

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۴، تابستان ۱۳۹۴، صفحه ۱۴۱-۱۵۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴

تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در سویه اورینگامی/شریشیاکلی و مقایسه میزان استخراج آن با دو روش اولتراسونیک و انجماد و ذوب

مرضیه سـواری: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، marzieh.savari@gmail.com
سید حمید زرکش اصفهانی*: دانشیار ایمونولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

چکیده

مقدمه: هورمون رشد انسانی یک پروتئین تک‌رشته است که دارای ۱۹۱ اسید آمینه و وزن مولکولی حدود ۲۲ کیلودالتون است. به علت فعالیت‌های زیستی مهم و متنوع هورمون رشد، این هورمون دارای کاربردهای گسترده‌ایی در پزشکی و بیوتکنولوژیست. از اواخر سال ۱۹۷۰ استفاده از بیان ژن برای تولید پروتئین‌های نوترکیب صنعتی تبدیل به یک صنعت چند میلیارد دلاری شده است. از طرفی مشکلاتی که در استخراج پروتئین درون سلولی وجود دارد باعث شده است که چندین روش برای این کار ارایه شود که در بسیاری از این روش‌ها نیاز به تجهیزات خاص است. اما در بیشتر مطالعات، پژوهشگران نیاز به یک روش سریع و ارزان قیمت برای تخریب سلول دارند. هدف این پژوهش، تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب و مقایسه میزان استخراج آن با روش انجماد و ذوب و روش اولتراسونیک در سویه اورینگامی/شریشیاکلی است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های مستعد سویه اورینگامی/شریشیاکلی با وکتور حاوی ژن هورمون رشد انسانی ترانسفورم شده و با کشت در محیط LB و القا با IPTG هورمون رشد انسانی نوترکیب تولید و با دو روش انجماد و ذوب و اولتراسونیک، استخراج و سپس این پروتئین با استفاده از روش‌های الایزا، برادفورد، دات‌بلات و وسترن‌بلات بررسی شد.

نتایج: عمل ترانسفورم کردن باکتری با کارایی بالایی انجام گرفت و نتایج حاصل از دات‌بلات و وسترن‌بلات نشان داد که پروتئین هورمون رشد انسانی نوترکیب به خوبی تولید شد. با استخراج پروتئین با روش‌های انجماد و ذوب و اولتراسونیک و بررسی نتایج حاصل از روش‌های الایزا و برادفورد مشخص شد که میزان پروتئین استخراج شده در روش انجماد و ذوب آهسته بیشتر از انجماد و ذوب سریع و کمابیش هم اندازه پروتئین استخراج شده در روش اولتراسونیک است.

بحث و نتیجه‌گیری: برابر بودن میزان پروتئین استخراج شده در روش انجماد و ذوب آهسته و روش اولتراسونیک نشان دهنده این است که روش انجماد و ذوب آهسته، در مواردی که امکان استفاده از تجهیزات خاص و گران قیمت مثل اولتراسونیک وجود ندارد، جایگزین مناسبی برای این روش است.

واژه‌های کلیدی: اورینگامی، هورمون رشد انسانی نوترکیب، اولتراسونیک، انجماد و ذوب، دات‌بلات، وسترن‌بلات

مقدمه

اشریشیاکلی^۱ به طور گسترده‌ای به عنوان یک ارگانیسم مدل برای مطالعه‌ی جنبه‌های مختلف متابولیسمی استفاده می‌شود. علاوه بر این اشریشیاکلی، بیشتر برای تولید پروتئین نوترکیب با مقادیر بالا و هزینه‌های کم نیز کاربرد دارد که از علت‌های استفاده از آن سهولت کشت و ویژگی‌های رشد، سهولت دستکاری ژنتیکی و در دسترس بودن ابزار ملکولی آن، توانایی تغییرات پس از ترجمه (مانند گلیکوزیلاسیون، پیوندهای دی‌سولفیدی) است (۱ و ۲). یکی از پروتئین‌هایی که امروزه مورد نیاز است هورمون رشد انسانی^۲ است. این هورمون یک پلی‌پپتید تک رشته‌ای شامل ۱۹۱ اسید آمینه با وزن ۲۲ کیلو دالتون است که دارای دو پیوند دی‌سولفیدی، چهار ساختار هلیکسی راست گرد و دو جایگاه فعال برای اتصال به گیرنده‌اش است. این هورمون توسط سلول‌های سوماتوتروف غده هیپوفیز جلویی ترشح می‌شود. هورمون رشد انسانی نقش مهمی در رشد سوماتیک از طریق اثر بر روی متابولیسم پروتئین، کربوهیدرات و لیپید دارد (۳ و ۴). کمبود یا نقص این هورمون به کند ذهنی و کوتاهی قد، سندروم ترنر^۳، سندروم پرادرویلی^۴ و نارسایی مزمن کلیه منجر می‌شود. همچنین، برای درمان سندروم تونل مچ دست^۵ نیز مؤثر است (۵-۷). منبع اصلی هورمون رشد انسانی برای استفاده‌های انسانی، هورمون رشد نوترکیب تولید شده توسط باکتری است. از اواخر سال ۱۹۷۰ استفاده از بیان ژن نوترکیب برای تولید پروتئین‌های صنعتی تبدیل به یک صنعت چند میلیاردی شده است. از طرفی پس از تولید پروتئین هدف، استخراج پروتئین نوترکیب تولید شده داخل سلولی، یک

