

بیان همزمان ترکیب چاپرون‌های GroEL / GroES و GroEL / GroES / Dnak / Dnaj / GrpE با فاکتور رشد فیبرو بلاستی بازی انسانی در باکتری اشرشیاکلی به منظور کاهش پروتئین‌های نامحلول نو ترکیب

فرزانه مشتاقی نهی^{۱*}، حسن میرزا حسینی^۲، مونا علی بلندی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۲. استادیار بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

مکان انجام تحقیق: تهران، انستیتو پاستور ایران، ساختمان بیوتکنولوژی پزشکی

مسئول مکاتبات: فرزانه مشتاقی نهی، ایران، تهران، خیابان نامجو، ده متری سلمان فارسی، نبش کوچه ملی، پلاک ۲۴۷، واحد ۸، کد پستی: ۱۶۱۶۱۷۳۴۴۱ تلفن منزل: ۰۲۱۷۷۵۸۰۶۸۱، تلفن همراه: ۰۹۱۲۷۱۹۰۵۳۸، پست الکترونیکی: Moshtaghfar@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۷/۱۹

چکیده

روش‌های مختلفی برای توقف یا کاهش تشکیل تجمع‌های سیتوپلاسمی که طی تولید پروتئین‌های نو ترکیب ایجاد می‌شوند پیشنهاد شده است. یکی از آنها بیان همزمان چاپرون‌های ملکولی با این پروتئین‌ها می‌باشد. این چاپرون‌های ملکولی، باعث فولدینگ مناسب پروتئین‌های تازه سنتز شده می‌شوند و از تجمع آنها جلوگیری می‌کنند. در طرح حاضر، برای کاهش میزان پروتئین‌های نامحلول فاکتور رشد فیبرو بلاستی بازی انسانی hbFGF از بیان همزمان تعدادی از چاپرون‌ها استفاده شد. جهت بررسی میزان تأثیر هر کدام از چاپرون‌ها در کاهش میزان پروتئین‌های هدف نامحلول و مقایسه آنها با یکدیگر، از دو پلاسمید pG-KJE8 دارای ترکیب چاپرون-GroEL / GroES / Dnak / Dnaj / GrpE و pGro7 دارای چاپرون‌های GroEL / GroES استفاده شد. پس از بیان همزمان این چاپرون‌ها با پروتئین hbFGF میزان پروتئین محلول تولید شده با استفاده از تکنیکهای SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ و الیزا اندازه‌گیری شد. نتایج بدست آمده نشان داد که بیان همزمان ترکیب چاپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / Dnaj / GrpE بیشتر از چاپرون‌های GroEL / GroES به تنهایی می‌تواند باعث کاهش پروتئین‌های هدف نامحلول شود. انتخاب ترکیب چاپرونی مناسب می‌تواند نقش مهمی را در افزایش پایداری و یا فولدینگ صحیح پروتئین‌های نو ترکیب ایفاء کند. خانواده Dnak نقش مهمی را در فولدینگ پروتئین هدف و افزایش فرم محلول آن دارد، در حالیکه چاپرون‌های GroEL با افزایش پایداری rhbFGF باعث افزایش تجمع آن و بالطبع افزایش میزان کل hbFGF تولید شده می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: hbFGF، چاپرون‌های ملکولی، فولدینگ

مقدمه

بیماری‌ها مثل آلزایمر و پارکینسون به دست آمده است (۱ و ۲). اگر چه این عامل رشد ابتدا از هیپوفیز گاو به دست آمد، لیکن تولید آن به وسیله بسیاری از انواع سلول‌ها و بافت‌های گاو مثل مغز، هیپو تالاموس، کلیه، تیموس و غده آدرنال به اثبات رسیده و از این بافت‌ها تخلیص شده است (۳).

استفاده از bFGF انسانی hbFGF به عنوان یک عامل درمانی در بهبود بیماری Ischemic Cardiovascular بسیار امیدوارکننده بوده است. به علاوه پیشرفت‌های زیادی در مورد نقش این عامل رشد در ترمیم بافت‌ها و بهبود گروهی دیگر از

جلوگیری از تجمع آن‌ها در شرایط نرمال و استرسی تحت فشار است (۸).

