مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 41-عدد 2 (2025): 112- 128

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 41 No.2 (2025): 112 -128

تحضير أربع بُنى مأشوبة باستعمال حامل pLEXSY والجين المُرمزة لعامل النمو الشبيه بالإنسولين من النمط الأول IGF-I

فراس باسل سقا أميني*[1]، شادي الياس سكرية[2]

[1] طالب ماجستير، قسم علم الحياة الحيوانية، جامعة دمشق
feras.skkaameny@damascusuniversity.edu.sy
[2] أستاذ مساعد في قسم علم الحياة الحيوانية، جامعة دمشق – الاختصاص الدقيق: علم الجنين الجزيئي
chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

يضبط عامل النمو الشبيه بالأنسولين من النمط الأول **IGF1**، وهو بروتين صغير ينتجه الكبد، حادثات خلوية عديدة تضمن النمو الصحيح لأعضاء الجسم وللجسم بشكل عام. تتنوع الأعراض الناتجة عن عوز هذا البروتين بدءاً من اضطرابات النمو حتى القزامة. وتعالج جميع هذه الأعراض معالجة معاوضة عن طريق اعطاء المرضى للشكل المأشوب من **IGF1** والذي ينتج عادة باستعمال البكتيريا. رغم الاستعمال الواسع لأنظمة الإنتاج البروتينية المعتمدة على البكتريا إلى أن لها العديد من المساوئ. يتغلب نظام جديد لإنتاج البروتينات المأشوبة على معظم هذه المساوئ وهو نظام **LEXSY** الذي يعتمد على استعمال الليشمانيا بدل البكتريا لإنتاج البروتينات. تتميز الليشمانيا بإنتاج بروتينات بأشكالها المماثلة للأشكال الطبيعية من خلال قدرتها على الطي الصحيح للبروتين وعلى انجازها لتعديلات بعد الترجمة. تم في هذا العمل استعمال الحامل **pLEXSY** لتنسيل الجين المُرمزة لِـ **IGF1** البشري بشكلين إما وحده أو مدمجاً مع البروتين المتألق الأخضر **GFP**، وبطريقتين تضمن الأولى إنتاجه ضمن الخلايا بينما تضمن الثانية إفرازه إلى وسط الزرع. تعد هذه هي المرة الأولى التي تنتج فيها هذه البنى بهدف إنتاج البروتين بشكل مؤشب في نظام جديد يتجاوز صعوبات إنتاجه في البكتريا.

الكلمات المفتاحية: حامل **pLEXSY**، **IGF-I**، البروتين المتألق الأخضر، التنسيل، الليشمانيا، أنزيمات التقييد

تاريخ الإيداع: 2023/12/12
تاريخ الموافقة: 2024/01/21

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Preparation of four recombinant constructions using pLEXSY vector and Insulin-like Growth Factor I gene

Feras Basel Skka Ameny[1], Chadi Elias Soukkarieh[2]

[1]Master´s Student, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.
feras.skkaameny@damascusuniversity.edu.sy
[2]Assistant Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria. Specialty: Developmental Biology
chadi.soukkarieh@damascusuniversity.edu.sy

Abstract:

Insulin-like growth factor IGF1, a small protein produced by the liver, regulates many cellular events that ensure the correct growth of the body's organs and the body in general. Symptoms resulting from a deficiency of this protein vary from growth disorders to dwarfism. All of these symptoms are treated with replacement therapy by giving patients a recombinant form of IGF1, which is usually produced using bacteria. Despite the widespread use of bacterial-based protein production systems, they have several disadvantages. A new system for producing recombinant proteins overcomes most of these disadvantages. It is the LEXSY system, which relies on using Leishmania instead of bacteria to produce proteins. Leishmania is characterized by producing proteins in shapes similar to natural ones through its ability to properly fold the protein and to carry out post-translational modifications. In this work, the pLEXSY vector was used to clone the gene encoding human IGF1 in two forms, either alone or combined with the green fluorescent protein GFP, and in two ways, the first of which ensures its production within cells while the second ensures its secretion into the culture medium. This is the first time that these structures have been produced with the aim of recombinant protein production in a new system that overcomes the difficulties of producing it in bacteria.

Received :2023/12/12
Accepted:2024/01/21

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Key words: pLEXSY vector, IGF-I, GFP, cloning, Leishmania, Restriction enzymes

1. المقدمة:

ينتج عامل النمو الشبيه بالأنسولين من النمط الأول **Insulin-like Growth Factor I (IGF1)** من قبل خلايا الكبد تحت تأثير هرمون النمو **Growth Hormone (GH)**، وهو بروتين صغير الكتلة الجزيئية النسبية يتميز بوجود ثلاث روابط كبريتية تساعد في الحفاظ على بنيته الفراغية. يحفز **IGF1** نمو الجسم بشكلٍ عام **Systemic body growth** من خلال أثره المحرض للنمو **Growth-promoting effect** على جميع خلايا الجسم تقريباً، والذي يمارسه عن طريق ارتباطه بمستقبله النوعي (أو ما يعرف بالـ **IGF1 Receptor** واختصاراً **IGF1-R**). ينظم **IGF1** استقلاب كلاً من الكربوهيدرات، عن طريق أثره المشابه للأنسولين **Insulin-like effect**، والدسم والبروتينات ويتشارك بهذا الأثر في كثير من الأحيان مع هُرمونات أخرى كهرمون النمو والأنسولين (**Zapf and Froesch, 1986**).

تؤدي حالات نقص تراكيز **IGF1** عن التراكيز الطبيعية إلى حدوث أمراض عدة، فمثلاً يؤدي عوز **IGF1** الأولي الحاد **Severe primary IGF1 deficiency** واختصاراً **IGFD** إلى خلل واضح في نمو الجسم وأعضاءه بشكل عام، قد يصل الخلل إلى فشل النمو **Growth failure** وحدوث أنماط مختلفة من القزامة. يمكن لِ **IGFD** أن ينتج عن حالة مرضية تُعرف بمتلازمة لارون **Laron syndrome**، وتعود جميع أعراض هذه المتلازمة إلى انخفاض مستوى **IGF1** في مصل الأفراد المصابين بها عن مستواه الطبيعي نتيجة عدد من الطفرات التي تصيب الجين المُرمزة لمستقبل هرمون النمو، وتُوصّف هذه الحالة بعدم الحساسية لهرمون النمو **Growth hormone insensitivity**. كما يمكن لِ **IGFD** أن ينتج عن حالة مرضية مشابهة بأعراضها لمتلازمة لارون تتمثل أيضاً بانخفاض إنتاج **IGF1** من قبل خلايا الكبد ولكن بنتيجة عوز هرمون النمو نفسه. تعالج جميع حالات **IGFD** معالجة معاوضة بإعطاء **IGF1** من مصدر خارجي. كما أشارت الدراسات إلى أن **IGF1** على علاقة بالعديد من الأمراض مثل التصلب اللويحي، وإلى أنه يمكن التخفيف من أعراض هذه الأمراض الخطيرة عن طريق إعطاء المرضى جرعات من **IGF1** (**Carel *et al*., 1996; Chesik *et al*., 2007**). يستعمل في علاج أنماط **IGFD** وفي علاج بعض الأمراض الأخرى الدواء الحيوي الذي يُعرف باسم **Mecasermin** ويسوق تحت اسم تجاري يعرف بالِ **Increlex**، وهو شكلٌ مؤشبٌ من **IGF1** البشري **Recombinant form of human IGF1**، والذي تنتجه حالياً أحد أهم أنظمة إنتاج البروتينات المؤشبة الدوائية وهي البكتيريا (**Joly *et al*., 1998**).

نظراً للأهمية الطبية لهذا الهرمون فقد تمت بداية العديد من المحاولات لإنتاجه باستعمال أنظمة إنتاج مختلفة من بدائيات وحقيقيات النوى. وأخيراً اعتمدت خلايا البكتيريا من النوع ***Escherichia coli*** لإنتاجه بهدف تسويقه كدواء حيوي (**Joly *et al*., 1998**)، وذلك على الرغم من الصعوبات العديدة التي تواجه إنتاجه ضمن هذا النظام فبالرغم من الكميات الكبيرة التي يمكن الحصول عليها بالاعتماد على التكاثر السريع للبكتريا في الأوساط السائلة **Liquid media** إلا أن الحصول على كميات كبيرة من الشكل الوظيفي الفعّال لهذا الهرمون بما يزال بعيد المنال، إذ أن معظم الكميات المُنتجة بهذه الطريقة تكون غير فعّالة وظيفياً نتيجة الطي غير الصحيح للبروتين ونتيجةً لعدم تشكل الروابط الكبريتية الداعمة للبنية الفراغية بشكلٍ سليم (**Joly *et al*., 1998**). كما بينت الأبحاث أن هناك مشاكلٌ أخرى في إنتاج هذا البروتين ضمن البكتريا على علاقة بحجمه الصغير نتيجة كتلته الجزيئية المنخفضة وعلى علاقة بإنتاجه بشكلٍ منحل إذ أن الكم الأعظم من هذا البروتين ينتج بشكل غير منحل ضمن الأجسام الضمية مما يزيد عدد الخطوات اللازمة لتنقيته ويرفع من كلفة إنتاجه (**Samuelsson *et al*., 1994**).

