Archive of SID

بیان همزمان ترکیب چاپرون‌های Gro EL/Tig و Tig با فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی در *E. coli* به منظور کاهش پروتئین‌های نامحلول نوترکیب

گلناز طباطبائیان [*،۱]، حسن میرزاحسینی [۲]، اکرم عیدی [۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲. استادیار ژنتیک، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

۳. دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

[*] **مسؤول مکاتبات:** گلناز طباطبائیان، ایران، تهران، سعادت آباد، شهرداری شمالی، داودحسینی، بهاران، بهار۴، مجتمع پانیذ، واحد۲۰۵، کدپستی: ۱۹۷۸۹۷۳۵۸۴، تلفن: ۶۶۹۵۳۳۱۱-۰۲۱، پست الکترونیکی: golnaz.tabatabaian@gmail.com

محل انجام تحقیق: تهران، انیستیتو پاستور ایران، ساختمان بیوتکنولوژی پزشکی

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۵

چکیده

در طی تولید پروتئین نوترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی (hbFGF) ، این پروتئین شکل صحیح فضایی خود را از دست داده و به شکل نامحلول در سیتوپلاسم سلول رسوب می‌کند. این تجمع پروتئینی، انکلوژن بادی نامیده می‌شود که از نظر بیولوژیکی، غیرفعال است. تجمع پروتئینی، یکی از مشکلات اساسی در تولید پروتئین نوترکیب است. به منظورکاهش انکلوژن بادی و افزایش فرم محلول hbFGF در باکتری *E.coli*، از میان راه‌های مختلف، بیان همزمان ترکیبات مختلف چاپرون‌ها، با فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی را مورد ارزیابی قرار می‌دهیم. ترانسفورم جداگانه هر یک از پلاسمیدهای pG-Tf2وTF-16 به همراه pET-1008، بیان همزمان چاپرون‌ها و hbFGF، لیز سلولی توسط سونیکاسیون، مقایسه بخشه‌ای محلول و نامحلولhbFGF با تکنیک‌های SDS-PAGE، Western Blot و الایزا. نتایج نشان داد که چاپرون Trigger Factor (TF) به تنهایی، باعث افزایش hbFGF محلول می‌شود، در صورتی‌که این چاپرون در ترکیب با Gro EL، نه تنها باعث افزایش فرم محلول نمی‌شود، بلکه پروتئین هدف را تجزیه می‌کند. روند TF اتصال پروتئین هدف به Gro EL را تقویت می‌کند و سبب تجزیه hbFGF می‌شود، در صورتی‌که TF به تنهایی می‌تواند باعث فولدینگ hbFGF شود. نتایج، بیانگر تاثیر مثبت چاپرون TF بر فولدینگhbFGF و افزایش حلالیت این پروتئین است.

واژه های کلیدی: چاپرون Gro EL/Tig، چاپرون Tig ، فاکتور رشد فیبروبلاستی، *E.coli*، انسان

مقدمه

به دلیل امکان تهیه مقادیر بسیار ناچیز فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی (hbFGF) از منابع طبیعی و با توجه به کاربرد این فاکتور در تحقیقات بالینی، علوم پایه و صنایع دارویی، پژوهش‌های متعددی در زمینه تولید این فاکتور به صورت نوترکیب صورت گرفته است.

FGF2، دارای نقطه ایزوالکتریک pI=9.6 است. پیش‌ساز این فاکتور شامل ۱۵۵ اسیدآمینه است، ولی فرم فعال آن از۱۴۶ اسیدآمینه تشکیل شده است. FGF-2 از ۱۲ زنجیر بتا – Sheet به‌صورت آنتی پارالل تشکیل شده است. وجود چند کدون CUG در فرادست کدون اصلی شروع

www.SID.ir

Archive of SID

AUG، باعث ترجمه چندین ایزوفرم دیگر FGF-2 با وزن مولکولی بالاتر، از یک نوع mRNA می‌شوند.۴ ایزوفرم سنگین bFGF یعنی ایزوفرم‌های ۲۲ ,۲۲/۵ ,۲۴ ,۳۴ K D دارای ترادف nuclear localizingهستند که این فاکتور را به داخل هسته هدایت می‌کنند. در حالی که ایزوفرم ۱۸ KD فاقد این ترادف بوده و سیتوپلاسم، محل تجمع و فعالیت آن است. بیشتر گزارش‌ها روی فعالیت ایزوفرم KD ۱۸ متمرکز است. در واقع FGF-2 دارای طیف عمل گسترده‌ای روی سلول‌ها و بافت‌های مختلف است که در این تحقیق نیز، ایزوفرم سیتوپلاسمی مورد نظر است.