مرحله مهم است که روش‌های مختلفی از جمله اولتراسونیک^۶، دستگاه‌های برش و آنزیم‌ها برای این امر استفاده می‌شود. این روش‌ها در تخریب اشریشیاکلی مؤثر هستند اما برای انجام آن‌ها نیاز به تجهیزات خاص است که گاهی اوقات این تجهیزات وجود ندارند. یکی از روش‌هایی که بسیار متداول است، اولتراسونیک است. در این روش امواج صوتی با فرکانس بالا باعث لیز شدن سلول‌ها می‌شود. این امواج به وسیله یک پروب ارتعاشی، که در دستگاه اولتراسونیک تعبیه شده است، به نمونه‌ها وارد می‌شود. در بسیاری از موارد، به ویژه در مطالعه‌هایی که تعداد آزمایش‌ها و نمونه‌ها زیاد است، به یک روش ساده، سریع و ارزان قیمت نیاز است که یکی از این روش‌ها استفاده از روش انجماد و ذوب^۷ است. انجماد و ذوب یک روش متداول برای لیز کردن سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی است که به دو شکل انجماد و ذوب سریع و آهسته انجام می‌شود. در این روش تشکیل کریستال‌های یخ و متورم شدن سلول‌ها و در نهایت، قراردادن آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث لیز سلولی می‌شود. برای کارآمد شدن این روش باید سیکل انجماد و ذوب، بسته به نوع نمونه، چندبار تکرار شود (۱، ۸ و ۹). از آنجا که اولتراسونیک یک روش خوب و مورد قبول است و در این روش تقریباً ۸۰ درصد پروتئین باکتری استخراج می‌شود (۱۹)، در این پژوهش به منظور بررسی کارآمد بودن روش انجماد و ذوب، ابتدا پروتئین هورمون رشد انسانی نوترکیب در سویه اوریگامی^۸ اشریشیاکلی تولید و سپس، میزان پروتئین استخراج شده در دو روش انجماد و ذوب و اولتراسونیک مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

بیان هورمون رشد انسانی در سویه اورینگامی

سویه باکتریایی و وکتور: در این مطالعه سویه *E. coli Origami (DE3)* (Novagen USA) و وکتور pTrcHis/ZRG pTrcHis Topo, Invitrogen USA حاوی ژن هورمون رشد انسانی، پروموتور^۹ trc، توالی lacO^{۱۰} برای القاء توسط^{۱۱} IPTG، به منظور بیان هورمون رشد نو ترکیب انسانی تهیه شد.

ترانسفورماسیون^{۱۲} و غربالگری سلول‌های

اورینگامی. حاوی ژن rhGH: از باکتری *E. coli Origami* سلول‌های مستعد^{۱۳} تهیه و ۵ میکرولیتر از پلازمیدی که حاوی ژن هورمون رشد انسانی است به ۲۰۰ میکرولیتر سلول‌های مستعد شده باکتری اضافه و به آرامی مخلوط شد و با وارد کردن شوک سرمایی و حرارتی عمل ترانسفورماسیون انجام گرفت. سلول‌های ترانسفورم شده به منظور غربالگری روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد (۱۰ و ۱۱).

بیان پروتئین نو ترکیب هورمون رشد انسانی: کلونی

انتخاب شده در محیط کشت LB^{۱۴} مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و پس از این که میزان جذب (OD) به ۰/۶ رسید با محلول ۱ میلی‌مولار برلیتیر ایزوپروپیل تیو β-D-گالاکتوزید (IPTG) القا و به مدت ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با شیک ۲۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. پس از انکوباسیون جسم سلولی باکتری‌ها توسط سانتریفیوژ جمع‌آوری شد (۱۰ و ۱۱).

لیز سلولی و مقایسه استخراج پروتئین محلول

تولیدی با دو روش انجماد و ذوب و اولتراسونیک: پس از کشت و القا بیان پروتئین نو ترکیب مورد نظر، به منظور بررسی میزان تولید پروتئین در باکتری و مقایسه میزان استخراج آن در دو روش اولتراسونیک و انجماد و

ذوب، استخراج این پروتئین با این دو روش انجام گرفت. یک روش متداول برای لیز سلولی اولتراسونیک است اما در بسیاری از پژوهش‌ها استفاده از این روش به صرفه نیست، به همین خاطر در این پژوهش کوشش شده تا روش دیگری مانند انجماد و ذوب برای استخراج پروتئین جایگزین شود. شایان ذکر است به علت این که این پژوهش یک آزمایش مقایسه‌ای است برای هر سه روش یک آزمایش انتخاب شد و از توده سلولی حاصل باکتری به میزان برابر و به مقدار ۱۰ میکرولیتر برداشته و تخریب شد.

انجماد و ذوب: این روش به دو شکل انجماد و ذوب آهسته و انجماد و ذوب سریع انجام شد.

انجماد و ذوب سریع: ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS^{۱۵} به باکتری‌های جمع‌آوری شده حاصل از بیان افزوده و ویال حاوی نمونه به مدت ۶۰ ثانیه درون ظرف یخ خشک و سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای بررسی این که بعد از چند بار تکرار این مراحل، میزان پروتئین به دست آمده بیشتر است این مراحل ۶ بار تکرار شده و بعد از هر مرحله میزان پروتئین به روش سنجش برادفورد^{۱۶} و الایزا^{۱۷} اندازه‌گیری شد (۱ و ۱۲).

انجماد و ذوب آهسته: ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS^{۱۵} به باکتری‌های جمع‌آوری شده حاصل از بیان افزوده و ویال حاوی نمونه درون فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه و سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای بررسی این که بعد از چندبار تکرار این مراحل، میزان پروتئین به دست آمده بیشتر است این مراحل ۶ بار تکرار شده و بعد از هر مرحله میزان پروتئین به روش سنجش برادفورد و الایزا اندازه‌گیری شد (۱ و ۱۲).

انکوبه شد. در مرحله بعد، پس از شستشو عمل مسدودسازی^{۱۸} به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. در مراحل بعدی به ترتیب نمونه‌ها، آنتی‌بادی ثانویه، Streptavidin-HRP^{۱۹}، TMB Solution (شرکت سیتومتین ژن، ایران) و Stop Solution (شرکت سیتومتین ژن، ایران) افزوده و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد (۱۵).