عملت أبحاث أخرى على إنتاجه في خلايا الثدييات بشكل خاص الخلايا البشرية من النمط **HEK293** (وهي خلايا مشتقة من كلية جنين بشري **Human Embryonic Kidney**) (**Carel *et al*., 1996; Chesik *et al*., 2007**)، استطاعت أن تتوصل إلى رفع نسبة الشكل

الفعّال بيولوجياً من الهرمون بالنسبة للكمية الكلية المنتجة من البروتين بينما كانت حصيلة الإنتاج بالمجمل منخفضة بالمقارنة مع حصيلة إنتاجه ضمن البكتيريا (**Consortium, 2008**).

يُعد نظام **LEXSY** (**Leishmania expression system**) واحداً من أهم وأحدث أنظمة إنتاج البروتينات ضمن خلايا حقيقيات النوى، والذي يعتمد على استعمال أحد أنواع وحيدات الخلية الحيوانية **Protozoa** من جنس الليشمانيا (**Attarpour Yazdi *et al*., 2018**). يمتاز هذا النظام الجديد بجمعه لميزات إنتاج البروتينات في البكتريا من الزراعة في وسط معلق والتكاثر السريع والإنتاجية المرتفعة وميزات الإنتاج في الخلايا حقيقيات النوى من طي **Folding** البروتينات بالشكل الصحيح وإعطاءها بنية ثلاثية الأبعاد وظيفية، بالإضافة إلى إجراء التعديلات بعد الترجمة **Post-translational modifications** للبروتينات المنتجة بشكلٍ مشابهٍ لحد بعيد لخلايا الثدييات (**Niimi, 2012**). يستعمل حامل **pLEXSY** لتحوير الليشمانيا إذ يحوي عناصر تسمح له بإدخال الجين الهدفية بالإضافة إلى إحدى واسمات الانتقاء ضمن جينوم الليشمانيا وفق مبدأ التأشيب المتماثل **Homologous recombination** (**Alhrak and Soukkarieh, 2023**). يحوي الحامل تسلسل إشارة يجعل البروتين الناتج مفرزاً، وبحسب استراتيجية التنسيل ضمنه يمكن للبروتين الهدف أن ينتج إما بشكل داخل خلوي **intracellular** وإما بشكل مُفرز **secreted** (**Luginina et al., 2023**). كما يتميز الحامل باحتوائه على تسلسل سداسي الهيستيدين يدمج مع البروتين المنتج من النهاية الكربوكسيلية مما يسهل عملية تنقيته بوساطة كروماتوغرافيا الإلفة المعدنية باستعمال أعمدة مثبت على طورها الساكن شوارد النيكل (**Souza *et al*., 2017**). تم في هذا العمل استعمال نظام **LEXSY** لتحضير أربع بنى مؤشبة تحوي الجين المُرمزة لـِ **IGF1** البشري إما وحدها أو مدمجةً مع البروتين المتألق الأخضر **green fluorescent protein** الذي يُعرف اختصاراً بالـ**GFP**، تستطيع هذه البنى إنتاج بروتينين مؤشبين بطريقتين مختلفتين: الأولى الإنتاج داخل الخلايا والثانية الإفراز إلى وسط الزرع.

2. المواد والطرائق:

تضخيم تسلسل الجين المُرمزة لـِ IGF1 باستعمال التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR):

تم تضخيم التسلسل المُرمز لجين **IGF1** البشري ابتداءً من بنية بلاسميدية هي **pRSET-IGF1** (محضرة في دراسة سابقة). استخدم أنزيم البلمرة عالي الموثوقية**PFU High fidelity DNA polymerase** الذي يتمتع بفعالية إعادة القراءة **proofreading** مما يضمن عدم ارتكابه للأخطاء، وشفع من المُرئسات الأماميّة **pRSET-to-Lexy–F**، والعكسيّة **pRSET-to-Lexy–R** الموضّحة تسلسلها في (الجدول 1)، تتميز المرئسات باحتوائها على تسلسلات لمواقع تقييد تضمن ادخال الجين الهدف المضخمة ضمن حامل **pLEXY**، حيث تم استخدام المواد المذكورة في (الجدول 2) لإتمام التفاعل. تمّ استخدام جهاز المدور الحراري **(BIOER – PCR thermoscycler LifeECO)** وفقاً لبرنامج التضخيم الحراري المُوضح في (الجدول 3). أتبع تفاعل الـ**PCR** بالرحلان الكهربائي التحليلي على هلامة الأغاروز للتأكد من إيجابية التفاعل.

الجدول 1: أسماء وتسلسل المرئسات المستخدمة في تفاعل الـ PCR والمصممة باستعمال برمجيات المعلوماتية الحيوية

Cloning Primers مُرئسات التنسيل	
pRSET-to-Lexy–F	NcoI, XbaI ATATCCATGGGTCTAGACCATCATCATCATCATCATGGTATGGCA
pRSET-to-Lexy–R	KpnI ATATGGTACCTTAAGCTAGCTTTGTTAGCAGCCGGATC

الجدول 2: المواد التي تم استعمالها في تفاعل الـ PCR

المواد Reagent مع التراكيز البدائية	الحجوم	التراكيز النهائية
DNA (بلاسميد pRSET المُنسل به الجين المُرمزة للـ IGF1 البشري)	2 µl	100 ng
أنزيم بوليميراز (Thermo) Pfu DNA polymerase-HF (2.5U/µl)	1 µl	2.5 U
المرئسة الأمامية pRSET-to-Lexy–F (10µM)	1 µl	0.5 µM
المرئسة العكسية pRSET-to-Lexy–R (10µM)	1 µl	0.5 µM
دارئة مضاف لها كلوريد المغنزيوم (Thermo) $MgCl_2$ buffer (10X)	5 µl	1 X
نكليوتيدات حرة (Thermo) dNTPs (10mM)	1 µl	0.2 mMلكل نكليوتيد
ماء مقطر معقم لإتمام الحجم إلى الحجم النهائي	39 µl	
الحجم النهائي للتفاعل	50 µl	

الجدول 3: برنامج التضخيم الحراري لتفاعل الـ PCR

الخطوة Step	درجة الحرارة Temperature	الوقت Time	عدد الدورات Number of cycles
فك التشافع البدائي Initial Denaturation	94 ºC	5 min	1 دورة
Denaturation فك التشافع	94 ºC	30 sec	35 دورة
Annealing ارتباط المرئسات	55 ºC	30 sec	
Extension الاستطالة	72 ºC	2.40 min	
Final Extension الاستطالة الأخيرة	72 ºC	5 min	1 دورة

الرحلان الكهربائي باستخدام هُلام الأغاروز Agarose gel-electrophoresis:

حُضّر هلام الأغاروز بتركيز 1.5% من خلال إذابة **1.5 g** من مسحوق الأغاروز **(GeneDireX®,USA)** في **100 ml** من دارئة **TAE** بتركيز **0.5 X** وتسخين المزيج حتى الغليان والذوبان التام لمسحوق الأغاروز. ترك المزيج ليبرد في حرارة الغرفة لتصل حرارته إلى نحو **60 ºC** ثمّ صب في قالب الرحلان مع الانتباه لعدم تشكّل الفقاعات، أضيف الأثيديوم برومايد **Ethidium Bromide** بتركيز نهائي قدره **5 µg/µl**. وُضع الهلام بعد التبلمر ضمن مكانه المخصص في جهاز الرحلان **(Cosmo bio)** وغمر بالدرائة **TAE** بتركيز **0.5 X**. حُضرت العينات عن طريق إضافة **1 µl** من دارئة تحميل **6 X** لكل **5 µl** من عينة **DNA** حمّلت في آبار الهلام، وحُمّل في أول بئر من الهلام واسم عياري بحسب العينة المرحلة إما **DNA Ladder 1 kb** أو **DNA Ladder 100bp (Vivantis, Malaysia)**. شُغّل جهاز الرحلان على فولطية ثابتة وقدرها **120 V** لمدة **25** دقيقة، وقرأت النتيجة باستخدام منبع الأشعة فوق البنفسجية الخاص بجهاز موثق الهلام.