در طی تولید این پروتئین نوترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی (hbFGF)، این پروتئین شکل صحیح فضایی خود را ازدست داده و به شکل نامحلول در سیتوپلاسم سلول رسوب می‌کند. این تجمع پروتئینی، انکلوژن بادی نامیده می‌شود که از نظر بیولوژیکی غیرفعال است (۶-۱).

انکلوژن بادی‌ها ذرات الکترودنسی (electro-dense) هستند که هم در سیتوپلاسم و هم در فضای پری پلاسمیک *E.coli*، در جریان افزایش بیان پروتئین‌های نوترکیب ایجاد می‌شوند و این‌گونه تصور می‌شود که با بیان بالای پروتئین‌های غیرطبیعی و پروتئین‌های هیدروفوب، این پروتئین‌ها به صورت انکلوژن بادی در سلول تجمع پیدا می‌کنند (۵).

روش‌های مختلفی جهت کاهش تولید انکلوژن بادی استفاده شده است که از جمله می‌توان کاهش سرعت سنتز پروتئین‌ها، استفاده از پروتئین‌های فیوژن، موتاسیون در پروتئین هدف، شرایط مساعد کشت و بیان همزمان چاپرون‌های مولکولی را نام برد (۱،۶،۷).

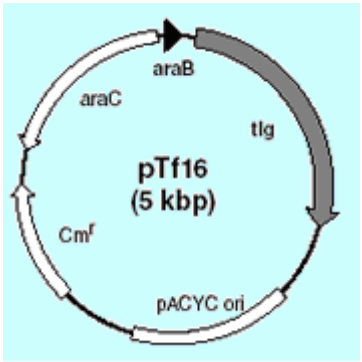
در این تحقیق به منظور افزایش فرم محلول hbFGF تولید شده در باکتری *E.coli*، از میان راه‌حل‌های موجود، بیان همزمان ترکیبات مختلف چاپرون‌ها با فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی مورد ارزیابی قرار گرفته است. مولکول‌های چاپرون، پروتئین‌های حفظ شده‌ای هستند که سایر پروتئین‌ها را به شکل مناسب فضایی در می آورند. در واقع این مولکول‌ها، قسمت‌های هیدروفوب را روی پروتئین‌هایی که شکل مناسب فضایی ندارند، شناسایی می‌کنند (۸).

بیست خانواده از این پروتئین‌ها وجود دارند که وزن مولکولی، ساختمان، عملکرد و جایگاه‌شان در سلول، متفاوت است. میزان این پروتئین‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای در نتیجه شوک حرارتی افزایش می‌یابد که این امر باعث محافظت سلول در برابر حرارت می‌شود (۹،۱۰).

جهت بررسی میزان تاثیر هر کدام از چاپرون‌ها، از دو پلاسمید با دو ترکیب چاپرونی متفاوت استفاده شد و با بیان همزمان ترکیبات مختلف چاپرون‌های GroEL/Tig و Tig با فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی در باکتری اشرشیاکلی، در نظر داشتیم تاثیر این ترکیبات را در جهت کاهش یا افزایش میزان کل پروتئین، فرم محلول و فرم نامحلول پروتئین هدف بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

وکتور pTf16: این پلاسمید با وزن مولکولی 5kbp، ناقل ژن *trigger factor* است. ژن مورد نظر در این پلاسمید، تحت کنترل پروموتور araB است. این چاپرون نیز با افزودن L-آرابینوز القا می‌شود و دارای ژن مقاومت به کلرآمفنیکل است. ساختار این پلاسمید، در شکل (۱) نشان داده شده است.



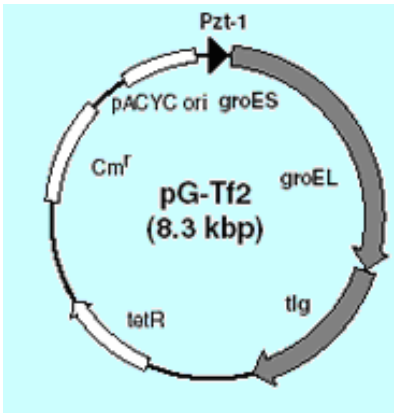
شکل ۱- ساختار پلاسمید بیانی pTf16.

وکتور pG-Tf2: این پلاسمید با وزن مولکولی 8.3kbp، علاوه بر ژن *trigger factor*، دارای ژن چاپرون *groEL/ES* نیز هست. ژن‌های مورد نظر در این پلاسمید، تحت کنترل پروموتور Pzt 1

www.SID.ir

Archive of SID

هستند. این چاپرون‌ها با افزودن تتراسایکلین القاء می‌شوند و دارای ژن مقاومت به کلرآمفنیکل نیز هستند. ساختار این پلاسمید، در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- ساختار پلاسمید بیانی pG-Tf2.