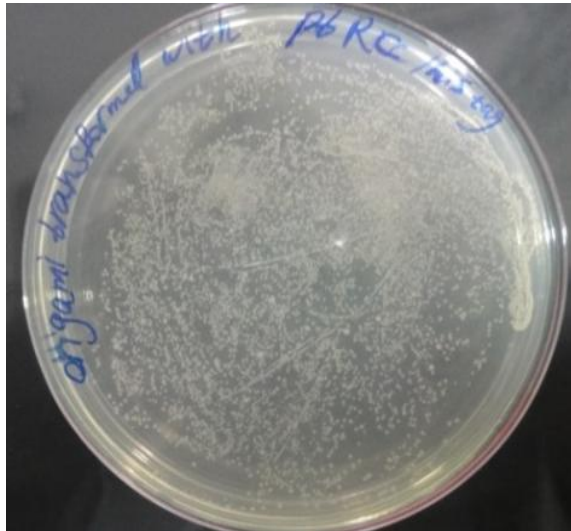
تحلیل با دات‌بلات^{۲۰} و وسترن‌بلات^{۲۱}: برای تأیید نهایی تولید پروتئین نو ترکیب بیان شده و تعیین ویژگی آن از روش دات‌بلات^{۲۲} و وسترن‌بلات^{۲۳} با آنتی‌بادی ضد هورمون رشد استفاده شد. برای انجام دات‌بلات، پس از تخریب دیواره سلولی، عصاره سلولی حاصل که حاوی پروتئین نو ترکیب است به کاغذ نیتروسولوز انتقال داده شد. رقت‌های مختلف هورمون رشد انسانی نو ترکیب تجاری به عنوان کنترل مثبت و عصاره سلولی باکتری که فاقد ژن هورمون رشد است به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ۲ میکرولیتر از نمونه، کنترل مثبت و کنترل منفی به کاغذ نیتروسولوز انتقال داده شد و پس از خشک شدن نمونه‌ها بر روی کاغذ، مرحله مسدودسازی کاغذ نیتروسولوز با قرار دادن آن در محلول شیر خشک یه مدت دو ساعت انجام شد. پس از سه بار شستشو کاغذ نیتروسولوز به مدت دو ساعت در مجاورت آنتی‌بادی ضد هورمون رشد انسانی رقت ۱ به هزار از آنتی‌بادی 10A7 قرار داده شد. در مرحله بعد پس از شستشو کاغذ نیتروسولوز با آنتی‌بادی ثانویه^{۲۲}، سوپسترای آنزیم (HRP) TMB به کاغذ نیتروسولوز اضافه شد. برای انجام وسترن‌بلات نیز پس از انجام الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد، باندهای پروتئینی حاصل به دست آمده از رسوب باکتری به کاغذ نیتروسولوز منتقل شد. مراحل بعدی همانند مراحل شرح

اولتراسونیک: ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلت باکتری برداشته، ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS IX به آن افزوده و روی یخ قرار داده و در سه نوبت ۳۰ ثانیه‌ای سونیکیت شد. سپس میزان پروتئین استخراج شده به روش معرف برادفورد و الیزا اندازه‌گیری شد (۸ و ۱۳).

تحلیل با معرف برادفورد: پس از اولتراسونیک، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و جذب آن در طول موج برادفورد ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. همچنین، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر نیز به طور جداگانه به پنج میلی‌لیتر معرف برادفورد افزوده و برای صفر کردن استفاده شد. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی BSA شرکت مرک استفاده شد. برای این کار ابتدا محلول غلیظ یک میکروگرم در میلی‌لیتر از BSA ساخته، سپس از این محلول غلظت‌های ۱۰ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ساخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های استاندارد با ۵ میلی‌لیتر از محلول برادفورد ترکیب و کاملاً مخلوط شد و جذب آن‌ها در طول موج ثبت شد. برای تهیه نمونه شاهد منفی (Blank) مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۵ میلی‌لیتر از محلول برادفورد ترکیب شد (۱۴).

تحلیل با الیزا: در این آزمایش از یک ساندریج الیزای خانگی با استفاده از آنتی‌بادی اولیه بر علیه هورمون رشد انسانی شامل آنتی‌بادی مونوکلونال 7F8 (آنتی‌بادی هدیه از طرف پروفیسور ریچارد راس، دانشگاه شفیلد انگلستان) و آنتی‌بادی ثانویه بیوتینه شده 10A7 (آنتی‌بادی هدیه از طرف پروفیسور ریچارد راس، دانشگاه شفیلد انگلستان) استفاده و میزان پروتئین تولید شده بررسی شد. ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی اولیه 7F8 به ۱۰ میلی‌لیتر بافر بی‌کربنات اضافه شده و در هر چاهک پلیت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد

نمودار به دست آمده نشان دهنده این است که تا تکرار پنجم، با افزایش تکرار میزان پروتئین بیشتری استخراج شده اما پس از آن میزان پروتئین استخراجی کاهش می یابد (شکل ۳).



شکل ۱- تصویری از کلونی های ترانسفورم شده سویه ی اورینگامی

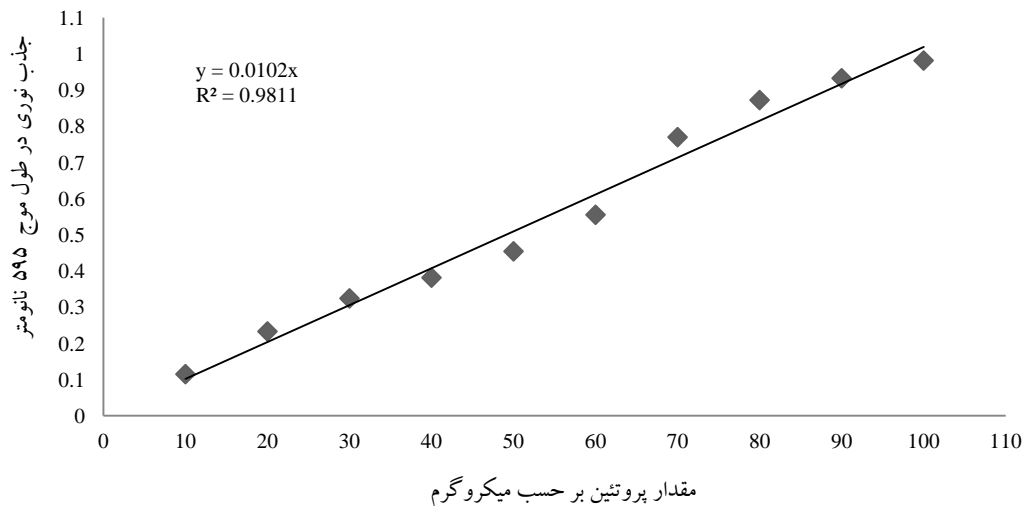
داده شده در بالا برای دات بلات انجام گرفت (۱۰) و (۱۱).

