مجله علمی-پژوهشی «علوم و فناوری‌های پدافند غیرعامل»
سال دوم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰: ص ۳۳۲- ۳۲۵

# بیان نوترکیب فاکتور رشد اپیدرم انسانی در باکتری *E. coli* و ارزیابی اثر آن بر دودمان سلولی NIH-3T3

**مصطفی بخشی[۱]، فیروز ابراهیمی[۲*]، حسین هنری[۳]، عباس حاجی‌زاده[٤]، محمدعلی عارف‌پور ترابی[٥]**

۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار، ۳- استادیار، ٤- دانشجوی دکتری، ٥- کارشناس ارشد، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)

(دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۲۲ ،پذیرش:۱۳۹۰/۱۲/۱۰)

## چکیده

خانواده EGF از بیش از ۱۳ عضو تشکیل شده است و فاکتور رشد اپیدرمی عضو اصلی این خانواده می‌باشد که در ترمیم زخم‌های اپیدرمی نقش‌آفرینی می‌کند. این فاکتور، یک پلی‌پپتید اساسی برای ترمیم زخم و آغاز تقسیم میتوزی است. در این مطالعه، ژن فاکتور رشد اپیدرم انسانی از بانک ژنی استخراج و پس از بهینه‌سازی کدون‌های آن بر اساس ترجیح کدونی باکتری *E. coli* در وکتور pET21a(+) سنتز گردید. وکتور حامل ژن مذکور به باکتری *E.coli* به‌عنوان میزبان بیانی انتقال یافت و پس از بیان، فرآیند تخلیص پروتئین با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. نتیجه سنجش فعالیت زیستی در سه دُز مختلف نشان داد که این پلی‌پپتید نوترکیب بر تکثیر سلولی در دودمان سلولی NIH-3T3 تأثیرگذار است.

**کلیدواژه‌ها: فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب، ژن صناعی، *E. coli*، دودمان سلولی NIH-3T3.**

Archive of SID

# Recombinant Expression of Human Epidermal Growth Factor in *E. coli* and Assessment of its Effect in NIH-3T3 Cell Line

**M. Bakhshi, F. Ebrahimi*, H. Honari, A. Hajizadeh, M. A. Arefpoor Torabi**
Biology Research Center, faculty of Sciences, Imam Hossien University

*(Received:12/13/2011, Accepted:03/01/2012)*

## Abstract

*The EGF family include13 members and the hEGF as founding member of this family involves in epidermal wound healing. Epidermal growth factor is an essential polypeptide for wound healing and promoting mitotic division. In this study, human epidermal growth factor gene was adapted from gene bank and its codons were optimized according to codon preference of E. coli BL21. The gene was prepared as synthetic construct in pET21a (+). Then the recombinant construct was transferred to E. coli and hEGF gene in the vector was expressed under the control of inducible T7 promoter. Purification was done using affinity chromatography. The bioassay results of three different doses showed that recombinant protein has significant effects on growth of NIH-3T3 cell line.*

**Keywords:**Recombinant hEGF, Synthetic Gene, *E. coli*, NIH-3T3 Cell Line.

* Corresponding author E-mail: Febrhimi@ihu.ac.ir



www.SID.ir

## ۱. مقدمه

ترمیم زخم، یکی از فرآیندهای زیستی است که در تمام موجودات به‌ویژه انسان از اهمیت خاصی برخوردار است. فاکتورهای پپتیدی زیادی در این فرآیند دخیل هستند که مهم‌ترین آنها، فاکتور رشد اپیدرمی[1] (EGF) می‌باشد[۱]. خانواده‌EGF از بیش از ۱۳ عضو تشکیل شده که مهم‌ترین آنها عبارتند از: فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد انتقالی بتا[2] و فاکتور رشد شبه EGF متصل شونده به هپارین[3][۲،۳و۴].

تمام اعضای این خانواده به‌صورت لنگرهای غشایی سنتز می‌شوند که در نهایت برای ایجاد فاکتورهای محلول فعال پردازش می‌گردند. این فاکتورها عملکردشان را از طریق گیرنده‌های سطح سلولی ویژه‌ای به انجام می‌رسانند[۵].

چهار دسته از گیرنده‌های تیروزین کینازی مرتبط با این فاکتورها شناسایی شده‌اند که آنها عبارتند از: EGFR/erbB1/HER1، erbB2/HER2/neu، erbB3/HER3 و erbB4/HER4. هر یک از لیگاندهای خانواده EGF با درجه‌ای از اختصاصیت به این گیرنده‌ها متصل می‌شود. EGF به شکل اختصاصی به گیرنده erbB1 متصل می‌شود[۶، ۵، ۲] با اتصال لیگاند به گیرنده، هترودایمریزاسیون گیرنده اتفاق می‌افتد که موجب ترانس اکتیواسیون گیرنده شده و متعاقب آن فرآیند انتقال پیام به‌واسطه EGF اتفاق می‌افتد. EGF توسط پلاکت‌ها، ماکروفاژها و فیبروبلاست‌ها ترشح می‌شود و به شکل پاراکرین[4] بر سلول‌های اپیتلیالی اعمال اثر می‌کند[۵، ۲].