وکتور pET-1008: ژن cDNA-hbfgf، که در پلاسمید بیانی pET-22b کلون شده است .این پلاسمید از کمپانی Novogene خریداری شد.

ترانسفورم نمودن همزمان پلاسمیدهای چاپرون همراه با ساختار بیانی pET-1008

پلاسمیدهای بیان‌کننده چاپرون‌ها (pTf16 و pG-Tf2) از کمپانی TAKARA ژاپن خریداری شد. cDNA-*hbfgf* توسط ماساهارو سنو از دانشگاه اوکایامای ژاپن، تهیه و ارسال گردید. جهت آماده نمودن سلول‌های مستعد و انتقال پلاسمیدها به داخل سلول‌های OrigamiB (DE3)، ابتدا سلول‌ها در مجاورت کلرید کلسیم قرار داده شد و سپس با شوک حرارتی، مقدمات ورود پلاسمیدها (pET-1008) به همراه pTf16 یا pG-Tf2 به داخل سلول‌ها فراهم گردید. بدین صورت که کلسیم موجب اتصال DNA و رسوب آن روی سلول می‌شود و از طرف دیگر با تغییر درجه حرارت تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد، به ورود DNA به درون سلول کمک می‌کند. باکتری‌هایی که موفق به دریافت هر دو پلاسمید شده باشند، به علت وجود ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل موجود در پلاسمیدها، به‌وسیله کشت روی محیط LB آگار، حاوی آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل غربال می‌شوند (۱۱).

القا و بیان همزمان چاپرون‌ها و hbFGF در سلول *E. coli*

باکتری‌های حاوی پلاسمید چاپرون و ساختار بیانی pET-1008 در ml ۵ محیط کشت LB حاوی کلرامفنیکل (20mg/ml) و آمپی‌سیلین (50 mg/ml) در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. القاکننده‌های بیان مولکول‌های چاپرون (L-آرابینوز یا تتراسایکلین) از ابتدا، همزمان با آنتی‌بیوتیک‌ها، به محیط کشت افزوده شد (طبق پروتکل استفاده از این پلاسمیدها). وقتی OD در A600 به حدود ۰/۵ رسید (بعد از حدود ۳ ساعت)، سلول‌های واجد هر دو پلاسمید به‌وسیلهٔ IPTG ۰/۱ mM برای تولید hbFGF القا شدند. ۵ ساعت بعد از القا، انکوباسیون متوقف و سلول‌ها به‌وسیله سانتریفیوژ (۱ دقیقه، ۶۰۰۰ rpm) رسوب داده شدند. سپس بافر PBS به آن اضافه شد و عمل sonication برای شکست و لیز سلول‌ها انجام گردید.

استخراج و آنالیز پروتئین سلولی

رسوب سلول‌های القا شده، در بافر PBS(pH=۴/۷) حاوی ۲۵۰ µg/ml لیزوزیم، Mm ۰/۱ فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، EDTA 1Mm و Mm MgCl2 ۰/۵ مخلوط و سوسپانسیون حاصل، به مدت ۳۰ دقیقه در یخ نگهداری شد. بعد از گذشت ۳ ساعت، سوسپانسیون سلولی ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه سونیکه شد. محصولی را که بعد از سونیکاسیون به دست می‌آید، فراکشن کل پروتئین می‌نامند که مخلوطی از پروتئین‌های محلول در سیتوپلاسم و پروتئین‌های غیرمحلول مثل ذرات انکلوژن بادی است. برای جدا کردن پروتئین‌های محلول از پروتیئن‌های غیرمحلول از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس به بررسی بخش کل پروتئین به‌همراه فراکشن محلول و نامحلول پرداختیم. به‌منظور آنالیز تاثیر بیان همزمان ۲ ترکیب متفاوت از مولکول‌های چاپرون روی حلالیت و پایداری پروتئین هدف (hbFGF)، از تکنیک

www.SID.ir

Archive of SID

SDS-PAGE و ELISA (کیت الایزای اختصاصی hbFGF ساخت شرکت R&D) نیز استفاده شد.

وسترن بلاتینگ

این تکنیک بر اساس متد Towbin (آنزیم‌های اختصاصی شرکت Sigma) صورت گرفت (۱۲).

الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

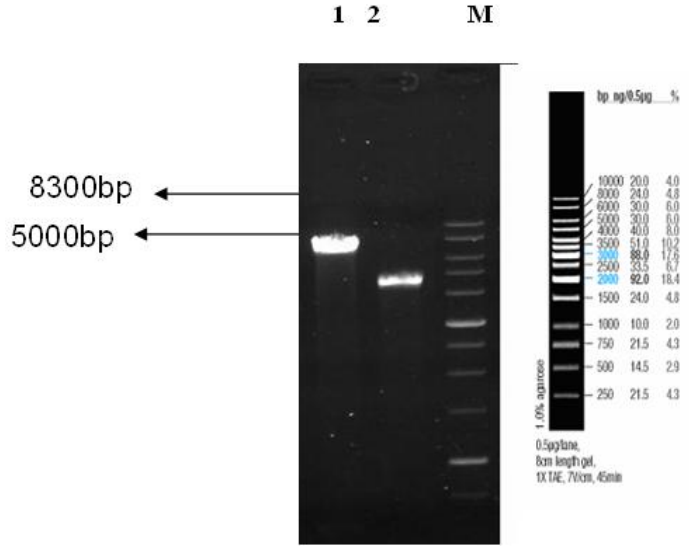
جهت اندازه‌گیری دقیق‌تر hbFGF تولید شده به فرم محلول و نامحلول و پروتئین کل، از تکنیک الایزا (کیت الایزای اختصاصی hbFGF ساخت شرکت R&D) استفاده شد.

نتایج

تایید حضور پلاسمید TF-16و pG-Tf2 در سلول به ترتیب با آنزیم محدود الاثر *Bgl II* و *Nde I*

پلاسمیدهای TF-16و pG-Tf2، در شروع کار هر کدام به طور جداگانه، به داخل باکتری Origami (DE3) ترانسفرم شد، که می‌بایست مورد ارزیابی اولیه قرار می‌گرفت.

اگر پلاسمیدها در داخل سلول باشند، محصول هضم آنزیمی، یک قطعه 5000bp برایTF-16 و یک قطعه 8300bp برای پلاسمید pG-Tf2 است که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود.

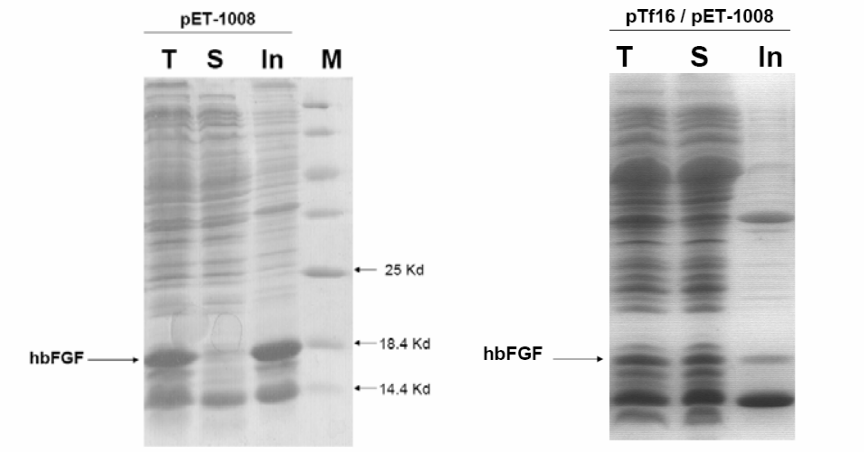


شکل ۳- ستون ۱: هضم آنزیمی TF-16 با *Bgl II*، ستون ۲: هضم آنزیمی pG-Tf2 با *Nde I*، ستون ۳: اوزان مولکولی.

بیان همزمان چاپرون tig و hbFGF در سلول Origami B (DE3) و مقایسه میزان hbFGF محلول و نامحلول تولید شده توسط تکنیک SDS-PAGE بعد از تهیه سلول مستعد، دو پلاسمید pTF-16 و pET-1008 (حامل ژن *tig* و *hbfgf*) به داخل سلول Origami B (DE3) ترانسفورم شدند. با کشت سلول‌های ترانسفورم شده روی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل، سلول‌های حامل هر دو پلاسمید، غربال شده و سپس با کشت یک تک‌کلنی در 5ml محیط LB مایع، القای بیانtrigger factor و hbFGF به ترتیب با افزودن L –آرابینوز و IPTG صورت گرفت. بعد از گذشت زمان کافی جهت بیان hbFGF، با لیز سلول‌ها، جداسازی بخش کل پروتئین سلول (عصاره سلولی) = Total proteins T.Pانجام شد. با سانتریفیوژ نمودن عصاره سلولی در دور 13000rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه، بخش محلول و بخش نامحلول، جدا و میزان hbFGF موجود در این بخش‌ها توسط

www.SID.ir

تکنیک SDS-PAGE و الایزا با هم مقایسه شد.