نتایج

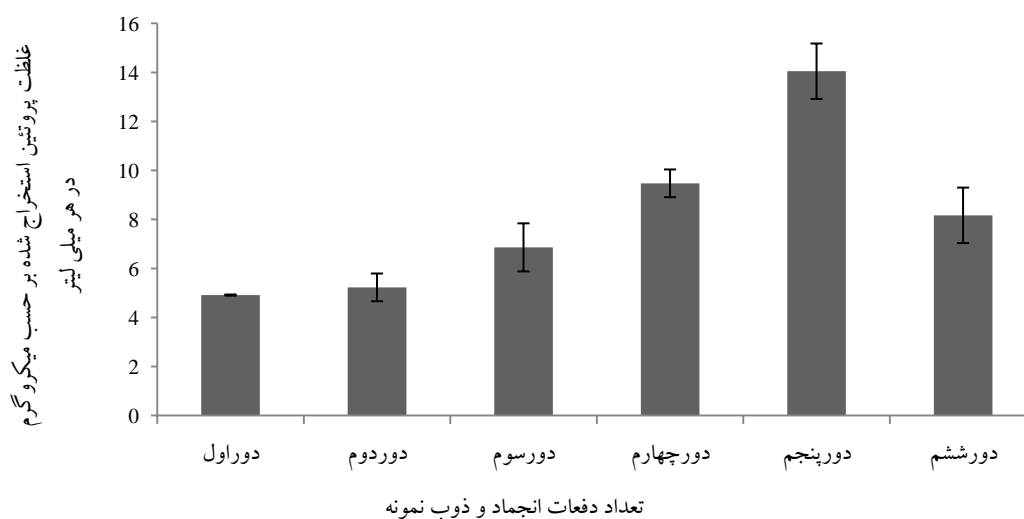
ترانسفورماسیون: از سویه اورینگامی سلول مستعد تهیه و سپس، با پلازمید pTrcHisTopo کد کننده برای rhGH ترانسفورم و مشاهده شد که این سویه با کارایی بالایی ترانسفورم شده است. شکل ۱ تصویری از رشد این سویه بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و تتراسایکلین برای اورینگامی را نشان می دهد.

نتایج استخراج پروتئین به روش انجماد و ذوب

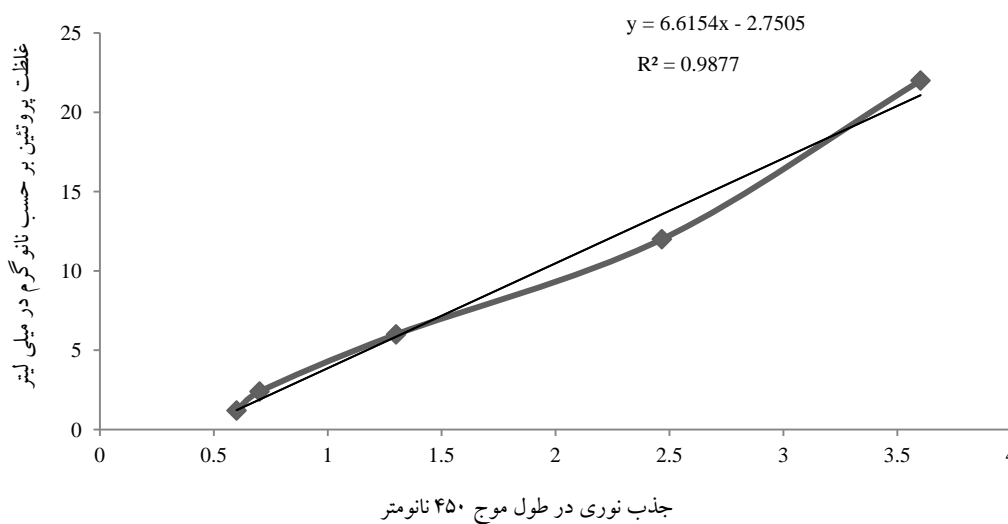
سریع با برادفورد: پس از هر بار تکرار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۵ میلی لیتر معرف برادفورد سنجیده شد. این روش کل پروتئین های استخراج شده را می سنجد. جذب نمونه ها در طول موج برادفورد ثبت و طبق نمودار استاندارد (شکل ۲) به غلظت میکرو گرم تبدیل شد.



شکل ۲- نمودار استاندارد آلومین سرم گاوی در طول موج ۵۹۵ نانومتر



شکل ۳- نمودار میزان پروتئین استخراج شده بعد از تعداد دفعات متفاوت انجماد و ذوب سریع با روش برادفورد. میزان پروتئین استخراج شده تا تکرار پنجم با افزایش تکرار، افزایش یافته و از چرخه پنجم به بعد میزان پروتئین استخراجی کاهش می‌یابد.