در سال ۱۹۶۰میلادی، Stanly Cohen یک پلی پپتید پایدار در مقابل دما را از غدد بزاقی تحت فکی موش استخراج کرد که مسئول نمو ابتدایی و رشد دندان موش‌های تازه متولد شده بود. وزن مولکولی این پلی‌پپتید۶/۱۲کیلودالتون بود و به‌دلیل اثر تحریکی بالقوه آن بر تکثیر و کراتینیزاسیون اپیدرم، فاکتور رشد اپیدرمی نامیده شد[۸،۷]. فاکتور رشد اپیدرم انسانی (اروگاسترون[5]) توسط Gerigory در سال ۱۹۷۵جداسازی و شناسایی گردید. این فاکتور نیز دارای وزن مولکولی و توالی اسیدآمینه‌ای تقریباً مشابه فاکتور رشد اپیدرم موشی ( وزن مولکولی ۶/۲ کیلودالتون و با ۱۶ اسیدآمینه متفاوت) است.

EGF انسانی به‌صورت یک پیش‌ساز محلول متصل شونده به غشاء حاوی ۱۲۰۷ اسیدآمینه با وزن مولکولی حدود ۱۴۰ کیلودالتون سنتز می‌شود. این مولکول بزرگ سوبسترای یک پروتئاز خارج سلولی است که این پپتید را به بخش‌های مختلف با اندازه‌های متنوع برش می‌دهد[۹]. یکی از محصولات این واکنش پروتئولاتیک EGF است که مشتمل بر ۵۳ اسیدآمینه می‌باشد. EGF قابلیت اتصال به گیرنده خود در سطح خارجی غشاء پلاسمایی سلول‌های هدف را داراست. تاکنون نقش‌های فیزیولوژیک متعددی برای این فاکتور رشد مشخص شده است که از مهم‌ترین آنها می‌توان به القاء تقسیم میتوزی و تنظیم pH اسیدی معده اشاره نمود[۲].

از همان ابتدای شناسایی چنین فاکتور ارزنده‌ای تلاش‌های فراوانی برای استخراج آن از خون و ادرار انسان انجام شد. اما به‌دلیل فراوانی اندک آن در مایعات بدنی، از سال ۱۹۸۸میلادی محققین روی به تولید این پروتئین به‌صورت نوترکیب توسط موجودات زنده تراریخت آوردند تا بتوانند با تکیه بر این پلی‌پپتید داروهای جدیدی را برای ترمیم زخم و تسریع بهبودی آسیب‌های پوستی تولید نمایند[۱]. تلاش‌های ابتدایی برای بیان نوترکیب این پروتئین از سال ۱۹۸۸ میلادی توسط دیوید انگلر و همکارانش[6] صورت پذیرفت. در این مطالعه، بیان ژن hEGF به همراه توالی نشانه[7] phoA (آلکالین فسفاتاز) به‌صورت پری‌پلاسمی در باکتری *E. coli* سویه JM107 انجام شد[۱۱].

در تحقیقی دیگر در سال ۱۹۹۷ cDNA مربوط به پری‌پرو EGF انسانی تهیه گردید و پس از همسان‌سازی، بیان پروتئین در باکتری *E. coli* سویه M15 انجام شد[۱۲]. در ایران نیز ابراهیمی راد و همکاران در سال ۲۰۰۴ این پروتئین را به دو شکل سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی (با امتزاج با بتا لاکتاماز) بیان کردند و فعالیت زیستی EGF نوترکیب را مورد سنجش قرار دادند[۱۳]. محققین بر این باور بودند که با امتزاج توالی نشانه به ژن EGF و بیان آن به‌صورت پری‌پلاسمی بسیاری از دغدغه‌های محلول‌سازی و تخلیص این پپتید رفع خواهد شد. در همین راستا یک سری اقدامات انجام شده است. اما باید به این نکته توجه داشت که این توالی‌های نشانه، باعث کاهش فعالیت زیستی EGF نوترکیب می‌شوند[۱۵، ۱۴].

در سال ۱۹۹۳ در راستای مطالعات برای تولید EGF نوترکیب، محققین، روی به تغییر موجود زنده‌ای که به‌عنوان میزبان بیانی ایفای نقش می‌کرد آوردند و از مخمر ساکارومایسز سرویزیه[8] استفاده نمودند[۱۶]. همچنین از باکتری‌های دیگری نیز برای بیان فاکتور رشد اپیدرم انسانی استفاده شده است[۱۷]. از آنجا که دست‌یابی به این پپتید برای استفاده‌های درمانی خصوصا بهبود زخم‌های عمیق مورد نیاز کشور است، به تولید نوترکیب آن در این تحقیق اقدام شد.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۲-۱. مواد

تمام مواد شیمیایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، دارای درجه خلوص بالا بودند و از شرکت‌های Merck و Sigma

[1] Epidermal Growth Factor
[2] Transforming Growth Factor
[3] Heparin Binding-Like Growth Factor
[4] Paracrine
[5] Urogastrone

[6] Engler et al
[7] Signal Peptide
[8] Saccharomyces Cervisiae

Archive of SID

www.SID.ir

خریداری گردیدند. میزبانی که برای بیان ژن hEGF مورد استفاده قرار گرفت باکتری *E.coli* سویه BL21(DE3) که یک سویه بیانی از این باکتری است و دارای تولید بالای سرکوب‌گر lac و دارای اپراتور T7 می‌باشد، از شرکت Novagen خریداری شد.

### ۲-۲. همسان‌سازی ژن hEGF در ناقل pET

در ابتدا پس از جستجو و یافتن توالی ژن کد کننده فاکتور رشد اپیدرم انسانی در بانک ژن پایگاه NCBI با عدد دسترسی AY548762.1، این توالی برای شرکت سازنده ژن Shine Gene ارسال گردید و پس از بهینه‌سازی کدون‌ها بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی، ژن به‌صورت صناعی بین دو جایگاه برشی BamHI و Hind III در وکتور pET21a(+) صورت پذیرفت.