شکل ۴- SDS-PAGE. S: بخش محلول عصاره سلول، In: بخش نامحلول عصاره سلول، T: عصاره سلول الف) مقایسه بخش‌های محلول و نامحلول عصاره سلول‌های حاوی پلاسمیدهای pTF16 و pET-1008، ب)مقایسه بخش‌های محلول و نامحلول عصاره سلول‌های حاوی پلاسمید pET-1008 به تنهایی.

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، میزان hbFGF در بخش نا محلول عصاره سلول‌های حاوی پلاسمید pET-1008 به تنهایی بالا است. درحالی‌که با بیان همزمان Trigger factor به میزان بالا، hbFGF بیشتری در بخش محلول عصاره سلولی مشاهده می‌گردد و در عین حال، با کاهش hbFGF در بخش نا محلول، شاهد کاهش میزان hbFGF در عصاره سلول هستیم (شکل ۴).

بیان همزمان ترکیب چاپرونی GroEL- / tig ES باhbFGF در سلول و مقایسه بخش های محلول و نامحلول توسط SDS-PAGE

بعد از تهیه سلول مستعد، دو ساختار pG-Tf2و pET-1008 حامل ژن *tig/ GroEL-ES* و ژن *hbFGF*، به داخل سلول OrigamiB(DE3) ترانسفورم و در LB مایع ۵ میلی‌لیتری کشت داده شدند.

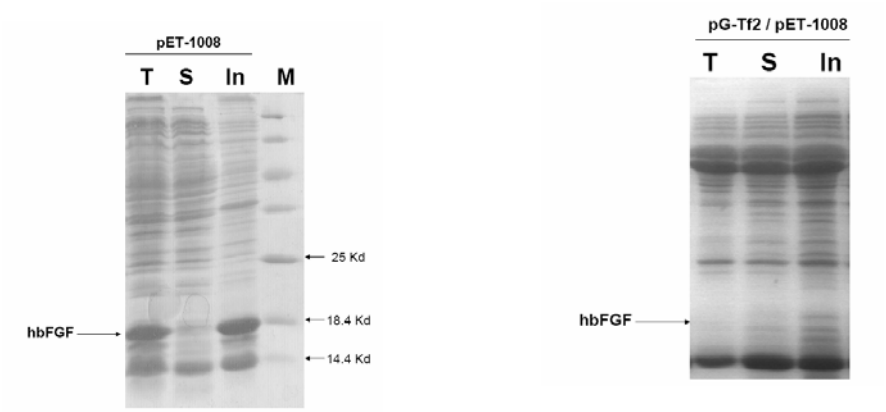
بعد از بیان پلاسمید pG-Tf2 توسط تتراسایکلین و پلاسمید pET-1008 توسط IPTG، جداسازی بخش کل پروتئینی Total proteins = T.P، بخش محلول و بخش نامحلول انجام شد و به‌وسیلهٔ تکنیک SDS-PAGE میزان بیان، مقایسه گردید و همچنین حضور هر دو پلاسمید در سلول تائید شد.

همانطور که در شکل (۵) مشاهده می‌شود، با توجه به شدت رنگ باند، میزان بخش نامحلول hbFGF در تستSDS-PAGE، در زمانی‌که hbFGF به تنهایی بیان می‌شود، بالا است.

بیان همزمان ترکیب چاپرونی-tig/ GroEL ES و فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی نه تنها باعث افزایش حلالیت و کاهش بخش نامحلول نشده است، بلکه موجبات تجزیه پروتئینhbFGF را نیز فراهم آورده است، به طوری که هیچ باندی روی ژل تشکیل شده، دیده نشد که نشان می‌دهد این ترکیب چاپرونی دارای اثر منفی بر روی پروتئین مورد نظر بوده است.