سیستم‌های چارپرونی hsp60 و hsp70 می‌توانند با باز کردن پروتئین‌هایی که فولد اشتباه دارند، از طریق یک مسیر وابسته به ATP، وارد عمل شوند (۹). trigger factor TF، سیستم‌های چارپرونی Dnak و GroEL، چارپرون‌هایی هستند که در فولدینگ پروتئین‌ها نقش دارند (۱).

در مقاله حاضر، اثر دو ترکیب مختلف از چارپرون‌ها را در افزایش میزان پروتئین hbFGF محلول، مورد بررسی و مقایسه قرار دادیم. بدین منظور، دو پلاسمید چارپرونی pG-KJE8 و pGro7 دارای ترکیب چارپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / GrpE / Dnaj و چارپرون‌های GroEL / GroES را به طور جداگانه به داخل سلول OrigamiBDE3 انتقال داده، سپس پلاسمید pET-1008 را به داخل سلول‌های حامل پلاسمید چارپرونی انتقال دادیم. پس از القا و بیان همزمان پروتئین‌های hbFGF با چارپرون‌های ملکولی، بررسی‌ها توسط SDS-PAGE، و سترن بلاتینگ و الایزا انجام شد.

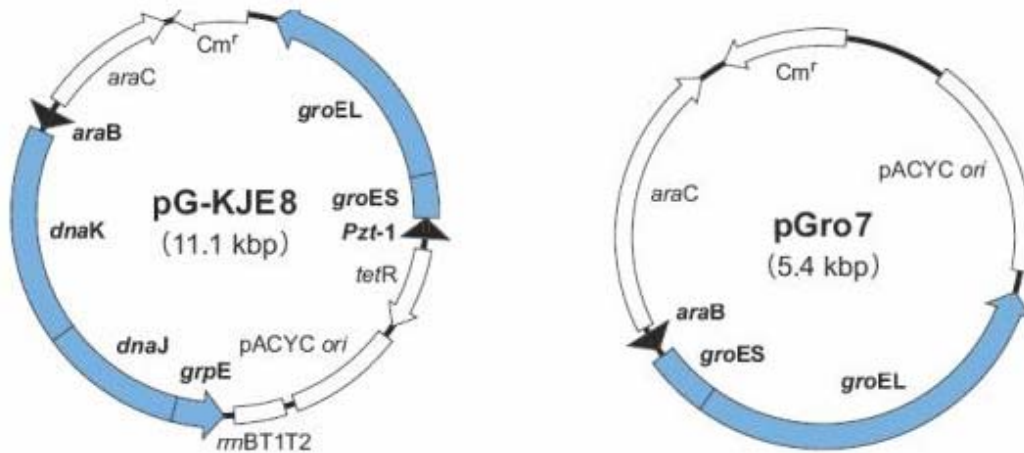
مواد و روش‌ها

تهیه سلول‌های مستعد competent cell و انتقال پلاسمیدهای pGro7 و pG-KJE8 به داخل سلول‌های OrigamiB DE3

ساختار پلاسمیدهای چارپرونی pG-KJE8 و pGro7 که از کمپانی TAKARA ژاپن خریداری شدند در تصویر ۱ قابل مشاهده است. جهت تهیه سلول‌های مستعد OrigamiB DE3 ابتدا آن‌ها را با قرار دادن در مجاورت کلرید کلسیم و شوک حرارتی برای پذیرش پلاسمیدها آماده کردیم (۱۰، ۱۱). پس از انتقال پلاسمیدها، محصول را روی پلیت آگار حاوی کلرامفنیکل کشت دادیم تا به علت وجود ژن مقاومت به کلرامفنیکل در این پلاسمیدها فقط کلنی‌های واجد پلاسمید چارپرونی بر روی آن رشد نمایند.