### ۲-۳. تهیه سلول‌های مستعد از باکتری *E. coli* BL21(DE3) به‌عنوان میزبان بیانی

برای تهیه سلول‌های مستعد به‌منظور انتقال پلاسمیدهای نوترکیب (حاوی ژنhEGF)، از روش شیمیایی (کلرید منیزیم ۱۰۰میلی مولار، کلریدکلسیم ۱۰۰و ۸۵ میلی مولار) استفاده گردید. پس از تهیه سلول‌های مستعد، میزان ۵µl از ناقل نوترکیب به این سلول‌ها انتقال یافت. کلنی‌های رشد یافته در محیط جامد انتخابی (حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین)، به محیط LB انتقال داده شد. استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد و با توجه به در نظر گرفتن دو جایگاه برش آنزیمی BamHI و HindIII در ابتدا و انتهای ژن در وکتور، جهت تأیید حضور ژن در پلاسمیدهای تخلیص شده، هضم آنزیمی اجرا شد. نتیجه هضم آنزیمی با ژل آگارز ۳ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت[۱۸].

### ۲-۴. بیان hEGF در باکتری *E.coli* BL21(DE3)

پس از ترسیب (۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) سلول‌های میزبان القاء شده، رسوب سلولی در محلول بافر لیز کننده ($NaH_2PO_4$ NaCl) حل شد و سپس سلول‌ها با قدرت ۷۵ درصد طی ۵ سیکل (۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۳۰ ثانیه در یخ) توسط فرآیند سونیکاسیون شکسته شدند. سلول‌ها مجدداً برای مدت زمان ۱۰ دقیقه با سرعت۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. فاز محلول و غیرمحلول بر روی ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸٪ الکتروفورز گردیدند[۱۹].

### ۲-۵. محلول‌سازی کنجاله های نامحلول

برای محلول‌سازی بخش نامحلول سلولی از اوره با غلظت‌های ۶ و ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار به‌عنوان عوامل احیاکننده استفاده گردید. هر یک از این مواد به‌صورت مجزا به نسبت ۱/۵ حجم اولیه رسوب سلولی به آن اضافه گردیدند. نمونه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق هم زده شدند و سپس با سرعت ۱۴۰۰۰rpm در مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی و بخش نامحلول بر روی ژل تریسین پلی‌آکریل آمید ۱۸٪ الکتروفورز و مورد بررسی واقع شدند[۹].

### ۲-۶. تخلیص EGF انسانی نوترکیب

به‌علت وجود نشانه هیستیدینی در انتهای کربوکسیل پروتئین hEGF نوترکیب، از روش کروماتوگرافی تمایلی و از ستون نیکل برای تخلیص پروتئین استفاده شد. پس از محلول‌سازی پروتئین‌های نامحلول که در بر گیرنده EGF نوترکیب نیز بود، فاز محلول شده به‌منظور حذف کامل گوانیدین هیدروکلراید در یک شیب کاهشی گوانیدین (۳/۵، ۲/۵، ۱/۵، ۰/۵و ۰ مولار) در بافر تریس با غلظت ۵۰ میلی‌مولار برای اینکه پروتئین تاخوردگی فضایی خود را از دست ندهد، توسط فرآیند دیالیز حذف گردید. سپس با استفاده از بافرهای تخلیص پروتئین به روش طبیعی توسط ستون نیکل که عبارت بودند از بافر شستشوی اول (محتوی $NaH_2PO_4$ (۵۰ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۳۰۰ میلی‌مولار) و ایمیدازول (۲۰ میلی‌مولار))، بافر شستشوی دوم (محتوی $NaH_2PO_4$ (۵۰ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۳۰۰ میلی‌مولار) و ایمیدازول (۴۰ میلی‌مولار))، بافر شستشوی سوم (محتوی $NaH_2PO_4$ (۵۰ میلی‌مولار)، کلرید سدیم (۳۰۰ میلی‌مولار) و ایمیدازول (۲۵۰ میلی‌مولار)) و بافر MES پروتئین EGF نوترکیب از سایر پروتئین‌های باکتری جدا گردید و تخلیص شد. بخش‌های مختلف به‌دست آمده بر روی ژل تریسین پلی‌آکریل‌آمید ۱۸٪ الکتروفورز گردیدند[۲۰].

### ۲-۷. آنالیز وسترن بلات

پس از بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل تریسین، فرآیند الکتروبلاتینگ بر روی کاغذ نیتروسلولز در بافر انتقالی(۰/۰۲۵ مولار تریس، ۰/۱۹ مولار گلایسین و متانول ۲۰ درصد (v/v)) به‌مدت ۹۰ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از اتمام فرآیند بلاتینگ، کاغذ نیتروسلولز توسط بافر بلاکینگ[1] برای مدت ۱۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. پس از مرحله شستشو، کاغذ نیتروسلولز با آنتی بادی مونوکلونال موشی ضدفاکتور رشد اپیدرم انسانی که ۱۰۰۰ برابر رقیق شده بود به‌مدت ۱ساعت تیمار گردید. با شستشوی مجدد کاغذ، واکنش با آنتی‌بادی پلی‌کلونال موشی کانژوگه با HRP به‌مدت ۱ ساعت انجام شد. پس از شستشو و با اضافه کردن سوبسترا به محیط واکنش رنگ‌پذیری باند مربوط به پروتئین در حضور ماده شیمیایی دی‌آمینو بنزدین (DAB) انجام شد[۲۱].