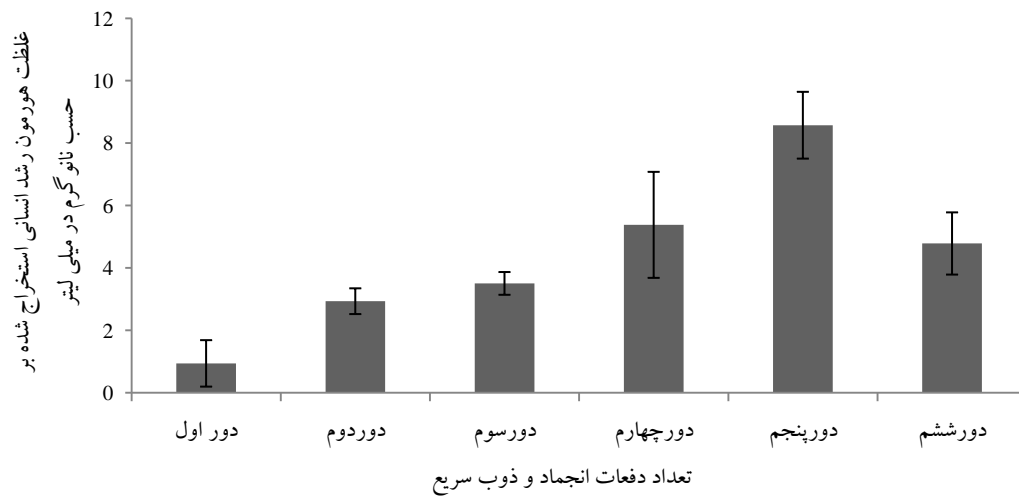


شکل ۴- نمودار استاندارد غلظت‌های الایزا

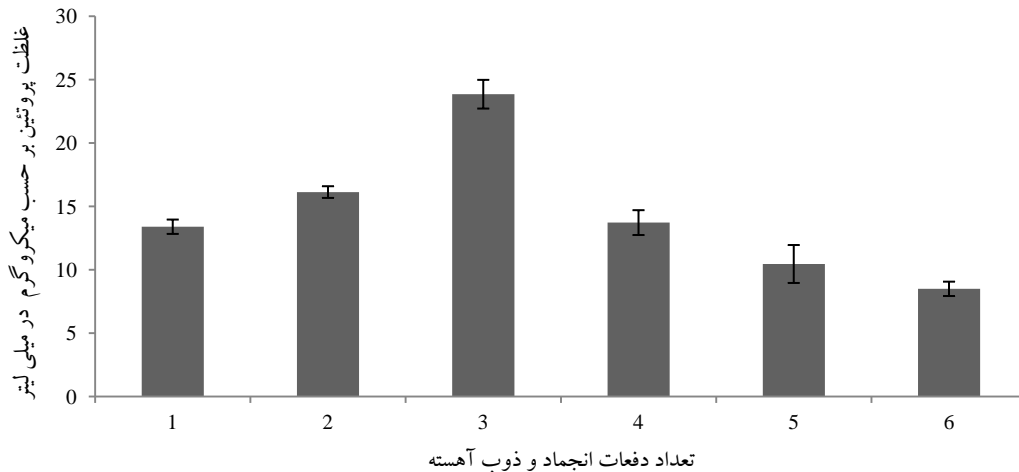
۴۵۰ نانومتر خوانده و بر اساس نمودار استاندارد (شکل ۴) به غلظت نانوگرم تبدیل شد که نتایج به دست آمده نشان داده است که میزان استخراج پروتئین تا تکرار پنجم افزایش یافته اما از چرخه پنجم به بعد میزان پروتئین استخراجی کاهش می‌یابد (شکل ۵).

نتایج استخراج پروتئین به روش انجماد و ذوب

سریع با الایزا: در این روش از آنتی‌بادی اختصاصی هورمون رشد انسانی برای بررسی میزان استخراج هورمون رشد انسانی پس از هر بار چرخه انجماد و ذوب سریع استفاده شد. الایزا برای هر کدام از نمونه‌ها به شکل تکرار دوتایی انجام گرفت و جذب آن‌ها در طول موج



شکل ۵- نمودار میزان پروتئین استخراج شده بعد از تعداد متفاوت انجماد و ذوب سریع با روش الایزا میزان پروتئین استخراج شده تا تکرار پنجم افزایش یافته اما از چرخه پنجم به بعد کاهش می یابد.



شکل ۶- نمودار میزان پروتئین استخراج شده بعد از تعداد متفاوت انجماد و ذوب آهسته با روش برادفورد نتایج این نمودار نشان دهنده این است که میزان پروتئین استخراج شده تا چرخه سوم رو به افزایش و پس از آن کاهش می یابد.

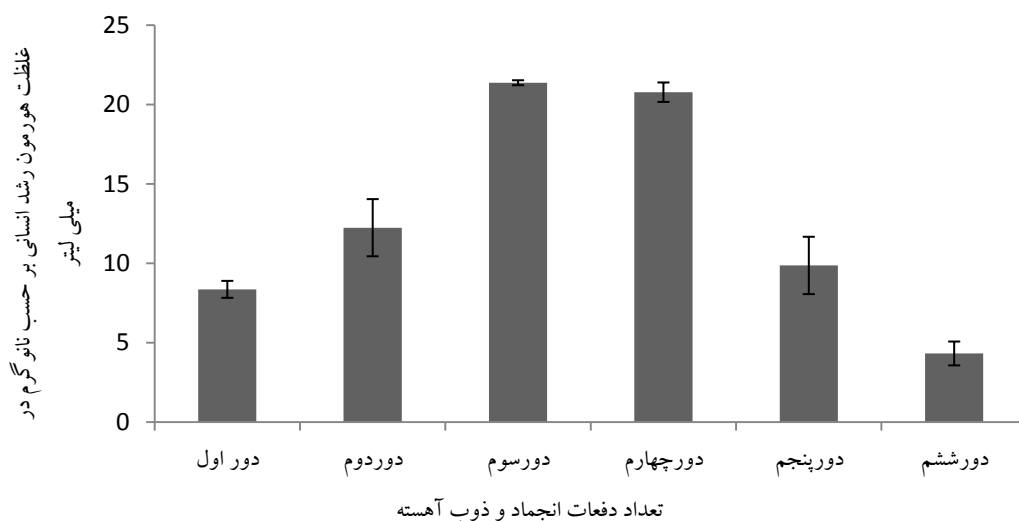
آنتی بادی اختصاصی ضد هورمون رشد انسانی به شکل دوتایی برای هر ۶ نمونه بعد از هر تکرار و تبدیل جذب نوری نمونه ها به غلظت نانوگرم، این نتایج به دست آمده است. با سه بار تکرار چرخه انجماد و ذوب آهسته میزان هورمون رشد انسانی بیشتری استخراج شده است (شکل ۷). نتایج این نمودار نشان دهنده این است که میزان پروتئین استخراج شده تا چرخه سوم رو به افزایش و پس از آن کاهش می یابد.