تهيئة البكتيريا وتحويرها جينياً بـ الحامل pLEXY بهدف إكثار نسخ pLEXY:

استنبت البكتيريا ***E. coli* top10** في **3ml** من وسط زرع **LB medium** وحُضن هذا المُستنبت البكتيري في أنبوب **15 ml** عقيم في الحاضنة الرجاجة بالدرجة **37 ºC** ليلة كاملة لمدة 12–16 ساعة. نُقل **1.5 ml** من المُستنبت البكتيري وأضيف إلى **50 ml** من وسط زرع **LB** وحُضن بدرجة حرارة **37 ºC** في الحاضنة الرجاجة لمدة ساعة واحدة حتى تُصبح الكثافة الضوئية **$O.D_{600nm}$ =0.4** تقريباً. حضن المُستنبت البكتيري بعدها في الثلج لمدة **20** دقيقة بهدف إيقاف انقسامها وثبات العدد. ثُفل المُستنبت البكتيري بمُثفلة مُبردة

بالسرعة **4000 rpm** لمدة **10** دقائق عند درجة حرارة **4 ºC**. تم التخلص من الطافي وعلّق الراسب بـ **20 ml** من محلول بارد من $CaCl_2$ بتركيز **0.1 M** وحضن المزيج في الثلج لمدة **30** دقيقة. ثُفل المزيج بمُثفلة مُبردة بسرعة **4000 rpm** لمدة **10** دقائق عند درجة حرارة **4 ºC** ورمي الطافي. عُلق الراسب بـ **5 ml** من محلول الغليسرول **15%/ 0.1M** $CaCl_2$ البارد. وُزعت الخلايا البكتيرية المُهيئة للتحوير في أنابيب صغيرة **1.5 ml** وحُفظ الفائض عن الحاجة في **-80 ºC** لحين الاستخدام.

تحوير *E. coli* top10 جينياً بـ الحامل pLEXY:

أُضيف **60 ng** بحجم **4 µl** من البلاسميد **pLEXY** إلى أنبوب يحوي **100 µl** من ***E. coli* top10** المهيئة ووُضع الأنبوب في الثلج عند درجة حرارة **4 ºC** لمدة **30** دقيقة. حُضن الأنبوب بعدها مباشرة بدرجة حرارة **42 ºC** لمدة **45** ثانية. وضع الأنبوب في الثلج عند درجة حرارة **4 ºC** لمدة دقيقتين. أضيف **1 ml** من وسط الزرع **LB** إلى المزيج وحُضن في الحاضنة الرجاجة بالدرجة **37 ºC** لمدة ساعة واحدة. ثُفلّ المزيج بمُثفلة مُبردة بسرعة **4000 rpm** لمدة 7 دقائق عند درجة حرارة **4 ºC** رُمي الطافي. فُرش **40–60 µl** من ناتج التحوير الجيني بعد تعليق الرسابة تقديرياً بـ **150 µl** من وسط الزرع على طبق أغار **LB agar** تحتوي الأمبيسللين بتركيز نهائي **100 µg/ml**، حُضن الطبق بعدها بشكل مقلوب في الحاضنة بدرجة الحرارة **37 ºC** لمدة ليلة كاملة (12–16) ساعة.

استخلاص الحامل pLEXY بالتحضير من نمط miniprep:

استخلص الحامل **pLEXY** من بكتريا ***E. coli* top10** المحوّرة جينياً بعد إكثاره فيها بطريقة التحضير **miniprep** باستعمال طاقم **GF-1 plasmid DNA extraction kit** من إنتاج شركة **(Vivantis)**. وذلك بعد استنبات مستعمرة مفردة محوّرة بالبلاسميد **pLEXY** في أنبوب **15 ml** يحوي **3 ml** من وسط زرع **LB** المضاف إليه **3 µl** من الأمبيسيللين بتركيز نهائي **100 µg/ml**، وحُضن الأنبوب في الحاضنة الرجاجة بالدرجة **37 ºC** ليلة كاملة لمدة 12–16 ساعة. ثُفل بعدها المُستنبت البكتيري بالسرعة **10.000 x g** لمدة 5 دقائق، وتم التّخلص من السائل الطافي. أعيد تعليق الرسابة البكتيرية بحجم قدره 250 **µl** من دارئة التعليق **S1** المضاف إليها 3 **µl** من أنزيم **RNase A** ذي التركيز **(10mg/ml)**، وتم مزجها جيداً بالماصّة، ثمّ يُنقل المزيج إلى أنبوب تثفيل **1.5 ml** واتبعت مراحل العمل بحسب تعليمات الشركة المصنعة للطاقم. تم التأكد من نجاح عملية الاستخلاص بالتحضير الصغير عن طريق الرحلان الكهربائي في هلام أغاروز 1%. تمّ قياس تركيز البلاسميد **pLEXY** بواسطة جهاز **Nanodrop Spectrophotometer** عند طول الموجة $\mathbf{O.D_{260nm}}$.

قطع كلّ من الجين المرمزة للبروتين الـ IGF1 والبلاسميد pLEXY بأنزيمات التقييد:

المواد المُستخدمة في هذه المرحلة:

–أنزيم التقييد **Nco I (20U/µl) (Biolabs, USA)**.

–أنزيم التقييد **Xba I (20U/µl) (Biolabs, USA)**.

–أنزيم التقييد **Kpn I (20U/µl) (Biolabs, USA)**.

–دارئة مناسبة لعمل أنزيمات القطع **Cut Smart buffer 10X (Biolabs)**.

مُزجت المواد الموضّحة في (الجدول 4) في أنبوب **1.5 ml** ووضع الأنبوب في الحاضنة بدرجة حرارة **37 ºC** لمُدة 15–30 دقيقة. أوقف تفاعل القطع بإضافة 10 **µl** من صباغ التحميل في الهلام **Gel loading dye** بتركيز **6 X** لكل **50 µl** حجم تفاعل قطع نهائي. تم التأكّد من نجاح تفاعل القطع عن طريق الرحلان الكهربائي ضمن هُلام أغاروز بتركيز 1%. تم اجراء تفاعل قطع آخر مماثل تماماً مع استبدال الأنزيم **Nco I** بالأنزيم **Xba I**.

الجدول 4: المواد المُستخدمة في تفاعلي القطع قطع كلّ من الجين المُرمزة للبروتين الـ IGF1 والبلاسميد pLEXY بأنزيمي التقييد Nco I و Kpn I

المواد Reagent	أنبوب تفاعل قطع IGF1		أنبوب تفاعل قطع IGF1-GFP		أنبوب تفاعل قطع البلاسميد pLEXY	
	الكميات	التراكيز النهائية	الكميات	التراكيز النهائية	الكميات	التراكيز النهائية
IGF1 (60ng/µl)	15 µl	900ng	ــــ	ــــ	ــــ	ــــ
pLEXY (310ng/µl)	ــــ	ــــ	ــــ	ــــ	6.5µl	2010ng
IGF1-GFP (75ng/µl)	ــــ	ــــ	15 µl	1125ng	ــــ	ــــ
أنزيم التقييد Nco I (20U/µl)	1µl	20 U	1µl	20 U	1µl	20 U
أنزيم التقييد Kpn I (20U/µl)	1µl	20 U	1µl	20 U	1µl	20 U
دارئة Cut Smart buffer 10X	4 µl	1X	4 µl	1X	5µl	1X
ماء مقطر معقم لإتمام الحجم إلى الحجم النهائي	19 µl		19 µl		36.5 µl	
الحجم النهائي للتفاعل	40 µl		40 µl		50 µl	

تنقية ناتج تفاعل PCR (للجين المرمزة للبروتين الـ IGF1) وتنقية ناتج قطع البلاسميد pLEXY:

تم إجراء رحلان تحضيري للبلاسميد على هلامة من الاغاروز بتركيز **1%** وبتطبيق فولطية **100 V** ولمدة **45 min**، وقطع مكان وجود الشدفة المطلوبة على الاغاروز باستخدام مشرط حاد ونظيف بعد تعريض الهلامة لأشعة **UV**. وُزنت قطعة الأغاروز الحاوية على الشدفة المطلوبة وأضيف إليها كمية من دارئة حل الهلام التابعة لطاقم خاص بالتنقية من الهلام **(Gel extraction kit, Invitrogen)** بمعدل ثلاثة أضعاف الوزن الناتج عن القطع مقدراً بالميلي غرام وتوضع ضمن حمام مائي **50 ºC** لمدة **10 min** مع تقليب الأنبوب الحاوي على المزيج كل ثلاث دقائق، وعند اكتمال انحلال الهلام، تمت متابعة العمل وذلك وفق خطوات المنصوح بها من الشركة المصنعة. تم قياس تركيز البلاسميد الناتج وتحديد نقاوته باستعمال جهاز **Nanodrop** وحفظ بدرجة حرارة **-20 ºC**.