[1] PBS, 0.1% (v/v) Tween 20, 1%(w/v) skim milk

Archive of SID

www.SID.ir

### ۲-۸. سنجش فعالیت EGF نوترکیب

دودمان سلولی فیبروبلاستی موش سوئیسی (NIH-3T3) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. جهت آماده‌سازی سلول‌ها برای انجام تست، ابتدا سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ درجه در غلظت ۵ درصد $CO_2$ انکوبه شدند و برای رسیدن به شرایطی رشد مطلوب چندین مرتبه پاساژ داده شدند. پاساژ سلولی با استفاده از PBS محتوی تریپسین ۰/۰۱۲۵ ٪ و EDTA ۱۰٪ انجام شد. تعداد $۱\times۱۰^{۵}$ سلول در حالی‌که در محیط پایه آماده شده بودند به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلول اضافه گردید. EGF نوترکیب و استاندارد در سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم به میکروپلیت‌های مجزا اضافه گردید.

همچنین به یکی از میکروپلیت‌ها هیچ‌گونه EGFای اضافه نگردید تا به‌عنوان شاهد ایفای نقش کند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه در محیط حاوی ۵٪ $CO_2$ برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس ماده متیل تیازولیل دی‌فنیلتترازولیوم بروماید (MTT) محلول در PBS به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. میکروپلیت‌ها برای مدت ۴ ساعت تحت شرایط قبلی تیمار شدند.

پس از پایان انکوباسیون، محیط کشت حذف گردید و کریستال‌های فورمازان ایجاد شده در ۱۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردیدند. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر طی سه روز متوالی انجام شد. منحنی فعالیت زیستی پروتئین به‌صورت محور افقی نمایان‌گر میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر و محور عمودی نمایان‌گر غلظتی از فاکتور رشد بود که مورد استفاده قرار گرفت.

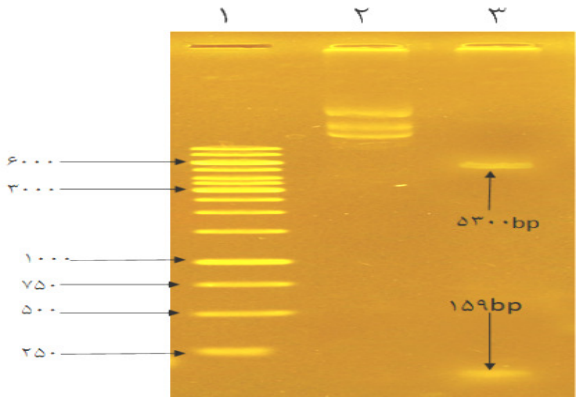
## ۳. نتایج و بحث

### ۳-۱. آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی ژن کدکننده پروتئین EGF انسانی

ابتدا توالی دقیق نوع وحشی ژن کدکننده hEGF از پایگاه بیوانفورماتیکی NCBI اقتباس گردید. پس از بررسی توالی، تغییر کدون‌ها بر اساس ترجیح کدونی میزبان مورد نظر توسط شرکت سازنده ژن انجام شد و ژن به‌صورت صناعی در وکتور pET21a (+) تهیه گردید.

### ۳-۲. تراریخت نمودن باکتری *E.coli* BL21-DE3

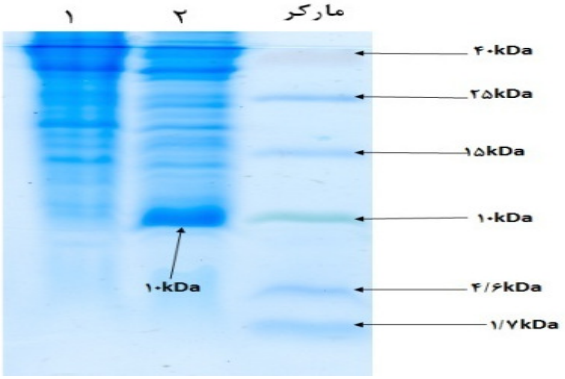
پس از تراریخت نمودن سلول‌های *E. Coli* با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن صناعی، به منظور تأیید حضور ژن در وکتور pET21a (+)، پلاسمید مذکور تخلیص و با آنزیم‌های BamH I و Hind III مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و قطعه ۱۵۹ جفت بازی در ژل آگارز پدیدار شد که بیان‌گر حضور ژن مذکور بود (تصویر ۱).




**تصویر۱.** الگوی الکتروفورز ژل آگاروز ۳ درصد، تأیید حضور ژن EGF بهینه‌شده در وکتور بیانی pET21a-EGF. ردیف۱: نشان‌گر اندازه مولکولی DNA. ردیف۲: پلاسمید pET21a-EGF برش نخورده. ردیف۳: پلاسمید pET21a-EGF برش خورده با آنزیم‌های BamHI و Hind III.

### ۳-۳. بیان EGF و بررسی بیان آن

پس از اطمینان از وجود ژن در پلاسمید مورد نظر، فرآیند بیان در شرایط ۱ میلی‌مولار IPTG و القاء ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس محلول رویی به همراه رسوب در ژل تریسین ۱۸ درصد الکتروفورز شد و ژل توسط رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد (تصویر ۲). افزایش وزن ایجاد شده در پروتئین نوترکیب به‌علت وجود T7-Tag پیش از توالی اصلی hEGF و وجود $his_6$-Tag در انتهای کربوکسیل توالی آن می‌باشد که موجب افزایش وزن پروتئین از ۶/۲ کیلودالتون به ۹/۸ کیلودالتون شده است.