به دلیل امکان تهیه مقادیر بسیار ناچیز فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی انسانی hbFGF با منشأ 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 (۴). در طی تولید hbFGF نوترکیب در باکتری E.coli، مقادیر زیادی از این پروتئین به صورت نامحلول انکلوژن بادی تولید گردید (۵). انکلوژن بادی‌ها تجمع‌های پروتئینی هستند، که اغلب طی تشکیل پروتئین‌های نوترکیب ایجاد می‌شوند. به طور کلی، همیشه مشکلات احتمالی زیادی در تلاش برای بیان ژن‌های هتروولوگوس در E.coli و میزبان‌های دیگر وجود داشته است. معمول‌ترین مشکلی که در این فرایند با آن رو به رو می‌شویم، تشکیل انکلوژن بادی‌هاست. افزایش محصول یک پروتئین نو ترکیب و دستیابی به ساختار صحیح و همچنین کاهش میزان رسوب پروتئین هدف در سلول در طی تولید، همیشه ذهن محققین را به خود معطوف ساخته است. بدین منظور طی سال‌های اخیر و با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک، شیوه‌های متعددی برای افزایش میزان حلالیت ابداع شده است که از آن جمله می‌توان تغییر سرعت سنتز پروتئین‌ها، استفاده از پروتئین‌های فیوژن، موتاسیون در پروتئین هدف، شرایط مساعد کشت و بیان همزمان چارپرون‌های ملکولی را نام برد (۶).

فولدینگ ابتدایی پروتئین‌ها و تجمع کمپلکس‌های پروتئینی، نیاز به مشارکت ملکول‌های چارپرون دارد. این ملکول‌ها با اتصال به قسمت‌های آب‌گریز بر روی پروتئین هدف، از تجمع آن‌ها به شکل نامحلول و غیرفعال انکلوژن بادی جلوگیری کرده و به پروتئین‌ها کمک می‌کنند که شکل طبیعی پایدارشان را به دست آورند (۷). چارپرون‌های ملکولی، تشکیل خانواده بسیار بزرگ و متنوعی را داده‌اند که براساس اندازه ملکولی طبقه بندی می‌شوند. عمل مشترک اکثر آن‌ها نگهداری پلی پپتیدهای Non-native، به صورت Intermediate درحالتی مستعد برای شکل‌پذیری مناسب و



تصویر ۱- ساختار پلاسمیدهای pGro7 و pG-KJE8.

القا و بیان همزمان hbFGF و hspها در *E.coli*

باکتری‌های حاوی پلاسمید چاپرونی و پلاسمید pET-1008 در ۵ ml محیط کشت LB مایع واجد آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل جهت غربال سلول‌های حاوی هر دو پلاسمید مذکور و-L-Arabinose و تتراسایکلین جهت القای بیان مولکول‌های چاپرون در دمای ۳۷°C کشت داده شدند. زمانی که OD در A₆₀₀ به حدود ۰/۵ رسید، IPTG را برای ابراز hbFGF اضافه نمودیم. ۵ ساعت بعد از عمل القا، آنکوباسیون متوقف و سلول‌ها به وسیله سانتریفوژ ۱ دقیقه، ۶۰۰۰×rpm جمع آوری شدند.

استخراج پروتئین سلول

۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر لیز کننده شام 50 mM بافر فسفات با pH 7.2 دارای 0.1 Mm متیل سولفونیل فلوراید 0.5mM، PMSF، EDTA 1mM، MgCl₂ و lysosyme 250µg/ml را به هر کدام از رسوب‌های سلولی اضافه کرده و نیم ساعت در یخ قرار دادیم و سپس عمل سونیکاسیون، برای شکستن دیواره باکتری و آزاد کردن پروتئین‌ها، به مدت ۳۰ ثانیه با فواصل زمانی ۱ دقیقه برای تمام نمونه‌ها اعمال شد.

هضم آنزیمی پلاسمیدهای pGro7 و pG-KJE8

جهت اثبات انتقال، ابتدا پلاسمیدها با استفاده از کیت، تخلیص شدند. سپس هضم آنزیمی پلاسمید pG-KJE توسط آنزیم NdeI و هضم آنزیمی پلاسمید pGro7 توسط آنزیم Bgl II انجام شد. نقشه ژنتیکی این پلاسمیدها در دسترس نیست و سایت برش دو آنزیم مذکور بعد از مکاتبه با شرکت TAKARA توسط این شرکت معرفی شد. محصول هضم آنزیمی به همراه DNA ladder شرکت فرمنتاز روی ژل آگارز ۱ درصد لود شدند و بعد از اتمام الکتروفورز، محل هر باند DNA پلاسمیدی با اندازه‌های متفاوت با قرار دادن ژل بر روی دستگاه ترانس لومیناتور که نور فرابنفش UV را به ژل می‌تاباند، مشخص گردید.