ادخال الجين المُرمزة للبروتين الـ IGF1 والبروتين المدمج IGF1-GFP إلى البلاسميد pLEXY:

المواد المُستخدمة في هذه المرحلة:

-أنزيم الربط **T4 DNA Ligase (5 U/µl)** مع دارئة مناسبة لعمله **10X (Thermo)**.

– **pLEXY (8475bp)** مقطوع بأنزيمي التقييد **Xba I، Kpn I (20.5ng/µl)**.

– **pLEXY (8396bp)** مقطوع بأنزيمي التقييد **Nco I، Kpn I (17.5ng/µl)**.

– جين **IGF1** مقطوعة بأنزيمي التقييد **Xba I، Kpn I (20ng/µl)**.

– جين **IGF1** مقطوعة بأنزيمي التقييد **Nco I، Kpn I (22ng/µl)**.

– جين **IGF1-GFP** مقطوعة بأنزيمي التقييد **Xba I، Kpn I (23ng/µl)**.

– جين **IGF1-GFP** مقطوعة بأنزيمي التقييد **Nco I، Kpn I (29ng/µl)**.

تم ادخال الجين المقطوعة إلى البلاسميد المقطوع في أربع تفاعلات ادخال وفق أنزيمات التقييد التي استعملت في تحضير البلاسميد والجين بهدف الحصول على أربع بنى. تم التوصل بعد تجارب عديدة هدفت إلى أمثلت شروط تفاعلات الربط إلى النسبة المولية 1 من البلاسميد إلى 20 من الجين، انطلاقاً من كمية ثابتة من البلاسميد في كل تفاعل وقدرها **50 ng**. كما استعمل حجم نهائي لكل تفاعل قدره **20 µl** و**5 U** وحدة أنزيمة من أنزيم الربط. حُضنت التفاعلات بدرجة حرارة **22 ºC** لمدة ساعة، ثم تم إيقاف التفاعل بدرجة حرارة

65 ºC لمدة **15 min** ويوضـــح الجدول 5 تفاعلات الربط التي أُجريت. بعد ذلك أُجريت عملية التحوير البكتيري جينياً باتباع الخطوات المذكورة نفســـها فيما ســـبق مع اختلاف بســـيط هو التحوير بكمية قدرها **10 µl** من تفاعل الربط مع الكمية ذاتها من البكتريا المهيئة، إضـــافة إلى ذلك حورت البكتريا بعدة بنى كشـواهد سـلبية (بلاسـميد **pLEXSY** مقطوع + أنزيم الربط) وإيجابية (بلاسـميد **pLEXSY** غير مقطوع) بالإضـــافة إلى زرع بكتريا ***E. coli* TOP10** مهيئة وغير محورة للتأكد من عدم حدوث أي تلوث. لم يتم التطرق إلى هذه الشواهد في النتائج.

التحقق من نجاح التنسيل باستعمال تقانة **Colony PCR**:

تعتمد هذه التقانة على إجراء عدة تفاعلات **PCR** لعدد من المستعمرات، يتم فيها تضخيم التسلسل الهدف المُنسّل ضمن البلاسميد، وبذلك باستعمال المرئسات النوعية للتسلسل الهدف، ويتم فيها مسح مستعمرات مفردة كل منها على حدة، ثم يتم تعليق خلاياها ضمن **10 µl** ماء مقطر وتمزج جيداً، ثم يؤخذ **5 µl** منها وتوضع بشكل قطرة على طبق مرجعي ويتم ترقيم الأنبوب والمستعمرة على الطبق المرجعي بالرقم نفسه، بعد ذلك يُحضن الطبق المرجعي في الدرجة **37 ºC**، ويضاف إلى **5 µl** المتبقية المُكونات الرئيسية لتفاعل **PCR** والمرئسات النوعية التي ضُخمت بها الجين الهدف وفقاً للكميات المبينة في الجدول 5 للكشف عن التسلسل الهدف، ثم تُوضع ضمن جهاز المدور الحراري. وبعد انتهاء تفاعل **PCR** تم ترحيل العينات على هلامة من الأغاروز **1%**.

الجدول 5: مكونات تفاعل PCR على المستعمرات والبرنامج الذي تم تطبيقه

المواد	التراكيز/الحجوم النهائية		البرنامج	درجة الحرارة	الزمن
MasterMix 2X	25 µl/1X		البداية	95 ºC	5 min
F/Primer 10 µM	0.5 µM	35 دورة	التمسخ Denaturation	95 ºC	30 s
R/Primer 10 µM	0.5 µM		التشافع Annealing	63 ºC	30 s
معلق الخلايا المستعمرة	5 µl		الاستطالة Extension	72 ºC	1 min
ماء مقطر معقم لتكملة الحجم إلى الحجم النهائي			نهاية الاستطالة	72 ºC	7 min
الحجم النهائي	50 µl				

قطع البنى البلاسميدية بإنزيمات القطع:

تم عزل البنى البلاسميدية من المستعمرات الإيجابية بإجراء تفاعلات التحضير من نمط **Maxiprep (Thermo)**، وهُضمت بأنزيمات التقييد التي استعملت للتنسل وبنفس الشروط السابقة، ومن ثم أُجري رحلان كهربائي للتفاعلات على هلامة من الأغاروز بتركيز **1%**.

التحقق من صحة البنى المأشوبة باستخدام تقانة السلسلة:

تم إجراء تفاعلات السلسلة للبنى المأشوبة في شركة **Macrogen** الكورية باستعمال مرئسات البلاسميد المبينة في الجدول 6، وذلك باستعمال جهاز السلسلة **(ABI 3730xl System)**، وقورِنَت النتائج مع تسلسلات الجين الهدف المرجعية المتوفرة في البنوك الجينية وذلك باستعمال تطبيق الرصف **Alignment Application** لبرمجية المعلوماتية الحيوية **BLAST** بهدف التأكد من عدم وجود روامز توقف مبكرة أو من عدم انزياح إطار القراءة.

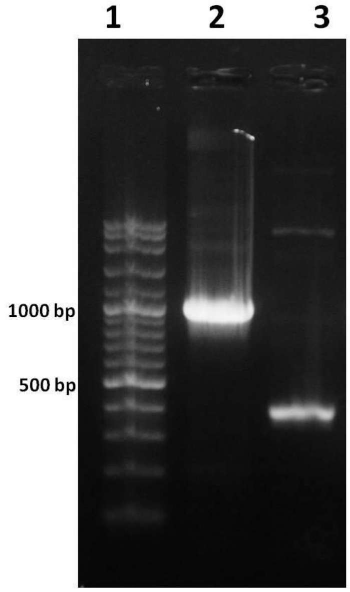
الجدول 6: اسماء والتسلسلات النكليوتيدية للمرئسات الخاصة بالبلاسميد والمستعملة في تفاعل السلسلة

اسم المرئسة	التسلسل النكليوتيدي
P1442/ forward	’5−CCGACTGCAACAAGGTGTAG-3’
A264/ reverse	’5−CATCTATAGAGAAGTACACGTAAAAG-3’

النتائج:

تضخيم التسلسل الهدف باستعمال التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR):

ضُخمت الجين المُرمزة للبروتين **IGF1** البشري وتلك المُرمزة للبروتين المُدمج **GFP-IGF1** من البنيتين البلاسميديتين **pRSET-TEV-IGF1** و**pRSET GFP-TEV-IGF1** على التوالي باستعمال الـ**PCR** وشفع من المُرئسات النوعية التي تَسمح بإدخال الجينتين ضمن الحامل البلاسميدي **pLexsy-neo2.1**، ورُحلت النواتج على هلامة من الأغاروز ويظهر الشكل (1) الشدف المضخمة بالطول المطلوب.