www.SID.ir

Archive of SID

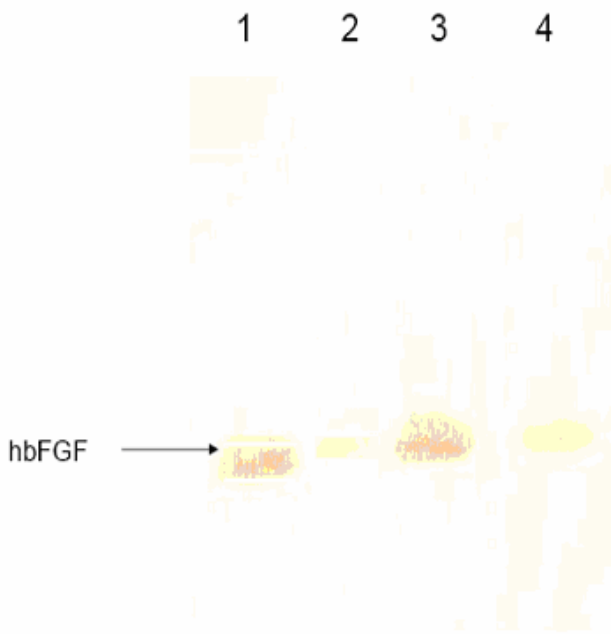


ب الف

شکل ۵- SDS-PAGE. S: بخش محلول عصاره سلول، In: بخش نامحلول عصاره سلول، T: عصاره سلول مقایسه الف) مقایسه بخش‌های محلول و نامحلول عصاره سلول‌های حاوی پلاسمیدهای pTF16 و pET-1008. ب) مقایسه بخش‌های محلول و نامحلول عصاره سلول‌های حاوی پلاسمید pET-1008 به تنهایی.

نتایج به‌دست آمده از وسترن بلاتینگ

پروتئین‌هایی که در مرحلهٔ قبل در داخل ژل SDS-PAGE به لحاظ اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی روی کاغذ نیتروسلولز (سایز ۰/۲ µm) انتقال داده شدند. نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ در شکل (۶) آمده است.



شکل ۶- آنالیز وسترن بلاتینگ. ستون ۱: pET-1008 OrigamiB(DE3)، ستون ۲: pET-1008/TF-16، ستون۳: hbFGF استاندارد، ستون۴: pET-1008/pGTf-2 .

مقایسه میزان بیان پروتئین با استفاده از الایزا

با استفاده از آزمایش الایزا که دارای حساسیت بسیار بالاتری نسبت به تست‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ است، نتایج دقیق‌تری به‌دست آمد. در ابتدا با استفاده از ارقام به‌دست آمده از سنجش OD_{450}نمونه استاندارد hbFGF در غلظت‌های مختلف، یک منحنی استاندارد ترسیم گردید. سپس با قرار دادن OD_{450} حاصل از تک تک سوش‌ها در منحنی استاندارد، عددی به دست آمد که با

www.SID.ir

Archive of SID

ضرب‌کردن آن در مخرج کسر رقت هر نمونه، مقدار هورمون برای هر یک مشخص شد (جدول۱).

جدول ۱ - نتایج حاصل از آزمون الایزا.

Expression system Soluble-Insoluble Fraction	Dilution rate	OD (450) nm	Volume(mg/l culture)
Origami B (DE3)/pET-1008/Insoluble	1/10000000	0.731	250
Origami B (DE3)/pET-1008, pTf16/Insoluble	1/1000000	0.656	22.07
Origami B (DE3)/pET-1008, pGtf2/Insoluble	1/100000	0.502	0.00
Origami B (DE3)/pET-1008/ Soluble	1/1000000	0.663	20.6
Origami B (DE3)/pET-1008, pTf16/Soluble	1/1000000	0.320	92
Origami B (DE3)/pET-1008, pGtf2/Soluble	1/100000	0.00	0.00
Origami B (DE3)/pET-1008 negative control	1/10000	0.00	0.00

جدول ۲ - مقادیر دقیق سنتز hbFGF در یک لیتر از محیط کشت سلول حاوی پلاسمیدهای چاپرون وhbFGF .

Expression system	**Dilution rate**	**OD (450)nm**	**Volume(mg/L)**
Origami B(DE3)/pET-1008	1/10000000	0.761	266
Origami B (DE3)/pET-1008, TF-16	1/1000000	0.632	110
Origami B (DE3)/pET-1008, pG-Tf2	1/100000	0.502	0.00
Origami B (DE3)/pET-1008 Negative control	1/10000	0.00	0.00

مقایسه بخش‌های محلول و نـامحلول hbFGF در سلول‌های حاوی پلاسمید pET-1008,TF-16 با استفاده از الایزا

نتیجه به‌دست آمده با استفاده از آزمون الایزا نشان می‌دهد که میزان حلالیت در غیاب TF-16، 20.6 mg/L است که این میزان در حضور چاپرون tig، 92 mg/L است.

به‌طور کلی درصد حلالیت (میزان حلالیت hbFGF به پروتئین کل) از ۷٪ به ۸۳٪ افزایش داشته است که می‌توان نتیجه گرفت حلالیت در این سیستم چاپرونی افزایش یافته است.

soluble hbFGF/ 20.6 /266 = %7

:total hbFGF×100 : درصد حلالیت پروتئین hbFGF در سیستم بیان‌کننده hbFGF به تنهایی

:soluble hbFGF/ total hbFGF×100 92/110=%83 :درصد حلالیت hbFGF در سیستم بیان‌کننده hbFGF در حضور چاپرون TF است. از سوی دیگر، مقدار پروتئین کل از 266 mg/L به 110 mg/L کاهش داشته است که نشان می‌دهد در کل، پایداری پروتئین هدف، کم شده است.