تهیه سلول‌های مستعد و انتقال پلاسمید

pET-1008 به داخل سلول‌های OrigamiB

DE3 حاوی پلاسمیدهای چاپرونی

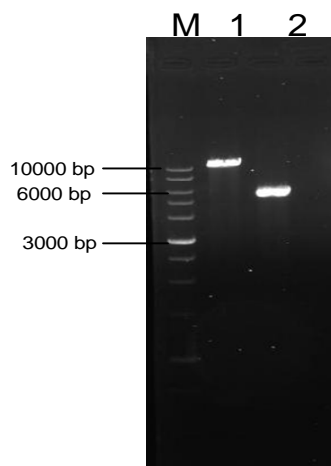
سلول‌های مستعد، تهیه و ترانسفورمیشن پلاسمید pET-1008 انجام شد محصول را روی پلیت آگار حاوی کلرامفنیکل و آمپی‌سیلین کشت دادیم تا فقط کلنی‌های واجد پلاسمید چاپرونی و پلاسمید pET-1008 روی آن رشد نمایند.

آنتی ژن و نیز غلظت آن است، توسط یک دستگاه اسپکتروفتومتر، تعیین و ثبت می‌شود (۱۲).

نتایج

تأیید انتقال پلاسمیدهای pG-KJE8 و pGro7 به داخل سلول‌های OrigamiB DE3 توسط هضم آنزیمی

با استفاده از آنزیم‌های *Nde I* و *Bgl II*، هضم آنزیمی پلاسمیدهای pG-KJE8 و pGro7 انجام شد. قطعات پلاسمیدی pGro7 با اندازه ۵۴۰۰ bp و pG-KJE8 با اندازه ۱۱۱۰۰ bp بر روی ژل مشاهده شد (تصویر ۲).



تصویر ۲- ستون ۱: پلاسمید pG-KJE8 که با آنزیم *NdeI* برش خورده است؛ ستون ۲: پلاسمید pGro7 که با آنزیم *Bgl II* برش خورده است. M: DNA ladder

نتایج به دست آمده از الکتروفورز یک بعدی

پروتئین‌های بیان شده SDS-PAGE

پلاسمید pG-KJE8، چاپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / Dnaj / GrpE تحت کنترل پروموتور *Ptz1* و پروموتور *araB* بیان می‌کند. از این پلاسمید به منظور بررسی تاثیر بیان همزمان این ترکیب چاپرونی با فاکتور رشد فیبروبلاستی استفاده شد. همان گونه که در تصویر ۳ مشاهده می‌شود، تولید پروتئین‌های hbFGF محلول در سلول‌هایی که دارای هر دو پلاسمید pG-KJE8 و pET-1008 هستند، نسبت به

محصولی که بعد از سونیکاسیون به دست می‌آید کل پروتئین است که مخلوطی از پروتئین‌های محلول و نامحلول در سیتوپلاسم است. برای جدا کردن پروتئین‌های محلول از پروتئین‌های نامحلول، از سانتریفیوژ با دور $13000 \times \text{rpm}$ به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. جهت بررسی تاثیر بیان همزمان دو ترکیب مختلف از ملکول‌های چاپرون بر روی میزان حل‌الیت پروتئین هدف hbFGF، از روش SDS-PAGE، وسترن بلاتینگ آنزیم‌های اختصاصی شرکت Sigma و ELISA کیت الایزای اختصاصی hbFGF ساخت شرکت R&D استفاده شد.