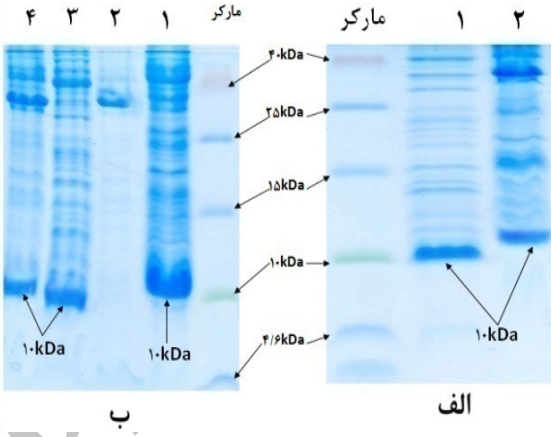



**تصویر۲.** الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی‌آکریل آمید ۱۸ درصد. ردیف ۱: نمونه القاء نشده. ردیف ۲: نمونه القاء شده باIPTG.

با بررسی بیان مشخص گردید که این پروتئین به‌صورت کنجاله‌های نامحلول تولید شده است. به‌دلیل اینکه این پروتئین پس از تاخوردگی در ساختار فضایی خود دارای ۳ پیوند دی‌سولفیدی

www.SID.ir

می‌باشد، احتمال بیان آن به‌صورت محلول بسیار پائین است. لذا فرآیند محلول‌سازی پروتئین از فاز نامحلول سلول با به‌کارگیری روش‌های مختلف صورت پذیرفت. به‌همین منظور از عوامل احیاکننده اوره ۶ مولار (تصویر۳-الف)و اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار (تصویر۳-ب) برای محلول‌سازی استفاده شد. در نهایت بیشترین محلول‌سازی با به‌کارگیری عامل احیاءکننده گوانیدین هیدروکلراید در غلظت ۶ مولار به‌دست آمد.



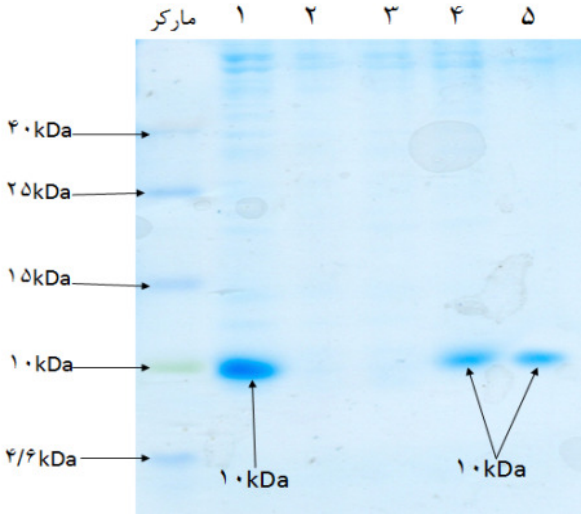

**تصویر۳.** الف) الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی‌آکریل آمید ۱۸٪، بررسی محلول‌سازی با اوره ۶ مولار. ردیف۱: فاز محلول. اوره ۶ مولار. ردیف۲: فاز غیرمحلول اوره ۶ مولار. ب) الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی‌آکریل آمید ۱۸٪، بررسی محلول‌سازی EGF نوترکیب توسط اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار. ردیف۱: فاز محلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار. ردیف۲: فاز غیرمحلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار. ردیف ۳: فاز محلول اوره ۸ مولار. ردیف ۴: فاز غیرمحلول اوره ۸ مولار.

### ۳-۴. تخلیص پروتئین بیان شده

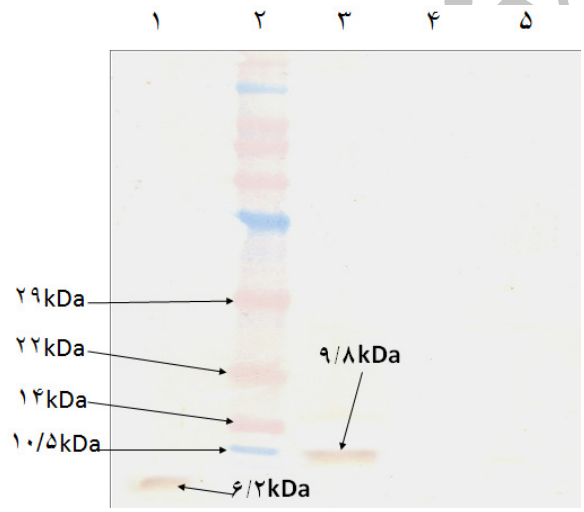
پس از محلول‌سازی پروتئین، تخلیص از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی و با استفاده از ستون Ni-NTA agarose resin صورت گرفت. با بررسی نمونه و بافرهای عبور داده شده از ستون بر روی ژل تریسین مشخص گردید که بافرهای شستشوی چهارم (محتوی ایمیدازول با غلظت ۲۵۰ میلی‌مولار) و بافر MES قادر به جدا نمودن پروتئین از ستون نیکل هستند (تصویر(۴)).

### ۳-۵. تائید پروتئین با استفاده از لکه‌گذاری وسترن

پس از تخلیص،صحت پروتئین بیانی با استفاده از روش لکه‌گذاری وسترن مورد تأیید قرار گرفت که نتایج در شکل (۵) نمایش داده شده است.




**تصویر ۴.** الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸ درصد. تخلیص EGF نوترکیب توسط ستون نیکل. ردیف۱: نمونه محتوی پروتئین قبل از عبور از ستون. ردیف ۲: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر شماره۲ ( ایمیدازول۴۰). ردیف۳: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر شماره۳ ( ایمیدازول ۱۷۰). ردیف۴: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر شماره ۴ ( ایمیدازول ۲۵۰). ردیف ۵: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر MES.