نتایج استخراج پروتئین به روش انجماد و ذوب

آهسته با برادفورد: در این روش نیز همانند روش انجماد و ذوب سریع، نمونه ها با معرف برادفورد سنجش شده و پس از تبدیل داده ها به غلظت میکروگرم، برای داده ها نمودار رسم شد که نتایج نشان داده است که میزان پروتئین تا تکرار سوم روند افزایشی داشته و پس از آن کاهش می یابد (شکل ۶).

نتایج استخراج پروتئین به روش انجماد و ذوب

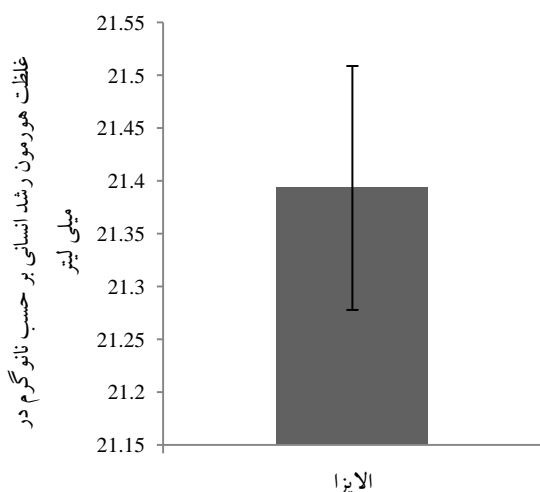
آهسته با الایزا: در این روش پس از انجام الایزا با



شکل ۷- نمودار میزان پروتئین استخراج شده بعد از تعداد دفعات متفاوت انجماد و ذوب آهسته با الیزا

نتایج استخراج پروتئین به روش اولتراسونیک با

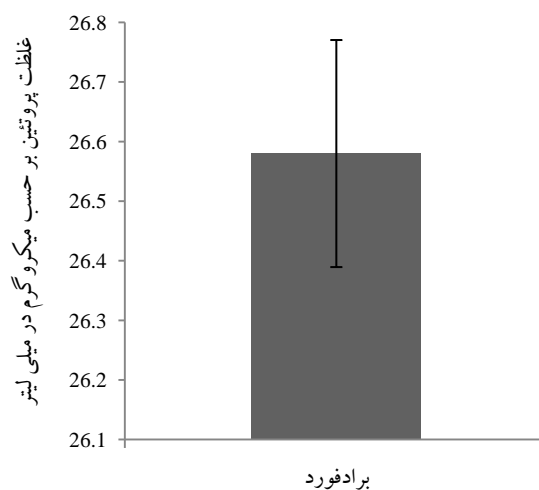
الایزا: در این مرحله از کار نیز پس از سه نوبت سونیکیت کردن توده سلولی میزان هورمون رشد انسانی استخراج شده از باکتری با الیزا سنجیده شد. جذب نوری آن در ۴۵۰ نانومتر ۲۱/۳۹ نانوگرم بود (شکل ۹).



شکل ۹- نمودار بررسی میزان پروتئین استخراج شده از روش اولتراسونیک با روش الایزا. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر ۲۱/۳۹ نانوگرم بود.

نتایج استخراج پروتئین به روش اولتراسونیک با

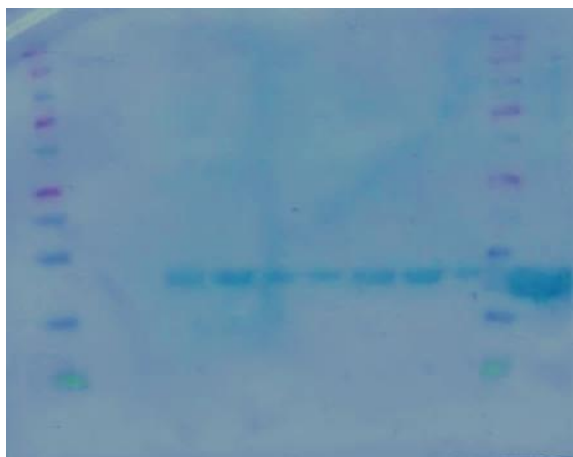
برادفورد: نتایج حاصل از انجام سه نوبت سونیکیت کردن توده سلولی باکتری و بررسی میزان پروتئین استخراج شده با برادفورد نشان دهنده این است که جذب نوری آن در طول موج برادفورد ۲۶/۵۸ میکروگرم است (شکل ۸).



شکل ۸- نمودار بررسی میزان پروتئین استخراج شده از روش اولتراسونیک با برادفورد. جذب نوری نمونه در طول موج برادفورد ۲۶/۵۸ میکروگرم در میلی لیتر است.

جدول ۱- مقایسه میزان پروتئین استخراج شده با سه روش اولتراسونیک، انجماد و ذوب آهسته و انجماد و ذوب سریع

	غلظت پروتئین سنجش شده با برادفورد	غلظت هورمون رشد سنجش شده با الیزا
اولتراسونیک	۲۶/۵۸ میکروگرم در میلی لیتر	۲۱/۳۹ نانوگرم در میلی لیتر
انجماد و ذوب آهسته	۲۳/۸۴ میکروگرم در میلی لیتر	۲۱/۳۷ نانوگرم در میلی لیتر
انجماد و ذوب سریع	۱۴/۴ میکروگرم در میلی لیتر	۵۷/۸ نانوگرم در میلی لیتر



شکل ۱۱- نتایج حاصل از وسترن بلات. از سمت راست ردیف اول کنترل مثبت، ردیف دوم مارکر، ردیف سوم تا هفتم نمونه‌های حاصل از بیان