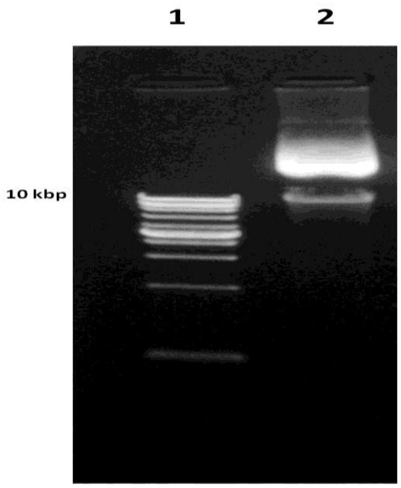


الشكل 1: صورة هلامة الرحلان الكهربائي لنواتج تضخيم الجينتين الهدفيتين

المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2: ناتج تضخيم الجين المُرمّزة للبروتين المدمج GFP -IGF1 بطول 1000bp تقريباً. المسار 3: الجين المُرمزة للبروتين IGF1 بطول 400bp تقريباً، حددت أطوال الشدف بالمقارنة مع عصائب السلم المعياري

اكثار البلاسميد pLexsy-neo2.1 باستعمال التحضير miniprep:

حُورت بكتيريا مُهيئة من السلالة ***E. coli*** **Top10** جينياً بوساطة البلاسميد **pLexsy-neo2.1** وبعد استنباتها ضمن وسط سائل **LB Broth** استخلص البلاسميد عن طريق التحضير الوسيط. حُسب تركيز البلاسميد الناتج فتبين أنه 200 **ng/µl**، ورُحلت كمية قدرها 4 **µl** على هلامة من الأغاروز لتحقق من جودة الاستخلاص، ويظهر الشكل (2) عصائب الأشكال الثلاثة؛ الشكل الحلقي **circular** والشكل الملتف **coiled** والشكل عالي الالتفاف **supercoiled** من البلاسميد عند الأطوال المتوقعة مما يؤكد سلامة التحضير.

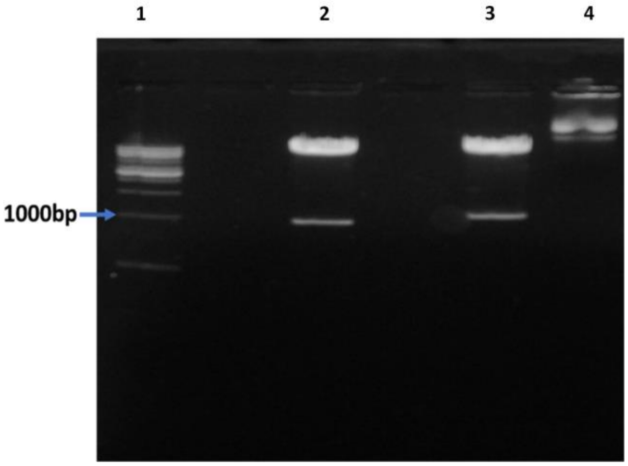


الشكل 2: صورة هُلامة الرحلان الكهربائي لناتج التحضير الوسيط للبلاسميد plexsy-neo2.1

المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2: الأشكال الثلاث للبلاسميد pLexsy-neo2.1 بعد التحضير الوسيط وهذه الأشكال هي الشكل الحلقي والشكل الملتف والشكل عالي الالتفاف وذلك ابتداءً من أعلى الهلامة

قطع البلاسميد pLexsy -neo2.1 بأنزيمات القطع تحضيراً لعملية التأشيب:

قطع البلاسميد **pLexsy-neo2.1** قطعاً مزدوجاً في تفاعلين منفصلين، الأول باستخدام أنزيمي التقييد **XbaI** و**KpnI** والثاني باستخدام الأنزيمين **NcoI** و**KpnI**. تم التأكد بالرحلان التحليلي من قطع كامل كمية البلاسميد الشكل (3)، ومن ثم أتبع العمل بإجراء رحلان تحضيري لتنقية الشدف التي تمثل البلاسميد بدون "الحشوة" **stuffer** من الهلام، الأولى بطول **8475 bp** عند القطعباستعمال الأنزيمين **XbaI** و**KpnI** والثانية بطول **8396 bp** عند القطعباستعمال الأنزيمين **NcoI** و**KpnI**. ويُعزي الاختلاف بأطوال الشدف إلى المحافظة على التسلسل الإشاري الذي يجعل البروتين المنتج مفرزاً بعد عملية القطع أو التخلص منه. حُسب تركيز الشدفتين باستخدام جهاز **Nanodrop**، فكان تركيز الشدفة الأولى **20 ng/µl** والثانية **17.5 ng/µl**.



الشكل 3: صورة هُلامة الرحلان الكهربائي لناتج قطعللبلاسميد pLexsy -neo2.1

المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2: ناتج قطع البلاسميد pLexsy -neo2.1 بوساطة الأنزيمين XbaI و KpnI المسار (طول الشدفة المطلوبة 8475bp وطول الشدفة المتبقية من البلاسميد 994bp). المسار 3: ناتج قطع البلاسميد pLexsy -neo2.1 بوساطة الأنزيمين NcoI وKpnI (طول الشدفة المطلوبة 8396bp وطول الشدفة المتبقية من البلاسميد 1073bp). المسار 4: البلاسميد غير المهضوم رُحل كشاهد.

قطع ناتج تفاعل الـ PCR بأنزيمات التقييد المناسبة تحضيراً لعملية التأشيب:

قُطع ناتج الـ **PCR** للجين المُرمزة للبروتين **IGF1** بتفاعلين منفصلين الأول باستعمال الأنزيمين **XbaI** و**KpnI** والثاني باستعمال الأنزيمين **NcoI** و**KpnI**، كذلك قطع ناتج الـ**PCR** للجين المُرمزة للبروتين المُدمج **IGF1-GFP** بتفاعلين منفصلين الأول باستعمال الأنزيمين **XbaI** و**KpnI** والثاني باستعمال الأنزيمين **NcoI** و**KpnI**، وبعدها نُقيت الشدف من النكليوتيدات الحرة والشدف الصغيرة باستخدام طاقم **clean up** ومن ثم حُسبت التراكيز باستعمال جهاز **Nanodrop** فكانت على النحو التالي:

IGF1 (KpnI-NcoI) =22 ng/µl   **IGF1 (KpnI-XbaI) =20 ng/µl**

IGF1-GFP (KpnI-NcoI) =29 ng/µl   **IGF1-GFP (KpnI-XbaI) =23 ng/µl**

تحضير الحوامل المأشوبة:

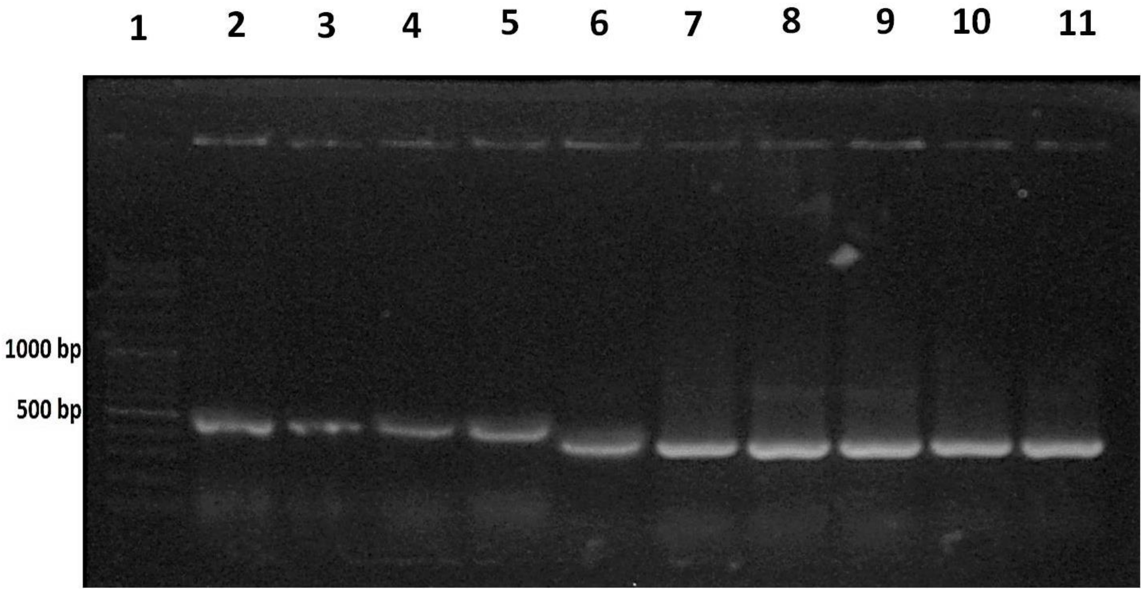
بعد الحصول على شكلين من الحوامل مقطوعين بطريقتين مختلفتين، يسمح الشكل الأول الذي تم فيه الاحتفاظ بالتسلسل الإشاري الخاص بالإفراز، بإنتاج البروتين مُفرزاً وبينما يسمح الشكل الثاني الذي أزيل منه التسلسل السابق بإنتاج البروتين داخل الخلايا، وبعد الحصول على الجينتين **IGF1** و**IGF1-GFP** مهضومتين وجاهزتين للربط، تم الربط بين هذه النواتج باستعمال أنزيم رابط للـ**DNA ligase DNA** للحصول على أربعة بنى وذلك على النحو التالي:

البنية الأولى	**pLEXSY (KpnI-XbaI) 8475 bp + IGF1(KpnI-XbaI)**
البنية الثانية	**pLEXSY (KpnI-NcoI) 8396 bp + IGF1(KpnI-NcoI)**
البنية الثالثة	**pLEXSY (KpnI-XbaI) 8475 bp + IGF1-GFP (KpnI-XbaI)**
البنية الرابعة	**pLEXSY (KpnI-NcoI) 8396 bp + IGF1-GFP (KpnI-NcoI)**

حورت بعدها خلايا سلالة من البكتريا جينياً بنواتج الربط ونُميت المستعمرات على أطباق **LB Agar** بوجود الأمبسلين، وبعد الحصول على المستعمرات، تم التحقق من نجاح حادثة الربط والحصول على البنى المأشوبة المطلوبة وفق عدة خطوات تضمنت تفاعل **PCR** على الخلايا الجرثومية المأخوذة من المستعمرة مباشرة (**colony PCR**) والقطع باستعمال أنزيمات التقييد المناسبة ومن ثم سلسلة البنى المأشوبة.