**تصویر۵.** الگوی لکه‌گذاری وسترن پروتئین hEGF. ردیف ۱: hEGF استاندارد. ردیف ۲: نشان‌گر مولکولی پروتئین. ردیف ۳: بند مربوط به تائید پروتئین hEGF نوترکیب ۹/۸ کیلودالتونی. ردیف ۴: نمونه القاء نشده. ردیف۵: BSA به‌عنوان کنترل استاندارد وسترن بلات.

www.SID.ir

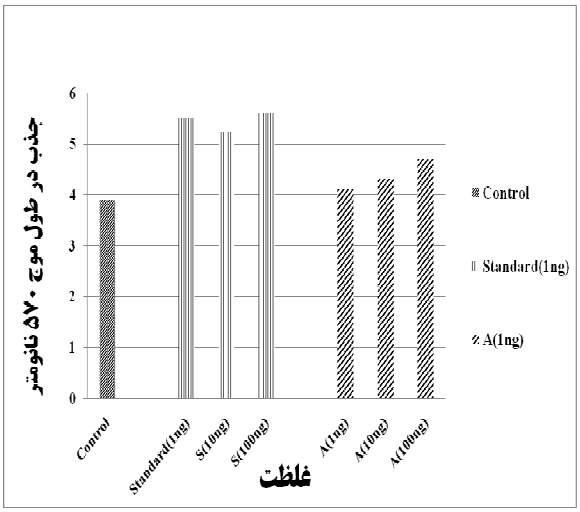
### ۳-۶. سنجش فعالیت فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب

به‌منظور اطمینان از تاخوردگی صحیح hEGF در محیط مائی، میزان توانایی آن بر تکثیر دودمان سلولی NIH-3T3 مورد ارزیابی قرار گرفت. در این سنجش از تست استاندارد MTT استفاده گردید. سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند که به‌ترتیب عبارت بودند از: نمونه شاهد، نمونه EGF استاندارد و نمونه EGF نوترکیب ۹/۸ کیلودالتونی که طی این پژوهش تولید شده بود. به میکروپلیت شاهد هیچ فاکتور رشدی اضافه نگردید.

به یکی از میکروپلیت‌های نمونه، hEGF استاندارد نوترکیب تولیدی شرکت Peprotech آمریکا در سه غلظت ۱، ۱۰و ۱۰۰ نانوگرم اضافه گردید و به میکروپلیت دیگر فاکتور رشد اپیدرمی نوترکیب که طی این پژوهش تولید شده بود در سه غلظت ۱، ۱۰و ۱۰۰ نانوگرم اضافه گردید.

OD سلول‌ها طی جدول زمانی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت پس از تیمار با hEGF توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید. در نهایت پس از ثبت داده‌ها و تهیه نمودار مربوط به این تست (نمودار (۱)) مشخص گردید که hEGF نوترکیب تولید شده طی این پژوهش (نمونه A) دارای فعالیت مناسبی در حدود نوع نوترکیب تجاری این پلی‌پپتید می‌باشد.

یک آنالیز آماری برای محاسبه فعالیت ویژه hEGF با استفاده از ODهای حاصل از تست MTT در مورد دُزهای ۱۰۰ng از نمونه hEGF نوترکیب تولید شده در این پژوهش در مقایسه با hEGF استاندارد انجام شد که نشان داد hEGF نوترکیب دارای فعالیت ویژه‌ای برابر ۸۳/۹٪ از ۱۰۰٪ فعالیت hEGF استاندارد می‌باشد.




**نمودار ۱.** نمودار نتایج حاصل از تست استاندارد MTT در روز سوم از کشت سلول‌های تیمار شده با EGF استاندارد و EGF نوترکیب حاصل از این پژوهش (A).

فراوانی کم hEGF در منابع طبیعی موجب شده که استفاده از آن عملاً در کاربردهای پزشکی امکان‌پذیر نباشد. لذا محققین از سال ۱۹۸۸ روی به تولید نوع نوترکیب این پروتئین در موجودات تراریخت آوردند.

تا کنون اکثر کارهای پژوهشی که در آنها اقدام به تولید فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب شده، از سویه‌های مختلف باکتری *E.coli* استفاده گردیده است[۱۵-۱۱]. از آنجائی‌که در مطالعات قبلی مانند مطالعه ابراهیمی راد و همکاران از ژن وحشی hEGF به‌منظور بیان نوترکیب پروتئین hEGF استفاده گردید و با توجه به اینکه بیان پروتئین hEGF (با در نظر گرفتن اینکه یک پروتئین یوکاریوتی است) به شکل سیتوپلاسمی در باکتری E. coli از ژن وحشی بسیار پائین بود (۰/۹µg/l) [۱۳]، لذا ما را بر آن داشت تا در این پژوهش، ژن فاکتور رشد اپیدرم انسانی را پس از بهینه‌سازی توالی آن بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی (باکتری *E.coli*) به‌صورت صناعی تهیه کنیم.