مقایسه بخش‌های محلول و نـامحلول hbFGF در سلول‌هـای حـاوی پلاسـمید pET-1008, pG-Tf2 با استفاده از الایزا

نتیجه به‌دست آمده با استفاده از آزمون الایزا نشان می‌دهد که میزان حلالیت در غیاب pG-Tf2، 20.6 mg/L است که این میزان در حضور چاپرون tig, GroEL-ES 0.0 mg/L است. می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیب چاپرونی، نه تنها باعث فولدینگ پروتئین نشده، بلکه سبب تجزیه پروتئین مورد نظر شده است. soluble 20.6 /266=%7

:hbFGF/ total hbFGF×100 : درصد حلالیت پروتئین hbFGF در سیستم بیان‌کننده hbFGF به تنهایی soluble hbFGF/ total 0.0/0=0.00

:hbFGF×100 درصد حلالیت hbFGF در سیستم بیان‌کننده hbFGF در حضور چاپرون tig, GroEL-ES است.

بحث

به علت تولید مقادیر کم hbFGF از منابع طبیعی مثل بافت‌های حیوانی و با توجه به کاربرد این فاکتور در تحقیقات کلینیکی، علوم پایه، صنعت

www.SID.ir

دارو و همچنین فواید این فاکتور در درمان زخم‌ها، آسیب‌های مغز استخوان، بیماری‌های پوستی مثل اسکلرودرما، زخم‌های معده، ایسکمی مغزی، پیوند رگ و بازسازی عدسی چشم، تحقیقات فراوانی در زمینه تولید این فاکتور به صورت نوترکیب انجام پذیرفته است (۱۵-۱۳،۷).

افزایش محصول یک پروتئین نوترکیب و دستیابی به ساختار صحیح و همچنین کاهش میزان رسوب پروتئین هدف در سلول در طی تولید، همیشه ذهن محققین را به‌خود معطوف ساخته است. بدین منظور طی سال‌های اخیر و با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک، روش‌های متعددی برای افزایش میزان حلالیت ابداع شده است. از جمله این روش‌ها کاهش سرعت سنتز پروتئین‌ها، استفاده از پروتئین‌های فیوژن، موتاسیون در پروتئین هدف، شرایط مساعد کشت و بیان همزمان چاپرون‌های مولکولی است (۶).

استفاده از روش بیان همزمان چاپرون‌ها به منظور روند به‌وجود آوردن شکل صحیح پروتئین‌های نوترکیب، با وجود کارایی خوب هنوز در مرحله آزمون و خطاست (۱۶).

Takashi Yura در سال ۱۹۹۹، اثر چاپرون TF را روی اندوستاتین موش (endostatin) مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد با بیان بالای TF، اندوستاتین بیشتر به فرم محلول تولید شده و این افرایش، با کاهش میزان آن به فرم نامحلول همراه بود (۱۷). تاثیر trigger factor روی پروتئین نوترکیب ORP150، (پروتئین تنظیم‌کننده اکسیژن انسانی) نیز توسط همین محقق بررسی شده که نتایج، نشان‌دهنده تاثیر مثبت TF روی فولدینگ و تولید این پروتئین به فرم محلول است (۱۷).

در این پروژه نیز همین نتیجه از تاثیر TF روی hbFGF به‌دست آمد که با نتایج این محقق در باره تاثیر TF روی پروتئین‌های نوترکیب اندوستاتین موش و ORP150 همسویی نشان می‌دهد، به طوری‌که در بررسی با تکنیک SDS-PAGE، hbFGF بیشتر به فرم محلول تولید شده و همچنین این افزایش، با کاهش میزان آن به فرم نامحلول همراه بود.

این امر نشان می‌دهد که چاپرون TF، روی فولدینگ و تولید این پروتئین به فرم محلول تاثیر مثبت دارد.

نتایج آزمایش‌های وسترن بلاتینگ و الایزا نیز تائیدکننده نتایج SDS-PAGE بود، به‌طوری که درصد حلالیت hbFGF، از 7% به 83% افزایش داشت.

اما در مورد ترکیب چاپرونی TF با GroEL ، محققین مذکور، اثر این ترکیب را روی اندوستاتین موش مورد ارزیابی قرار دادند و متوجه شدند که این ترکیب چاپرونی، باعث افزایش حلالیت اندوستاتین موش می‌شود (۱۷).