وسترن بلاتینگ

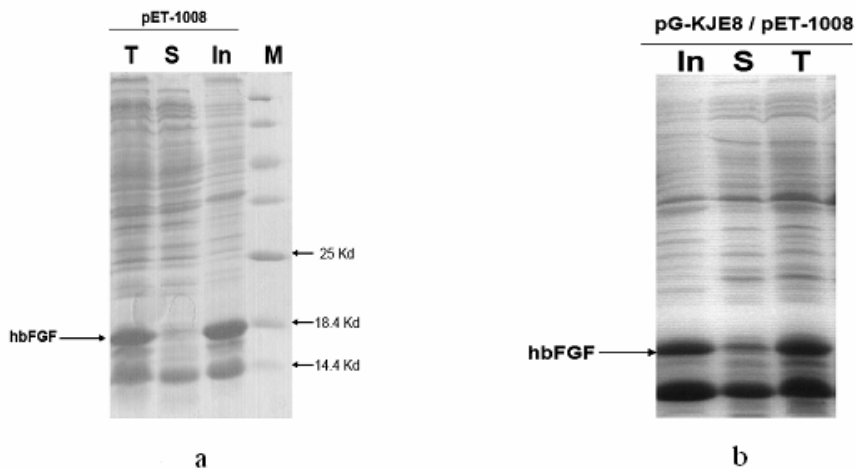
روش وسترن بلاتینگ یکی از روش‌های بسیار دقیق و کارآمد امروزی، با حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاست. با استفاده از این روش می‌توانیم پروتئین خاصی را در میان مجموعه‌ای از پروتئین‌ها تشخیص داده و همزمان وزن مولکولی آن را به دست آوریم. پروتئین‌هایی که در داخل ژل PAGE - SDS به لحاظ اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی بر روی کاغذ نیترو سلولز انتقال می‌یابند. وسترن بلاتینگ برای انتقال پروتئین‌های تفکیک شده بر روی ژل الکتروفورز به غشا استفاده می‌شود. پس از انتقال پروتئین‌ها به غشا، از آنتی بادی‌ها برای مشخص کردن آن‌ها استفاده می‌شود (۱۲).

الایزا

پایه اساسی آزمون الایزا بر اساس واکنش آنتی‌بادی با آنتی ژن است. در آزمون‌های الایزا، یک آنتی‌بادی اختصاصی با یک آنتی ژن مشخص، واکنش می‌دهد و سپس با استفاده از یک آنتی‌بادی اتصال یافته با یک آنزیم به عنوان سیستم نشانگر، آزمون ادامه می‌یابد و در نهایت، با افزودن سوبسترای آنزیم و تبدیل سوبسترا به محصول که یک ماده رنگی است آزمون الایزا به پایان می‌رسد. طول موج رنگ به دست آمده که نشانگر حضور یک آنتی‌بادی و یا

می‌باشند، بالاتر است.

سلول‌هایی که فقط پلاسمید pET-1008 را دارند



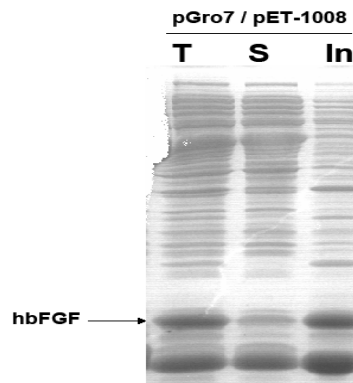
تصویر ۳- الکتروفورز یک بعدی 18% SDS-PAGE. a: سلول Origami BDE3 حاوی پلاسمید pET-1008؛ b: سلول OrigamiBDE3 حاوی پلاسمیدهای pG- KJE8 و pET-1008؛ In: پروتئین‌های نامحلول عصاره سلولی؛ S: پروتئین‌های محلول عصاره سلولی؛ T: کل پروتئین‌های عصاره سلولی؛ M: مارکر وزن ملکولی.

پروتئین‌های محلول عصاره سلولی؛ T: کل پروتئین‌های عصاره سلولی؛ M: مارکر وزن ملکولی.

پلاسمید pGro7، چاپرون‌های GroEL و GroES را تحت کنترل پروموتور araB بیان می‌کند و از این پلاسمید به منظور بررسی تاثیر بیان همزمان این چاپرون‌ها با فاکتور رشد فیبروبلاستی استفاده شد. همان طور که در تصویر ۴ مشاهده می‌شود، تولید پروتئین‌های hbFGF محلول در سلول‌هایی که دارای پلاسمیدهای pGro7 و pET-1008 هستند، نسبت به سلول‌هایی که فقط پلاسمید pET-1008 را دارند، به میزان کمی بالا رفته است. میزان Total proteins نیز تا حدودی افزایش یافته است که در نهایت تغییر قابل ملاحظه-ای را در میزان پروتئین‌های محلول نشان نمی‌دهد.