پس از بهینه‌سازی کدون‌ها، در مجموع ۲۸ نوکلئوتید از مجموع ۱۵۹ نوکلئوتید و ۲۷ کدون از بین ۵۳ کدون تغییر یافت. با توجه به اینکه ژن hGEF بین جایگاه‌های برشی BamH I و Hind III موجود در MCS وکتور pET21a(+) و بدون در نظر گرفتن کدون پایان در انتهای توالی ژن سنتز و همسان‌سازی شده بود، اضافه شدن نوکلئوتیدهای توالی T7-Tag به انتهای آمین توالی hEGF و اضافه شدن نوکلئوتیدهای $His_6$-Tag به انتهای کربوکسیل آن، موجب افزایش وزن پروتئین hEGF از ۶/۲ کیلودالتون به ۹/۸ کیلودالتون شد. در مطالعات متعددی توالی‌های اضافی به ژن hEGF به‌منظور تخلیص بر اساس اصول کروماتوگرافی تمایلی یا بیان پروتئین به‌شکل پری‌پلاسمی فیوژ شده است که این امر باعث افزایش وزن پروتئین به بیش از اندازه طبیعی آن و حتی در بیشتر موارد، بیش از اندازه مشاهده شده در پروتئین حاصل از این پژوهش شده است [۲۳، ۱۵-۱۳و ۱۱].

بیان نوترکیب پروتئین در باکتری *E. coli* تحت شرایط استاندارد صورت پذیرفت. با توجه به حضور یون تریسین در بافر کاتد فن الکتروفورز تریسین که باعث حرکت منظم بندهای پروتئین جهت تفکیک بهتر پروتئین‌ها و همچنین درصد بالاتر آکریل آمید و بیس‌آکریل آمید در تهیه این نوع ژل، برای اولین بار از این فن برای الکتروفورز hEGF استفاده گردید[۲۴]. در همه مطالعات قبلی از ژل SDS-PAGE با درصدهای بالا(۲۲-۲۵ درصد) به‌منظور الکتروفورز EGF استفاده شده بود که این موجب کاهش کیفیت بندها روی ژل می‌شد. همان‌طور که در تصویر (۳) دیده می‌شود، بند hEGF در نمونه رسوب اوره ۶ و ۸ مولار نسبت به بند hEGF در نمونه محلول اوره اندکی بالاتر ظاهر شده است که به‌دلیل نامعلوم این اتفاق می‌افتد. همچنین در بند EGF محلول شده توسط گوانیدین نیز این

Archive of SID

www.SID.ir

اتفاق افتاده است اما آنچه مهم است این است که بند EGF در اوره و گوانیدین محلول می‌باشد که قابلیت کاربرد آن را در مطالعات بعدی ممکن می‌سازد.

به‌علت اینکه پروتئین hEGF نوترکیب تولید شده در این تحقیق در انتهای توالی دارای دنباله هیستیدینی بود، از روش کروماتوگرافی تمایلی و ستون نیکل برای تخلیص آن استفاده شد. این روش تخلیص دارای یک‌سری از مزیت‌ها نسبت به سایر روش‌هایی که تاکنون جهت دست‌یابی به hEGF نوترکیب خالص توسط سایر محققین از قبیل تخلیص با HPLC، امتزاج ژن به یک توالی نشانه مانند phoA، اینتئین، β-لاکتاماز و گلوتاتیون S-ترانسفراز می‌باشد، که از آن جمله می‌توان به دست‌یابی مقادیر بالای پروتئین با یک فرآیند کوتاه‌مدت و کم‌هزینه با تعداد محدودی مرحله اشاره نمود[۲۴].

در نهایت پس از تخلیص پروتئین با ستون نیکل میزان ۱/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر hEGF نوترکیب از ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی میزبان القاء شده حاصل گردید. در مطالعات مشابه که از ژن وحشی hEGF به‌منظور تولید نوترکیب این پروتئین استفاده گردید، میزان بیان بسیار اندکی از پروتئین به‌وقوع پیوست که ارزش ادامه کار به‌منظور تولید آن‌را در مقیاس‌های بالا را نداشت و مقایسه این چنین مطالعاتی با مطالعه حاضر، ارزش کار با ژن hEGF را که توالی آن بر اساس ترجیح کدونی باکتری *E. coli* بهینه شده است را آشکار می‌سازد[۱۳]. جهت بررسی و سنجش فعالیت زیستی hEGF نوترکیب از تست استاندارد MTT استفاده شد. در این آزمایش میزان توانایی پروتئین بر تکثیر سلول‌هایی که بر سطح خود دارای گیرنده EGF بودند در مقایسه با نمونه استاندارد hEGF و نمونه شاهد بررسی گردید و مشخص شد که این پروتئین علی‌رغم تغییر طول توالی، با توجه به کسب تاخوردگی فضایی مناسب خود قادر به اتصال به گیرنده‌اش بر سطح سلول‌های هدف و القاء دیمریزاسیون آن و در نهایت موجب انجام چرخه سلولی می‌شود.

اختلاف فعالیت hEGF تولید شده در این تحقیق با توجه به وجود قطعه اضافی در مقایسه با نوع استاندارد آن خیلی قابل ملاحظه نبود که این مسئله جالب توجه می‌باشد، در صورتی‌که در مورد پروتئین EGFای که ابراهیمی راد و همکاران به‌صورت سیتوپلاسمی تولید نمودند، تنها میزان ۱۷ درصد فعالیت پروتئین در قیاس با فعالیت نمونه استاندارد گزارش شده است[۱۳]. چنانچه آزمایشات مکمل عدم وجود اثرات جانبی این محصول را تأیید کنند، می‌توان از همین محصول برای انجام مطالعات بالینی استفاده نمود. با مشخص شدن فعالیت زیستی مناسب hEGF نوترکیب، می‌توان بسیاری از داروها بر پایه آن برای ترمیم زخم‌های ناشی از صدمات فیزیکی و شیمیایی را بنیان نهاد.