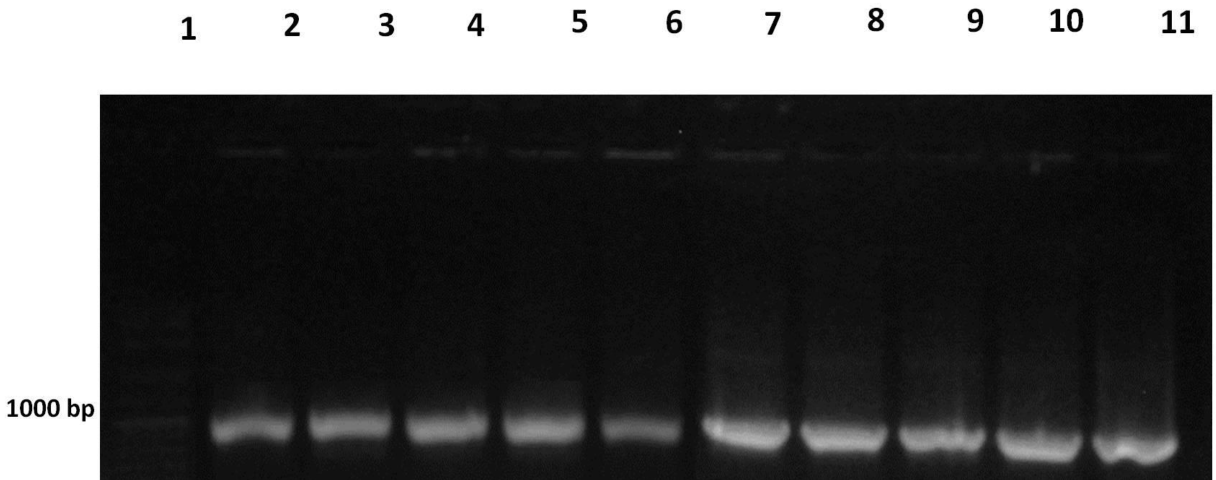
اختبار PCR على المستعمرة colony PCR:

تم اختيار خمس مستعمرات لكل بنية وذلك بشكل عشوائي من الأطباق المزروعة، حيث علقت خلايا كل مستعمرة بكمية قدرها **10 µl** من الماء ثنائي التقطير، أنجز تفاعل **PCR** على **5 µl** من المُعلق الخلوي باستعمال مرئسات تضخم الجين **IGF1** بالنسبة للبنيتين الحاويتين على هذه الجين وحدها وباستعمال مرئسات تضخم التسلسل **IGF1-GFP** بالنسبة للبنيتين الحاويتين على جين **GFP**. بينما أعيد استنبات الحجم المتبقي (**5 µl**) على طبق مرجعي مع تحديد هوية كل مستعمرة. بعد ترحيل نواتج تفاعلات **PCR**، تبين أن جميع المستعمرات تقريباً قد أعطت عصائب بالطول المطلوب كما هو موضح في الشكل (4) وفي الشكل (5)، أي أن النتائج كانت إيجابية بالمجمل.



الشكل 4: صورة الرحلان الكهربائي لنتائج اختبار PCR على المستعمرة colony PCR أنجز على البنيتين الأولى والثانية

المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار من 2 إلى 6: نتائج PCR المُنجز على المستعمرات الحاوية على البنية الأولى والمسار من 7 إلى 11: نتائج PCR المنجز على المستعمرات الحاوية على البنية الثانية. تظهر جميع المسارات عصابة بطول 400bp، وهي دليل احتواء البنى على الجين IGF1.

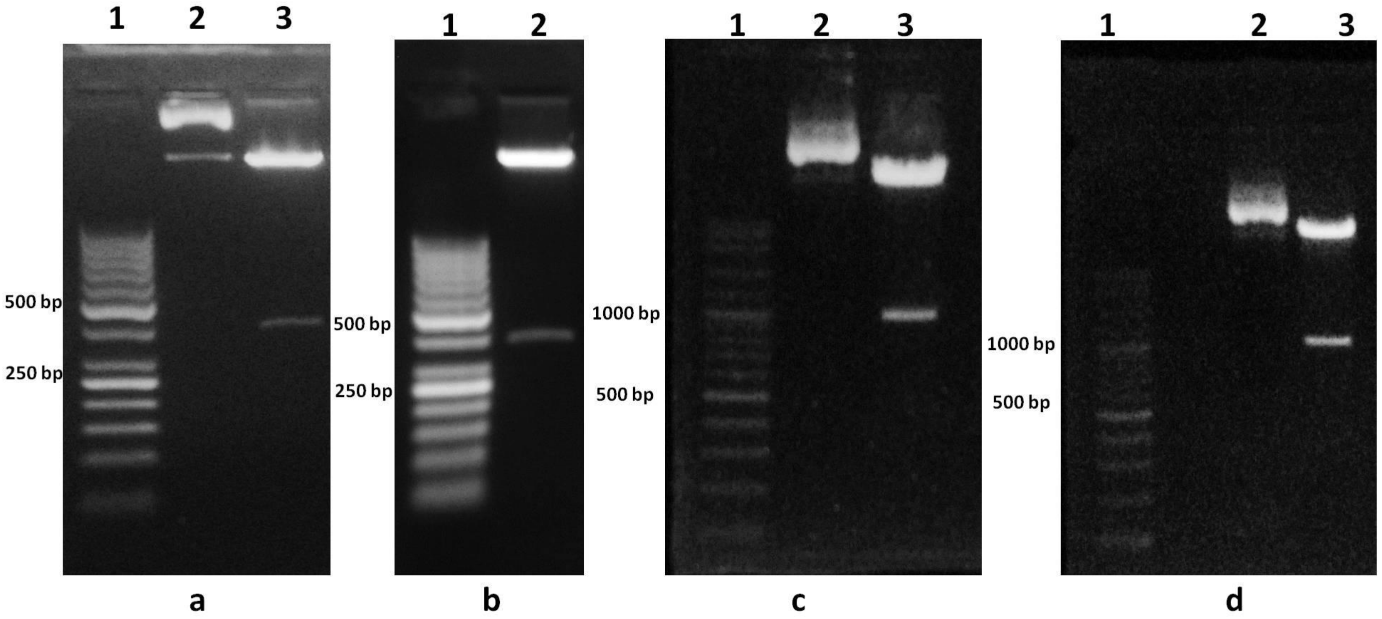


الشكل 5: صورة الرحلان الكهربائي لنتائج اختبار PCRعلى المستعمرة colony PCR أنجز على البنيتين الثالثة والرابعة

المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار من 2 إلى 6: نتائج PCR المُنجز على المستعمرات الحاوية على البنية الثالثة والمسار من 7 إلى 11: نتائج PCR المنجز على المستعمرات الحاوية على البنية الرابعة. تظهر جميع المسارات عصابة بطول 1000bp، وهي دليل احتواء البنى على الجين IGF1-GFP.

التأكد من الحصول على البنى المُؤشبة من خلال قطع بأنزيمات التقييد المناسبة:

ونظراً لأن نتائج اختبار **PCR** على المستعمرة تُعد أولية فقد أُكدت من خلال قطع بالبنى الناتجة بأنزيمات التقييد المناسبة، إذ تم اختيار عدة مستعمرات من الطبق المرجعي لكل بنية من البنى الأربعة لمتابعة العمل وذلك باستنباتها على وسط سائل ومن ثم نُقيت البنى منها بوساطة التحضير واحتسبت التراكيز بوساطة جهاز **Nanodrop**. قطعت كمية قدرها **200 ng** من كل بنية بنفس أنزيمات التقييد التي استعملت سابقاً لتحضير البنى، ورحلت النتائج على هلامة من الأغاروز، وقد أعطت بعض المستعمرات نتائج إيجابية وبعضها الآخر نتائج سلبية. يوضح الشكل (6) صورة الرحلان الكهربائي لأربع تفاعلات قطع تمثل النتائج الايجابية فقط، وهي بنى قد أعطت بعد قطعها بالأنزيمات المناسبة عصابة بطول **400 bp** تقريباً دليل احتواءها الجين **IGF1** أو عصابة بطول **1000 bp** دليل احتواءها الجين **IGF1-GFP**، وقد تمت متابعة العمل مع المستعمرات الحاوية على هذه البنى.