نتایج به دست آمده از وسترن بلاتینگ

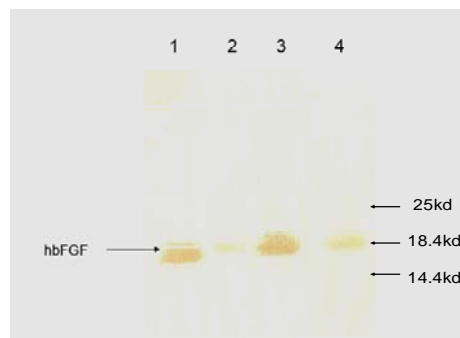
به منظور بررسی بیان پروتئین نو ترکیب، از روش حساس و اختصاصی وسترن بلاتینگ استفاده شد. در این روش، حتی مقادیر جزئی از پروتئین هدف، قابل شناسایی است. این روش، ردیابی تنها باند پروتئینی مربوط به hbFGF را امکان‌پذیر می‌سازد. جهت تأیید بیان پروتئین‌های هدف توسط هر دو نوع سلول حامل پلاسمیدهای pG-KJE8 و pGro7، بعد از کشت و القا، کل پروتئین‌ها را جدا کرده و پس از انجام SDS-PAGE نمونه‌ها، بر اساس متد Towbin ۱۳، پروتئین‌هایی که در داخل ژل SDS-PAGE برحسب اندازه از یکدیگر جدا شده بودند، با استفاده از ولتاژ الکتریکی بر روی کاغذ نیترو سلولز سایز $0.2 \mu\text{m}$ انتقال داده شدند. نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ در تصویر ۵ آمده است.



تصویر ۴- الکتروفورز یک بعدی 18% SDS-PAGE. سلول Origami BDE3 حاوی پلاسمیدهای pGro7 و pET-1008؛ In: پروتئین‌های نامحلول عصاره سلولی؛ S: پروتئین‌های محلول عصاره سلولی؛ T: کل پروتئین‌های محلول عصاره سلولی.

مقایسه میزان پروتئین‌های hbFGF محلول، نامحلول و تام با استفاده از الایزا

با استفاده از آزمایش الایزا که دارای حساسیت *sensitivity* بسیار بالاتری نسبت به آزمون‌های SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ است، نتایج دقیق‌تری به دست آمد. در ابتدا با استفاده از ارقام به دست آمده از سنجش OD₄₅₀ نمونه استاندارد hbFGF در غلظت‌های مختلف، یک منحنی استاندارد ترسیم گردید. سپس با قرار دادن O.D₄₅₀ حاصل از هر یک از ساختارها در منحنی استاندارد، عددی به دست آمد که با ضرب کردن آن در مخرج کسر رقت هر نمونه، مقدار پروتئین برای هر یک مشخص شد. نتایج حاصل از آزمون الایزا در جدول ۱ آمده است.



تصویر ۵- آنالیز وسترن بلاتینگ. ستون ۱: سلول
Origami BDE3 حاوی پلاسمید pET-1008؛ ستون ۲:
hbFGF خالص؛ ستون ۳: سلول Origami BDE3
پلاسمیدهای pGro7 و pET-1008؛ ستون ۴: سلول
Origami BDE3 حاوی پلاسمیدهای pG-KJE8 و pET-
1008.

جدول ۱- نتایج حاصل از آزمون الایزا

Expression system Soluble Fraction/ Insoluble /Total	Dilution rate	OD 450 nm	Volume mg/l culture
OrigamiBDE3 / pET-1008 Insoluble	1/10000000	0.731	250
OrigamiBDE3 / pET-1008/ Soluble	1/1000000	0.663	22.4
OrigamiBDE3 / pET-1008,pG-KJE8 Insoluble	1/10000000	0.711	240
OrigamiBDE3 / pET-1008,pGro7/ Insoluble	1/10000000	0.765	271
OrigamiBDE3 / pET-1008, pGro7 Soluble	1/1000000	0.799	27.9
OrigamiBDE3 / pET-1008 Total	1/10000000	0.761	266
OrigamiBDE3 / pET-1008, pGro7 Total	1/10000000	0.773	271
OrigamiBDE3 / pET-1008,pG-KJE8 Total	1/10000000	0.711	240
OrigamiBDE3 / pET-1008 negative control	1/10000	0.00	0.00

GrpE / باعث فولدینگ پروتئین هدف و افزایش میزان حلالیت شده است.