بحث و نتیجه گیری

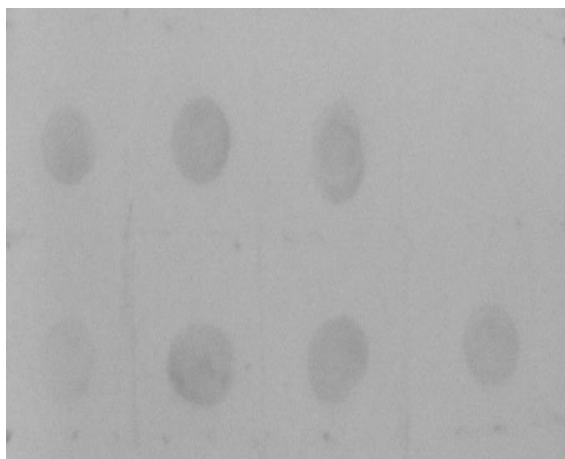
در این پژوهش نشان داده شد که پروتئین نو ترکیب بیان شده در اشیریشیا کلی را می توان با روش ساده انجماد و ذوب به خوبی استخراج کرد. از آنجا که طیف وسیعی از پروتئین های نو ترکیب تولید شده در اشیریشیا کلی داخل سلولی هستند و به خارج ترشح نمی شوند، روش انجماد و ذوب یک جایگزین ساده و ارزان برای روش های پر هزینه جداسازی پروتئین از باکتری است (۱۲). برای استخراج پروتئین نو ترکیب تولید شده از باکتری چندین روش وجود دارد که نوع و میزان پروتئین استخراج شده بستگی به آسیب وارد شده به دیواره سلول دارد. در برخی روش ها دیواره کامل تخریب می شود و پروتئین سیتوپلاسمی و پروتئین پری پلاسمی خارج می شوند. در تعدادی از روش ها غشا

مقایسه میزان پروتئین استخراج شده با دو روش

اولتراسونیک و انجماد و ذوب: پس از انجام استخراج پروتئین به دو روش اولتراسونیک و انجماد و ذوب به دو شکل آهسته و سریع، میزان پروتئین استخراجی در این دو روش مقایسه شد که این نتایج در جدول ۱ نشان داده شد.

دات بلات و وسترن بلات: نتایج نشان داد در

دات بلات، پس از انتقال نمونه ها به کاغذ نیتروسولوز و اضافه کردن سوبسترای آنزیم، پروتئین به خوبی تولید شده است (شکل ۱۰). پس از انجام الکتروفورز ژل دوبعدی و انتقال ژل به کاغذ نیتروسولوز و انجام سایر مراحل وسترن بلات، باندهایی در ناحیه ۲۲ کیلودالتون ظاهر شدند که نشان دهنده تولید پروتئین هورمون رشد انسانی با وزن صحیح است (شکل ۱۱).



شکل ۱۰- نتایج حاصل از دات بلات. ردیف اول از سمت چپ به راست به ترتیب کنترل مثبت با رقت های ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰ و کنترل منفی، ردیف دوم نمونه های حاصل از بیان

میزان پروتئین استخراج شده از روش انجماد و ذوب آهسته تقریباً مشابه میزان پروتئین استخراج شده از روش اولتراسونیک بوده است. این در حالی است که ماریج^{۲۳} و همکاران با استفاده از روش انجماد و ذوب توانستند پروتئین گیرنده رتینوئید^{۲۴} را که به شکل نوترکیب در اشیرشیا کلی تولید کرده بودند، با غلظت دو برابر نسبت به پروتئین استخراج شده با روش اولتراسونیک، استخراج کنند. این نتایج نشان می‌دهد که می‌توان در مواردی که به علت‌های مختلف امکان استفاده از روش اولتراسونیک و یا دیگر تجهیزات لازم برای تخریب سلول باکتریایی وجود ندارد، می‌توان از روش انجماد و ذوب آهسته که روشی ساده و ارزان است، استفاده کرد. البته این روش محدودیت‌هایی هم دارد از جمله این که بیشتر برای استخراج پروتئین‌هایی با وزن بین ۸ تا ۲۹ کیلودالتون و دارای بیان بالا قابل استفاده است (۱۸).

References

- (1) Benov L., Al-Ibraheem J. Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 35 (4): 428- 31.
- (2) Waegeman H., De Lausnay S., Beauprez J., Maertens J., De Mey M., Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering. *BioTechnology* 2013; 30 (2): 255- 61.
- (3) Ghasemi F., Zomorodipour A., Shojai S., Ataei F., Khodabandeh M., Sanati MH. Using L-arabinose for production of human growth hormone in *Escherichia coli*, studying the processing of gIII: hGH precursor. *Irania journal of Biotechnology* 2004; 2 (4): 250- 60.

خارجی از غشا داخلی جدا می‌شود و فقط پروتئین پری‌پلاسمی استخراج می‌شود. در روش انجماد و ذوب دیواره تخریب می‌شود و به خارج شدن هر دو پروتئین، سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی منجر می‌شود (۱۲، ۱۵ و ۱۶). همان‌طور که گفته شد برای استخراج پروتئین از باکتری روش‌های زیادی وجود دارد اما بیشتر آن‌ها نیاز به تجهیزات خاص دارد؛ این در حالی است که برای انجام برخی از پژوهش‌های آزمایشگاهی به ویژه آزمایش‌های بهینه‌سازی که در آن تعداد آزمایش‌ها زیاد است، امکان استفاده از این تجهیزات را نداریم. یکی از روش‌هایی که بیشتر استفاده می‌شود روش اولتراسونیک است که علاوه بر این که به تجهیزات گران قیمت نیاز دارد، امواج صوتی در این روش نیز ممکن است به دناتور شدن و غیرفعال شدن پروتئین منجر شود که این مشکل در روش انجماد و ذوب وجود ندارد (۱۲، ۱۷ و ۱۸). در این پژوهش میزان پروتئین استخراج شده در روش انجماد و ذوب با روش اولتراسونیک در سطح آزمایشگاهی مقایسه شد. در این آزمایش هورمون رشد انسانی نوترکیب تولید شده در سویه اوریگامی، که با انجام وسترن‌بلات و دات‌بلات تولید آن تایید شد، با سه روش اولتراسونیک، انجماد و ذوب سریع و انجماد و ذوب آهسته استخراج و میزان پروتئین استخراج شده با روش الایزا و معرف برادفورد اندازه‌گیری شد. نتایج به دست آمده نشان داده است که در روش انجماد و ذوب سریع پس از انجام ۵ بار سیکل و در روش انجماد و ذوب آهسته پس از ۳ بار انجام سیکل میزان بیشتری پروتئین استخراج شده است. با مقایسه نتایج بدست آمده از الایزا و برادفورد مشخص شده است که میزان پروتئین استخراج شده در روش انجماد و ذوب آهسته کمابیش دو برابر روش انجماد و ذوب سریع بوده است. از طرفی