الشكل 6: صور تمثيلية للرحلان الكهربائي التحليلي للناتج الايجابية لتفاعلات قطع البنى الأربعة بذات الأنزيمات التي تم بواسطتها التنسيل

a: البنية الأولى. المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2: البنية غير المقطوعة. المسار 3: البنية المقطوعة بالأنزيمين XbaI وKpnI، وتظهر عصابة بطول 400bp تقريباً دليل ايجابية التفاعل. b: البنية الثانية. المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2: البنية المهضومة بالأنزيمين Nco I وKpnI، وتظهر عصابة بطول 400bp تقريباً دليل ايجابية التفاعل. c: البنية الثالثة. المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2: البنية غير المقطوعة. المسار 3: البنية المقطوعة بالأنزيمين XbaI وKpnI، وتظهر عصابة بطول 1000bp تقريباً دليل ايجابية التفاعل. d: البنية الرابعة. المسار 1: سلم DNA المعياري. المسار 2 البنية غير المقطوعة. المسار 3: البنية المهضومة بالأنزيمين Nco I وKpnI، وتظهر عصابة بطول 1000bp تقريباً دليل ايجابية التفاعل.

سلسلة Sequencing البُنى البلاسميدية المُؤشبة:

بعد التأكد من الحصول على البُنى الأربع من خلال أطوال الشدف الناتجة عن القطع بالأنزيمات التقييد، تمت عملية سلسلة البنى الأربعة إذ بينت النتائج تنسيل الجين بشكل صحيح وعدم وجود كودون توقف مبكر، كما أن مقارنة تسلسل البنى المُنسلة مع التسلسلات المتوفرة بالبنوك المرجعية باستعمال تطبيق الرصف من خوارزميات برمجيات المعلوماتية الحيوية أثبتت خلو التسلسل من الطفرات.

المناقشة:

حُضر في هذا العمل أربع بنى تحوي الجين المُرمزة لبروتين **IGF1** البشري إما وحدها أو مدمجة مع الجين المُرمزة للبروتين المتألق الأخضر، وتسمح هذه البنى بإنتاج البروتين الموافق باستعمال خلايا طفيلي الليشمانيا المزروعة في الزجاج بطريقتين مختلفتين. تضمن الطريقة الأولى إنتاج البروتين داخل الخلايا وبينما تضمن الطريقة الثانية إفرازه خارج الخلايا إلى وسط الزرع.

استعمل في هذا العمل حامل **pLEXSY** لتحضير البنى الأربعة، وهو حامل ثنائي الاستعمال بين البكتيريا والليشمانيا يحوي كل العناصر اللازمة لإكثاره ضمن البكتيريا، تم اكثاره بعد تحوير سلالة خاصة من ***E. coli*** جينياً وزرع الجراثيم المحورة على وسط صلب مغذي انتقائي يسمح بنمو الخلايا الجرثومية المحورة نتيجة احتواء الحامل على الجين المقاومة للصاد الحيوي الأمبسيللين، بعدها تم تنقية كميات كافية من الحامل بعد زرع المستعمرات على وسط سائل باستعمال طريقة التحضير الوسيط المعتمدة على إلفة **DNA** للسيلكا المشكلة لطور ساكن ضمن عمود كروماتوغرافية مكروي الحجم وذلك بهدف استعمالها في تجارب التنسيل. وبعد تنسل جين **IGF1** البشري ضمن الحامل، إما بمفدها أو مدمجة مع **GFP**، يمكن اعادة اكثاره من جديد كحامل مؤشب ضمن البكتيريا والحصول على كميات كبيرة منه لتجهيزه بشكل خطي وإدخاله ضمن الخلايا المضيفة بإحدى طرق التحوير الجيني. (**Bastos *et al*., 2017; Taheri *et al*., 2016**).

يتوافق هذا الحامل مع استعمال أحد أنظمة إنتاج البروتينات ضمن حقيقيات النوى. طور هذا النظام حديثاً وذلك بالاعتماد على أحد أنواع وحيدات الخلية الحيوانية **Protozoa** من جنس الليشمانيا وهو النوع ***Leishmania tarentolae*** (**Attarpour Yazdi *et al*., 2018**). ويتميز هذا النظام (**LEXSY**) بميزات كثيرة تجعله يتفوق على معظم أنظمة الإنتاج المتوفرة حالياً من بدائيات ومن حقيقيات النوى، ومن أهم هذه الميزات الإنتاجية المرتفعة للبروتين المؤشب بفضل النمو والتكاثر السريعين لهذا النوع من وحيدات الخلية في وسط معلق. كما أنه يعد سهل وآمن من حيث المنابلة **manipulation**، إذ يمكن زراعته بسهولة والتعامل معه بنفس طريقة التعامل مع سلالات البكتيريا غير المُمرضة وذلك بالمستوى الأول **level-1** لقواعد الأمان المخبري (**Attarpour Yazdi *et al*., 2018**). كما يمتاز نظام إنتاج البروتينات المؤشبة ضمن خلايا الليشمانيا بميزات الإنتاج في الخلايا حقيقيات النوى الأخرى، وخاصةً خلايا الثدييات، من حيث الطي بالشكل الصحيح للبروتينات المنتجة وبالتالي الحصول على بنية ثلاثية أبعاد صحيحة، وبالأخص إجراء التعديلات بعد الترجمة على هذه البروتينات. أثبتت الدراسات قدرة طفيليات الليشمانيا على اجراء مختلف أنماط تعديلات بعد الترجمة بشكلٍ مشابهٍ لحد بعيد لخلايا الثدييات، فهي تقوم بإضافة السكر إلى الزمر **N-glycosylation N** من البروتينات وإضافة لواحق الربط أو التثبت إلى الغشاء السيتوبلاسمي **glypiation** من نمط **GPI** (**Glycosylphosphatidylinositol**)، كما يمكن لخلايا الليشمانيا أن تنجز تفاعلات الفسفرة **phosphorylation** والأستلة **acetylation**، ويمكنها أن تعالج البروتين بالحل **proteolytic processing** لشطر أجزاء منه إذا كان الحصول على الشكل الوظيفي من البروتين يتطلب إزالة هذه الأجزاء، أو بشكل معاكس يمكن أن تجمع عديدات الببتيد معاً لتشكيل بروتين وظيفي متعدد القسيمات **oligomerisation**. ولعل إضافة السكر تقوم بها خلايا الليشمانيا بنفس الطريقة التي تنجزها خلايا الثدييات من أهم التعديلات بعد الترجمة التي تساعد في الطي الصحيح للبروتين وتحسن من استقراره وتؤمن له القيام بوظائفه، ففي كثير من الحالات يكون الشكل غير المطوي أو غير المضاف إليه السكر (المغلغز **glucolysed**) بالشكل الصحيح غير وظيفي (**Alhrak and Soukkarieh, 2023; de Oliveira *et al*., 2019**).

من ميزات نظام **LEXSY** الحصول على سلالات من طفيلي الليشمانيا المستنبتة ثابتة التعبير عن الجين الهدف كالجين موضوع البحث **IGF1** البشري، التمكن باستعمال البنى الأربع التي حضرت في هذا البحث من ادخال **IGF1** البشري وحده أو مدمجاً مع **GFP** ضمن جينوم الليشمانيا وفق مبدأ التأشيب المتماثل، الذي سيحدث داخل نوى الخلايا بعد تحويرها بالبنى المحضرة كل على حده (**Basile and Peticca, 2009**). يحدث التأشيب المتماثل بين الحوامل المؤشبة أي البنى المحضرة في هذا العمل نظراً لاحتواء الحامل على تسلسلات خاصة مماثلة لتسلسلات متوفرة في مناطق عديدة من جينوم الخلايا المضيفة (الليشمانيا) وتتمثل هذه التسلسلات بالطرفين `5 و`3

لتسلسل الجين المرمزة للوحدة **18s** من الـ**rRNA** (**RNA** ريبوزومي)، والتي تتكرر بشكل ترادفي في مواضع عدة من جينوم الطفيلي، مما سيسمح بدخول جين **IGF1** البشري في عدة أماكن من جينوم الخلايا المضيفة المحورة مما سيضمن الإنتاجية العالية لهذا البروتين مقارنة بأي نظام آخر، فضلاً عن أن وجود الجين في هذه المواقع الجينومية سيجعلها تحت سيطرة محضض ريبي **ribosomal promoter** يعمل بوساطة أنزيم **RNA** بوليمراز **I**، الذي يتصف بفعّاليته الانتساخية العالية مقارنة بفعّالية أنزيمات البوليميراز الآخرى المتوفرة ضمن نوى الخلايا المضيفة، تجدر الإشارة إلى أن الحامل نفسه بوجود محضض ريبي إضافي صعداً قبل مكان تنسيل الجين مما يزيد انتساخ الجين الهدفية بمعدل إضافي يقارب 50% (**Bastos *et al*., 2017; Taheri *et al*., 2016**). بالإضافة إلى كل ما سبق ذكره تعود الإنتاجية العالية لهذا النظام إلى معدل النمو العالي للنسائل المحورة في وسط الزرع، إذ يمكن الحصول على 40 جيل خلال أسبوع من الزراعة بمقابل 7 أجيال فقط من خلايا الثدييات خلال نفس المدة (**Basile and Peticca, 2009**).

