11):4293– 98.
31. Miao J, Wang J, Peng S, Tang P, Zou M, Duan J, Zhao C, Ma X. Expression of human interleukin-11 cDNA in *E. coli*. 1995;38(10):1202-9.
32. Tan H, Dan G, Gong H, Cao L. Purification and characterization of recombinant truncated human interleukin-11 expressed as fusion protein in *Escherichia coli*. *Biotech. letters.* 2005; 27(13): 905-910.
33. Hosseinian H, Borzamin B. L- asparaginase enzyme gene cloning research and evaluation in *Bacillus subtilis*. *Cell.Mol. Biotech. News* .2014; 4(16), 61-66[In Persian].
34. Sadeghi A, Mahdieh M, Salimi S. Production of Recombinant Human Interleukin-11 (IL-11) in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *J. Plant Biotech.*2016;43(4):432-437.
35. Farajnia S, Hasanpour R, Lotfipour F. Cloning and expression of human IL-11 in *E. coli* . *Pharma.Sci.* 2010, 15(4), 353- 359