از طرفی مشخص شد که TF در فولدینگ پروتئین نقش دارد و علاوه بر آن، این چاپرون همراه با GroEL می‌تواند اتصال GroEL به سوبسترا را تقویت کند یا باعث فولدینگ پروتئین و یا تجزیه آن می‌شود (۱۷).

این محققین با استفاده از همین ترکیب، تاثیر آن را بر پروتئین ORP150 بررسی کردند و متوجه شدند که پروتئین مورد نظر بیشتر به فرم محلول است. این نتیجه نشان می‌داد که TF و GroEL-ES در جلوگیری از تجمع ORP150 در شرایط آزمایش، با یکدیگر همکاری می‌کنند (۱۷).

اما در این مطالعه، نتایجی همسو با نتایج Takashi Yura به‌دست نیامد، به طوری‌که ترکیب چاپرونی TF و GroEL، نه تنها باعث افزایش حلالیت hbFGF نشد، بلکه این پروتئین را تجزیه کرد. در بررسی‌ها توسط SDS-PAGE نیز عملاً باندی در بخش محلول و بخش کل پروتئین دیده نشد و نتیجه حاصل از وسترن بلاتینگ و الایزا نیز

www.SID.ir

Archive of SID

تائیدکننده نتایج SDS-PAGE بود. به طوری که درصد حلالیت از 7% به صفر کاهش داشت.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان عنوان کرد، پلاسمید TF-16 که شامل ژن چاپرون TF است، با بیان همزمان با hbFGF، باعث افزایش حلالیت پروتئین مورد نظر و کاهش میزان انکلوژن بادی در سلول میزبان می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Mitiraki, A., Fane, B., Hasse-Pettingel, C., Sturtevent, J., King, M., 1991. Suppression of protein folding defects and inclusion body formation. Science J Global 253: 54-58.
2. Mirzahoseini, H., 2004. Differential expression of human basic fibroblast growth factor in *Escherichia coli*: potential role of promoter. World J Microbiology and Biotechnology 20: 161-165.
3. Davidson, J. M., Klagsbrun, M., Hill, K. E., Buckly, A. M., Sullivan, R., 1985. Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor. J Cell Biol 100: 1219-1227.
4. Baneyx, F., Mujacic, M., 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol 22: 1399-1408.
5. Bowden, G. A., Paredes, A. M., Georgiou, G., 1991. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Bio Technology 9: 725-730.
6. Betiku, E., 2006. Molecular chaperones involved in heterogonous protein folding in *Escherichia coli*. Biotechnology Review 1: 66–75.
7. Fourtanier, A. Y., Courty, D. P. J., Muller, E., Cortoi, D. P. Y., 1986. Protein folding: progress made and promises ahead. J Invest Dermatol 87: 76-80.
8. Baneyx, F., Plumbo, J. L., 2003. Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. Methods Mol Biol 205: 171-197.
9. Bukau, B., Horwich, A. L., 1998. The Hsp70 and Hsp 60 chaperone. Cell 92: 351-366.
10. Radford, S. E., 2000. Protein folding: progress made and promises ahead. Trends Biochem Sci 25: 611-618.
11. Berck, J. M., Caldwell, G. A., Zachgo, E. A., Second edition. Biotechnology a laboratory course. *Academic press.*
12. Towbin, H., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. Proc Natl Acad Sci 76: 4350.
13. Yamanaka, K., Inaba, T., Nomura, E., Hurwitz, D., Jones, D. A., Hakamada, A., Isoda, K., Kupper, T. S., Mizutani, H., 2005. Basic fibroblast growth factor treatment for skin ulcerations in scleroderma. Cutis 76: 373-376.
14. Davidson, J. M., Klagsbrun, M., Hill, K. E., Buckly, A. M., Sullivan, R., 1985. Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor. J Cell Biol 100: 1219-1227.
15. Rinas, U., Hoffmann, F., 2004. Roles of heat shock chaperone in the production of recombinant roteins in *Escherichia coli*. Biochem Engin Biotechno l89: 143-161.
16. Anspach, F. B., 1995. Purification of recombinant human basic fibroblast growth factor: stability of selector sorbents under cleaning in place conditions. J Chromatography A 71: 129-139.
17. Takashi, Y., Kazuyo, N., Msaki, K., Hideki, Y., 1999. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Enviromental Microbiology 23: 884-889.
18. Ventur, S.,Villaverde, A., 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. Trends Biotechnol 24: 179-185.
19. Rinas, U., 2007. Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 127: 244- 257.

www.SID.ir