نتایج حاصل از الایزا نیز با حضور پلاسمید pGro7 نشان می‌دهد که میزان بیان پروتئین‌های محلول، 27.9 mg/L شده است و میزان Total protein به 271 mg/L رسیده است. به دلیل افزایش میزان کل پروتئین، به طور کلی افزایش کمتری با حضور این پلاسمید در میزان حلالیت پروتئین‌ها به دست آمده است. بنابراین، ترکیب چاپرون‌های GroEL / GroES، کمتر از ترکیب

نتایج حاصل از الایزا نشان می‌دهد که میزان بیان پروتئین‌های محلول در- pET- / OrigamiBDE3 1008 بدون حضور پلاسمید چاپرونی، 22.4 mg/L است که با حضور پلاسمید pG-KJE8، 30.7mg/L به میزان Total protein رسیده است. میزان protein بدون پلاسمیدهای چاپرونی، 266 mg/L است، در حالیکه با حضور پلاسمید pG-KJE8، 240 mg/L کاهش یافته است. بنابراین، ترکیب چاپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / Dnaj

چاپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / Dnaj / GrpE / باعث فولدینگ پروتئین هدف و افزایش میزان حلالیت شده است.

بحث

امروزه از hbFGF در درمان زخم‌ها، آسیب‌های مغز استخوان، بیماری‌های پوستی مثل اسکلرودرما، زخم‌های معده، ایسکمی مغزی، پیوند رگ و بازسازی عدسی چشم استفاده می‌شود (۱۴).

در مطالعه قبلی میرزاحسینی (۵)، برای افزایش بیان hbFGF، اقدام به کاهش درصد نوکلئوتیدهای GC در ناحیه N ترمینال cDNA ژن این فاکتور رشد گردید و سیستم بیانی مناسبی برای این فاکتور ایجاد شد که به مقدار قابل توجهی پروتئین نوترکیب hbFGF را تولید می‌کرد، ولی مقدار زیادی از پروتئین‌های نوترکیب تولید شده به صورت نامحلول و درانکلوزن بادی‌ها موجود بودند (۱۵). هدف ما در این پروژه آن بود که با بیان همزمان چاپرون‌ها با فاکتور رشد فیبروبلاستی hbFGF، این پروتئین را بیشتر به شکل محلول یا فعال از نظر بیولوژیکی تولید نماییم.

بررسی میزان تاثیر پروتئین‌های شوک حرارتی خانواده‌های sHSP، hsp70 و hsp60 که نقش فعالی در تحمل شرایط استرسی مثل شوک حرارتی و تولید زیاد پروتئین‌های خارجی دارند، بر روی اشکال محلول و نامحلول پروتئین‌های نوترکیب، قابل توجه بسیاری از محققین بوده و هست. استفاده از روش بیان همزمان Co-expression چاپرون‌ها به منظور تسهیل روند فولدینگ صحیح پروتئین‌های نوترکیب، با وجود کارایی خوب، هنوز در مرحله آزمون و خطا trial & error قرار دارد؛ به طوری که حتی ممکن است انتخاب چاپرون نامناسب، اثرات منفی شدیدی بر پایداری محصول و نیز ادامه حیات سلول میزبان داشته باشد (۱۷). در سال ۱۹۹۸، GroEL-ES و DnaK را با پروتئین Cryj2 به طور همزمان بیان کردند و متوجه پایداری مشخص Cryj2 و کاهش تجمع انکلوزن بادی‌ها شدند (۱۸).

در سال ۱۹۹۹ طی تحقیقاتی که بر روی پروتئین‌های اندوستاتین موش با وزن مولکولی ۲۰

کیلو دالتون، پروتئین تنظیم کننده اکسیژن انسانی ORP150 با وزن مولکولی ۱۵۰ کیلو دالتون و لیزوزیم انسانی با وزن مولکولی ۱۴ کیلو دالتون انجام شد، چاپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / GrpE / Dnaj بر روی پروتئین‌های هدف مورد مطالعه قرار گرفت و معلوم شد، زمانی که این پروتئین‌ها به تنهایی بیان می‌شوند، بیشتر شکل تولید شده آن‌ها به صورت نامحلول است ولی با بیان زیاد این چاپرون‌ها به تنهایی یا با یکدیگر، میزان پروتئین‌های نوترکیب محلول افزایش می‌یابد (۱۹).