## ۴. نتیجه‌گیری

در این تحقیق، به‌منظور بیان و تولید آزمایشگاهی فاکتور رشد اپیدرم انسانی به شکل نوترکیب در باکتری *E. coli* از ژن کدکننده این پروتئین که پس از بهینه‌سازی کدون‌های آن بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی به شکل صناعی تهیه گردیده بود، استفاده شدکه بیان بالای این ژن در مقایسه با نتایج دیگران که در آنها از ژن وحشی کدکننده hEGF استفاده شده است، به اثبات رسید. دنباله هیستیدینی اضافه شده به انتهای کربوکسیل توالی hEGF شرایط را برای تخلیص ساده و کم‌هزینه آن نیز فراهم نمود. آزمایش استاندارد MTT مشخص کرد که پروتئین hEGF از فعالیت مناسب جهت القاء تقسیم سلولی برخوردار است و می‌توان از آن در آزمایش‌های مکمل بهره گرفت.

## ۵. مراجع


[1] Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N.; Eccleston, G. M. "Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems."; J. Pharm. Sci. 2008, 97, 2892-923.

[2] Vachkova, G.; Bivolarski, B. L. "Origin, Structure and Physiological Role of the Epidermal Growth Factor."; Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 2007, 10, 223−233.

[3] Mercola, M.; Stiles, C. D. "Growth Factor Superfamilies and Mammalian Embryogenesis."; Development 1988, 102, 451-460.

[4] Kane, M. T.; Morgan, P. M.; Coonan, C. "Peptide Growth Factors and Preimplantation Development."; Hum. Reprod. Update. 1997, 3, 137-157.

[5] Yu, F. S.; Yin, J.; Xu, K.; Huang, J. "Growth Factors and Corneal Epithelial Wound Healing."; Brain Res. Bull. 2010, 81, 229-235.

[6] Xian, C. J. "Roles of Epidermal Growth Factor Family in the Regulation of Postnatal Somatic Growth."; Endocr. Rev. 2007, 28, 284-296.

[7] Cohen, S. "Epidermal Growth Factor."; Bioscience report 1986, 8, 1017-1028.

[8] Carpenter, G.; Cohen, S. "Epidermal Growth Factor."; Rev. Biochem. 1979, 48, 193-216.

[9] Gregory, H. "Isolation and Structure of Urogastrone and its Relationship to Epidermal Growth Factor."; Nature 1975, 257, 325-327.

[10] Konturek, J. W.; Bielanski, W.; Konturek, S. J.; Bogdal, J.; Oleksy, J. "Distribution and Release of Epidermal Growth Factor in Man."; Gut. 1989, 30, 1194-1200.

[11] Engler, D. A.; Matsunami, R. K.; Campion, S. R.; Stringer, C. D.; Stevens, A.; Niyogi, S. K. "Cloning of Authentic Human Epidermal Growth Factor as a Bacterial Secretory Protein and Its Initial Structure-Function Analysis by Site-directed Mutagenesi."; J. Biol. Chem. 1988, 263, 12384-12390.

[12] Yoon, C. S.; Lee, E. G.; Lee, Y. S.; Chung, Y. "Expression of Recombinant Epidermal Growth Factorin *E.coli*."; Biotechnol. Bioprocess Eng. 1997, 2, 86-89.

[13] Ebrahimi-Rad, M.; Azarnoosh, M.; Bashir, A.; Bakayev, V. V. "A Novel Vector for Expression/Secretion of Properly Folded Eukaryotic Proteins: a Comparative Study on Cytoplasmic and Periplasmic Expression of Human Epidermal Growth Factor in *E. coli*."; Iranian Biomedical Journal 2004, 8 ,51-61.


Archive of SID

www.SID.ir

[14] Abdull Azis, A. F.; Ismail, E. N.; Hambali, Z.; Abdullah, M. N.; Ali, A. M.; Mohd Lila, M. A. "The Periplasmic Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (hEGF) in *Escherichia coli*."; Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotech. 2006, 14, 41-45.

[15] Ferrer Soler, L.; Cedano, J.; Querol, E.; de Llorens, R. "Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor Using Different Expression Systems."; J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003, 788, 113-123.

[16] Topczewska, J.; Bolewska, K. "Cloning and Expression of the hEGF Gene in Saccharomyces Cervisiae."; Acta Biochim. Pol. 1993, 40, 4-7.

[17] Cheung, Q. C.; Yuan, Z.; Dyce, P. W.; Wu, D.; DeLange, K.; Li, J. "Generation of Epidermal Growth Factor Expressing *Lactococcus lactis* and its Enhancement on Intestinal Development and Growth of Early-Weaned Mice."; Am. J. Clin. Nutr. 2009, 89, 871-9.

[18] Sambrook, J.; Mac Callum, P.; Russell, D. "Molecular Cloning A Laboratory Manual."; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; Third edition: Chapter 1-5-6-8-12-13.

[19] Bollag, D. "Protein Methods."; Wiley-LISS.1992; 45-160.

[20] "Recombinant Protein Purification Handbook. Principles and Methods."; Invitrogen, Chapter 4, 103-110, 2009.

[21] "Current Protocols in Molecular Biology."; Green Publishing Associates and wileg-Intersciience. John Wiley. chapter 10, 1987.

[22] Sylvester, P. W. "Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability Drug Design and Discovery."; Methods in Molecular Biology 2011, 716, 157-168.

[23] Esipov, R. S.; Stepanenko, V. N.; Chupova, L. A.; Boyarskikh, U. A;. Filipenko, M. L.; Miroshnikov, A. I. "Production of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Using Ssp dnaB Mini-Intein System."; Protein Expr. Purif. 2008, 61, 1-6.

[24] Garfin, D. E. "Gel Electrophoresis of Protein."; Oxford University Press. Chapter 7, 197-268, 2003.

Archive of SID

www.SID.ir