يُدخل حامل **pLEXSY** واسمة انتقاء في جينوم الليشمانيا وهي عبارة عن جين مقاومة لعقار **drug** يضاف لوسط الزرع مما يسمح بنمو وإكثار النسائل المحورة جينياً بينما تموت الخلايا غير المحورة. يحوي الحامل تسلسل إشارة يجعل البروتين الناتج مفرزاً، وبحسب استراتيجية التنسيل ضمنه يمكن للبروتين الهدف أن ينتج إما بشكل داخل خلوي **intracellular** وإما بشكل مفرز **secreted** وهذا ما قمنا بالاستفادة منه في هذا العمل إذ حضرنا شكلين من البنى المؤشبة، يضمن كل شكل إنتاج البروتين إما ضمن الخلايا المضيفة وإما مُفرز خارجها، كما أن هذا الحامل سيضيف إلى البنى الأربع تسلسل سداسي الهيستيدين مما سيسهل عملية تنقية بروتين **IGF1** البشري بوساطة كروماتوغرافيا الإلفة المعدنية (**Bastos *et al*., 2017; Taheri *et al*., 2016**).

استعمل هذا النظام في السنوات الأخيرة لإنتاج العديد من البروتينات المؤشبة التي أدى إنتاجها في الأنظمة القديمة مشاكل عديدة تراوحت بين الإنتاجية المنخفضة لفقدان الفعّالية، بسبب الطي غير الصحيح أو لغياب تعديلات بعد الترجمة، ولغيرها من المشكلات. من أمثلة البروتينات التي أنتجت بنجاح باستعمال نظام **LEXSY** البروتينات الغشائية (**Gonzalez-Lobato *et al*., 2016**) واللقاحات التي كانت تنتج تقليدياً في خلايا الحشرات والثدييات وذلك بهدف خفض ثمنها عن طريق خفض كلفة إنتاجها (**Bolhassani *et al*., 2015; Grzyb *et al*., 2016**)، والبروتينات العلاجية مثل: مُفعل البلاسمينوجين النسيجي البشري **human tissue plasminogen activator** المستعمل لعلاج الخثار (**Soleimani *et al*., 2007**)، و**Darbepoetin Alfa** المستعمل لعلاج فقر الدم (**Kianmehr *et al*., 2016**)، بينما لا توجد أي دراسة سابقة تناولت إنتاج بروتين **IGF1** البشري أو غيره من البروتينات منخفضة الوزن الجزيئي ضمن هذا النظام، مما سيجعل من الممكن استعمال نظام **LEXSY** في محاولة إنتاج بروتين **IGF1** البشري تحدياً كبيراً ولكنه واعد بحل المشاكل الحالية التي تحيط بإنتاج هذا البروتين عالمياً ولعل أهمها القدرة الإنتاجية المنخفضة للشكل الوظيفي الفعّال التي تتصف بها الأنظمة (على رأسها بدائيات النوى وخلايا الثدييات) المستعملة حالياً لإنتاجه.

المراجع:

1. Alhrak, F., Soukkarieh, C., 2023. Producing a local strain of genetic modified Leishmania tropica parasites expressing GFP protein, Damascus University Journal for the Basic Sciences, p. 11.
2. Attarpour Yazdi, M.M., Tofighi, N., Rajaee, T., Ghahremanlou, M., Adeli, A., Azam, B., Azizi, M., Davoudi, N., 2018. Enhancement of Expression Level of Modified t-PA (TNKase) in Leishmania tarentolae by Induction System. Iranian biomedical journal.
3. Basile, G., Peticca, M., 2009. Recombinant protein expression in Leishmania tarentolae. Molecular biotechnology 43, 273-278.
4. Bastos, M.S., Souza, L.A., Onofre, T.S., Silva, A.J., Almeida, M.R., Bressan, G.C., Fietto, J.L., 2017. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp Leishmania braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 112, 155-159.
5. Bolhassani, A., Shirbaghaee, Z., Agi, E., Davoudi, N., 2015. VLP production in Leishmania tarentolae: A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. Protein expression and purification 116, 7-11.
6. Carel, J.C., Chaussain, J.L., Chatelain, P., Savage, M.O., 1996. Growth hormone insensitivity syndrome (Laron syndrome): main characteristics and effects of IGF1 treatment. Diabetes & metabolism 22, 251-256.
7. Chesik, D., Wilczak, N., De Keyser, J., 2007. The insulin-like growth factor system in multiple sclerosis. International review of neurobiology 79, 203-226.
8. Consortium, S.G., 2008. Protein production and purification. Nature methods 5, 135-146.
9. de Oliveira, T.A., da Silva, W., da Rocha Torres, N., de Moraes, J.V.B., Senra, R.L., de Oliveira Mendes, T.A., Júnior, A.S., Bressan, G.C., Fietto, J.L.R., 2019. Application of the LEXSY Leishmania tarentolae system as a recombinant protein expression platform: A review. Process Biochemistry 87, 164-173.
10. Gonzalez-Lobato, L., Chaptal, V., Molle, J., Falson, P., 2016. Leishmania tarentolae as a Promising Tool for Expressing Polytopic and Multi-Transmembrane Spans Eukaryotic Membrane Proteins: The Case of the ABC Pump ABCG6. Methods in molecular biology 1432, 119-131.
11. Grzyb, K., Czarnota, A., Brzozowska, A., Cieslik, A., Rabalski, L., Tyborowska, J., Bienkowska-Szewczyk, K., 2016. Immunogenicity and functional characterization of Leishmania-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. Scientific reports 6, 30627.
12. Joly, J.C., Leung, W.S., Swartz, J.R., 1998. Overexpression of Escherichia coli oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor-I accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 2773-2777.
13. Kianmehr, A., Mahrooz, A., Oladnabi, M., Safdari, Y., Ansari, J., Veisi, K., Evazalipour, M., Shahbazmohammadi, H., Omidinia, E., 2016. Purification and Characterization of Recombinant Darbepoetin Alfa from Leishmania tarentolae. Molecular biotechnology 58, 566-572.
14. Luginina, A., Maslov, I., Khorn, P., Volkov, O., Khnykin, A., Kuzmichev, P., Shevtsov, M., Belousov, A., Kapranov, I., Dashevskii, D., 2023. Functional GPCR expression in eukaryotic LEXSY system. Journal of Molecular Biology 435, 168310.
15. Niimi, T., 2012. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite Leishmania tarentolae: a review. Methods in molecular biology 824, 307-315.
16. Samuelsson, E., Moks, T., Uhlen, M., Nilsson, B., 1994. Enhanced in vitro refolding of insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner. Biochemistry 33, 4207-4211.
17. Soleimani, M., Mahboudi, F., Davoudi, N., Amanzadeh, A., Azizi, M., Adeli, A., Rastegar, H., Barkhordari, F., Mohajer-Maghari, B., 2007. Expression of human tissue plasminogen activator in the trypanosomatid protozoan Leishmania tarentolae. Biotechnology and applied biochemistry 48, 55-61.
18. Souza, L.Â.d., Onofre, T.S., Silva, A., Almeida, M.R.d., Bressan, G.C., Fietto, J.L.R., 2017. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp Leishmania braziliensis and its application as an alternative method for drug screening in vitro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 112, 155-159.
19. Taheri, T., Seyed, N., Mizbani, A., Rafati, S., 2016. Leishmania-based expression systems. Applied microbiology and biotechnology 100, 7377-7385.
20. Zapf, J., Froesch, E., 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. Hormone research 24, 121-130.