تحقیقاتی در سال ۲۰۰۷ بر روی بیان همزمان چاپرون‌ها با پروتئین نوترکیب hbFGF انجام شد که نشان داد هیچ کدام از دو سیستم چاپرونی GrpE / Dnakj و GroEL، به تنهایی قادر به جلوگیری از تشکیل انکلوزن بادی‌ها نیستند. اما هر دو سیستم با هم، می‌توانند باعث حل شدن انکلوزن بادی‌ها شوند (۲۰).

در طرح حاضر، اثر دو ترکیب مختلف از چاپرون‌ها در افزایش میزان پروتئین hbFGF محلول، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد ترکیب چاپرون‌های GroEL / GroES / Dnak / Dnaj / GrpE / که در پلاسمید pG-KJE8 بیان می‌شوند، میزان پروتئین‌های نوترکیب محلول را افزایش می‌دهد. در حالی که بیان ترکیب چاپرون‌های GroEL / GroES در پلاسمید pGro7 نتوانست پروتئین‌های نوترکیب محلول را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. بیان همزمان چاپرون‌های دیگر مانند Trigger Factor و ترکیب این چاپرون با دو سیستم چاپرونی Dnakj / GrpE و GroEL جهت افزایش پروتئین نوترکیب hbFGF محلول نیز پیشنهاد می‌شود.

نتایج به دست آمده نشان دهنده این است که بیان همزمان ترکیب چاپرون‌های Dnakj/GrpE و GroELs با فاکتور رشد فیبروبلاستی، بیشتر از سیستم GroEL بدون همراهی Dnakj/GrpE، قادر به افزایش میزان پروتئین‌های نوترکیب hbFGF محلول است.

منابع مورد استفاده

1. Abe, K., Saito, H., 2001. Effects of basic fibroblast growth factor on central nervous system functions. *Pharmacological Research* 43, 4: 307-312.
2. Faktorovich, E. G., 1990. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347: 83-86.
3. Knoerzer, W., 1989. Expression of synthetic genes encoding bovine and human basic fibroblast growth factors bFGFs in *Escherichia coli*. *Gene* 75: 21-30.
4. Anspach, F., 1995. Purification of recombinant human basic fibroblast growth factor: stability of selective sorbents under cleaning in place conditions. *J Chromatography A* 71: 129-139.
5. Mirzahoseini, H., Mehraei, F., Mozafari, F., 2001. A comparative study between expression of a synthetic gene of human fibroblast growth factor and its related cDNA in *Escherichia coli*. *J Sci I R Iran* 12: 301-305.
6. Betiku, E., 2006. Molecular chaperones involved in Heterologous protein folding in *Escherichia coli*. *Biotechnology Review* 12: 66 – 75.
7. Wickner, S., Maurizi, M. R., Gottesman, S., 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286: 1888-1893.
8. Morimoto, R., Gabriella, S. M., 1998. Stress-inducible response and heat shock proteins: New pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature Biotechnology* 16: 833-838.
9. Yang, X. M., Xu, L., Eppstein, L., 1992. Production of recombinant human interferon- α by *Escherichia coli* using a computer controlled cultivation process. *J Biotechnol* 23: 291-301.
10. Bukau, B., Horwich, A., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92: 351-366.
11. Sambrook, H., Russell, F., 2001. *Molecular cloning laboratory manual*. Oxford, USA, 116-118.
12. Roitt, I. M., Delves, J. D., Martin, S. J., Burton, D. R., 2003. *Essential Immunology*. Black well publishing, UK, 140-157.
13. Towbin, H., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci* 76: 43-50.
14. 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.
15. Mirzahoseini, H., Mafakheri, S., Alibolandi, M., Khalil, M., Mohammadi, N., Omidinia, E., 2008. Optimizing heterologous expression in *Escherichia coli*: Importance of 5' codons in translation. Submitted.
16. Hoffmann, F., Rinas, U., 2004. Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Advances in Biochem Eng Biotechnol* 89: 143-161.
17. Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C. G., 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol* 177: 1497-1504
18. Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., Yura, T., 1998. Chaperone co expression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1694-1699.
19. Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., Yura, T., 1999. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of Recombinant proteins in *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology* 66: 884-889.
20. Rinas, U., Hoffmann, F., Betiku, E., Estape, D., Marten, S., 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(2): 244- 257.