- (4) Sonoda H., Sugimura A. Improved solubilization of recombinant human growth hormone inclusion body produced in *Escherichia coli*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2008; 72 (10): 2675- 80.
- (5) Vance ML., Mauras N. Growth hormone therapy in adults and children. *New England Journal of Medicine* 1999; 341 (16): 1206-16.
- (6) Shin N., Kim DY., Shin CS., Hong MS., Lee J., Shin HC. High-level production of human growth hormone in *Escherichia coli* by a simple recombinant process. *Journal of biotechnology* 1998; 62 (2):143- 51.
- (7) Sanchez- Ortega R., Klibanski A., Tritos NA. Effects of recombinant human growth hormone therapy in adults with Prader-Willi syndrome: A Meta-Analysis. *Clinical endocrinology* 2012; 77 (1): 86- 93.
- (8) Mehig R. Lysis of *E. coli* for the purification of soluble recombinant proteins using CelLytic-B and CelLyticB II. *Molecular Biology* 2000- 2001; 16- 17.
- (9) Feliu JX., Cubarsi R., Villaverde A. Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of *E. coli* cells. *Biotechnology and bioengineering* 1998; 58 (5): 536- 40.
- (10) Rezaei M. Production of recombinant human growth hormone from eukaryotic and prokaryotic cell. Isfahan: Isfahan univ.; 2011.
- (11) Shiva SH. Production of recombinant human growth hormone in some probiotic bacteria. Isfahan: Isfahan univ.; 2013.
- (12) Johnson BH., Hecht MH. Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Biotechnology* 1994; 12 (13): 1357- 60.
- (13) Shrestha P., Holland T.M., Bundy BC. Streamlined extract preparation for *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. *Bio Techniques* 2012; 53:163- 74.
- (14) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72; 248- 54.
- (15) Wilkinson IR., Ferrandis E., Artymiuk PJ., Teillot M., Soulard Ch., Touvy C., et al. A ligand-receptor fusion of growth hormone forms adimer and is a potent long-acting agonist. *Nature medicine* 2007; 13 (9): 1108- 13.
- (16) Quan S, Hiniker A., Collet JF., Collet A., Bardwell J.C.. Isolation of bacteria envelope proteins In: Delcour A.H. editor. *Bacterial Cell Surfaces*. New York: Springer Science+ Business Media, Humana Press; 2013. p 359- 66.
- (17) Okungbowa FI., Ghosh AK., Chowdhury R., Chaudhuri P., Basu A, Pal K. Mechanical lysis *Candida* cells for crude protein and enzymatic activity estimation: Comparison of three methods. *World Journal of Medical Sciences* 2007; 2 (2): 101- 4.
- (18) Mojsin M., Nikevi G., Grujicic NK., Savic T., Petrovik I., Stevanovic M. Purification and functional analysis of the recombinant protein isolated from *E. coli* by employing three different methods of bacterial lysis. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2005; 70 (7): 943- 50.
- (19) Nouri Gharajelar S., Ahmadi M., Hosseini B. Cloning and expression of the immunogenic moiety of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 1 (4) :7- 14.

¹. *Escherichia coli*

². Human growth hormone

³. Turner syndrome

⁴. Prader willi syndrome

⁵. Carpal tunnel syndrome

⁶. Ultrasonic

⁷. Freeze/thaw

⁸. Origami (DE3)

⁹. Trc promoters

¹⁰. Laco sequence

¹¹. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

¹². Transformation

- ¹³. Competent cells
- ¹⁴. Luria broth
- ¹⁵. Phosphate buffered saline
- ¹⁶. Bradford assay
- ¹⁷. ELISA
- ¹⁸. Blocking
- ¹⁹. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
- ²⁰. Dot Blotting
- ²¹. Western Blotting
- ²². Sheep anti-mouse IgG HRP conjugate, Amersham, 1/1000 dilution
- ²³. Marija Mojsin
- ²⁴. Retinoid X receptors (RXRs)

Production of recombinant human growth hormone in *Eschericia coli* strain Origami and comparing freeze/ thaw and sonication methods for proteins extraction

Marzieh Savari

M.Sc. of Microbiology, University of Isfahan, Iran, marzieh.savari@gmail.com

Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani *

Associate Professor of Immunology, University of Isfahan, Iran, s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

Abstract

Introduction: Human growth hormone (hGH) is a single-chain polypeptide derived from pituitary gland that participates in a wide range of biological functions and has therapeutic applications. The hormone consists of 191 amino acid residues (22kD) which folds into a four-helix bundle structure with two disulfide bridges. Due to the complication of internal cell protein extraction, several methods have been established for this purpose that most of them need special instruments. Thus, in the preliminary studies, scientists need a quick and simple method for cell disruption and protein extraction. The aim of the present study was production of hGH in *E.coli* and comparison between the freeze/thaw and Sonication method for protein extraction from cells.

Materials and methods: The competent cells of *E. coli* Origami (DE3) were transformed using plasmid containing human growth hormone gene and then cultured in LB medium. After IPTG induction, the hGH was extracted using various methods including bacterial lysing, freeze/thaw and sonication methods and then extracted protein was assessed using ELISA, Bradford, dot blot and Western blotting.

Results: According to our findings, bacterial transformation showed high efficiency of transformation. Furthermore, the results of dot blot and Western blot showed production of recombinant hGH at high levels. Protein extraction measurement using ELISA and Bradford methods indicated that the proportion of the extracted protein in the slow freeze/thaw method was higher than the fast freeze/thaw method and was almost equal to sonication method.

Discussion and conclusion: The extracted protein levels in both of the slow freeze/ thaw and ultrasonic methods was equal, which introduces the slow freeze/thaw method as an excellent substitution for ultrasonic method when special instruments are not available.

Key words: Origami (DE3), Recombinant human growth hormone, Ultrasonic, Freeze/ thaw, dot blot, Western blot

* Corresponding author

Received: February 2, 2014 / **Accepted:** June 25, 2014