Archive of SID

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 اوریگامی *اشریشیاکلی* و مقایسه میزان استخراج آن با دو روش اولتراسونیک و انجماد و ذوب

مرضیه سواری: 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 اسیدآمینه 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 درون‌سلولی 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 اوریگامی *اشریشیاکلی* است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های مستعد سویه اوریگامی *اشریشیاکلی* 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 گران‌قیمت مثل اولتراسونیک وجود ندارد، جایگزین مناسبی برای این روش است.

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

* نویسنده مسؤول مکاتبات، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

اشریشیاکلی[1] 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 ازآن سهولت کشت و ویژگی‌های رشد، سهولت دستکاری ژنتیکی ودر 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[2] است. این هورمون یک پلی‌پپتید تک رشته‌ای شامل ۱۹۱ اسیدآمینه با وزن ۲۲کیلودالتون است که دارای دوپیوند دی‌سولفیدی، چهار ساختار هلیکسی راست‌گرد و دو جایگاه فعال برای اتصال به گیرنده‌اش است. این هورمون توسط سلول‌های سوماتوتروف غده هیپوفیز جلویی ترشح می شود. 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[3]، سندروم پرادرویلی[4] و نارسایی مزمن کلیه منجر می‌شود. همچنین، برای درمان سندروم تونل مچ‌دست[5] 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 تولیدشده داخل سلولی، یک مرحله مهم است که روش‌های مختلفی از جمله اولتراسونیک[6]، 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 وارزان قیمت نیاز است که یکی از این روش‌ها استفاده از روش انجماد و ذوب[7] است. انجماد و ذوب یک روش متداول برای لیز کردن سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی است که به دو شکل انجماد وذوب سریع و آهسته انجام می‌شود. در این روش تشکیل کریستال‌های یخ ومتورم شدن سلول‌ها و در نهایت، قراردادن آن‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث لیزسلولی می‌شود. برای کارآمد شدن این روش باید سیکل انجماد وذوب، بسته به نوع نمونه، چندبار تکرارشود (۱، ۸ و ۹). از آنجا که اولتراسونیک یک روش خوب و مورد قبول است و در این روش تقریبا 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 *اشریشیاکلی* تولید و سپس، میزان پروتئین استخراج شده در دو روش انجماد و ذوب و اولتراسونیک مقایسه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

بیان هورمون رشد انسانی در سویه اوریگامی

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 trc[9]، توالی lacO[10] برای القاء توسط IPGT[11]، به منظور بیان هورمون رشد نوترکیب انسانی تهیه شد.

ترانسفورماسیون[12] و غربالگری سلول‌های اوریگامی. حاوی ژن rhGH: از باکتری *E. coli Origami* سلول‌های مستعد[13] تهیه و ۵ میکرولیتر از پلازمیدی که حاوی ژن هورمون رشد انسانی است به ۲۰۰ میکرولیتر سلول‌های مستعدشده 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 نوترکیب هورمون رشد انسانی: کلونی انتخاب شده در محیط کشت LB[14] مایع در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد و پس از این که میزان جذب (OD) به ۰/۶ رسید با محلول ۱ میلی‌مولار بر لیتر 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 وذوب و اولتراسونیک: پس از کشت و القا بیان پروتئین نوترکیب 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 1X[15] 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 این‌که 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[16] و الایزا[17] اندازه‌گیری شد (۱ و ۱۲).

انجماد و ذوب آهسته: ۱۰۰ میکرولیتر از بافر PBS 1X 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 این‌که 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).

www.SID.ir

Archive of SID

اولتراسونیک: ابتدا ۱۰ میکرولیتر از پلت باکتری برداشته، ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS 1X 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 الایزا اندازه‌گیری شد (۸ و ۱۳).

تحلیل با معرف برادفورد: پس از اولتراسونیک، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد وجذب 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 ۱۰تا 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 الایزا: در این آزمایش از یک ساندویچ الایزای خانگی با استفاده از آنتی بادی اولیه بر علیه هورمون رشد انسانی شامل آنتی‌بادی مونوکلونال 7F8 (آنتی‌بادی هدیه از طرف پروفسور ریچارد راس، دانشگاه شفیلد انگلستان) و آنتی بادی ثانویه بیوتینه شده10A7 (آنتی‌بادی هدیه از طرف پروفسور 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 انکوبه شد. در مرحله بعد، پس از شستشو عمل مسدودسازی[18] به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. در مراحل بعدی به ترتیب نمونه‌ها، آنتی‌بادی ثانویه، Streptavidin-HRP، TMB Solution[19] (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[20] و وسترن‌بلات[21]: برای تأیید نهایی تولید پروتئین نوترکیب بیان شده وتعیین ویژگی آن از روش دات‌بلات[22] و وسترن‌بلات[23] با آنتی‌بادی ضد هورمون رشد استفاده شد. برای انجام دات‌بلات، پس از تخریب دیواره سلولی، عصاره سلولی حاصل که حاوی پروتئین نوترکیب است به کاغذ نیتروسلولز انتقال داده شد. رقت‌های مختلف هورمون رشد انسانی نوترکیب 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 نیتروسلولز انتقال داده شد و پس از خشک شدن نمونه‌ها بر روی کاغذ، مرحله مسدودسازی کاغذ نیتروسلولز با قرار دادن آن در محلول شیر خشک یه مدت دو ساعت انجام شد. پس از سه بار شستشو کاغذ نیتروسلولز به مدت دو ساعت در مجاورت آنتی‌بادی ضدهورمون رشد انسانی رقت ۱ به هزاراز آنتی‌بادی10A7 قرار داده‌شد. در مرحله بعد پس از شستشو کاغذ نیتروسلولز با آنتی‌بادی ثانویه[22]، سوبسترای آنزیم TMB (HRP) به کاغذ نیتروسلولز اضافه شد. برای انجام وسترن‌بلات نیز پس از انجام الکتروفورز نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE ۱۰ درصد، باندهای پروتئینی حاصل به‌دست‌آمده از رسوب باکتری به کاغذ نیتروسلولز منتقل شد. مراحل بعدی همانند مراحل شرح

www.SID.ir

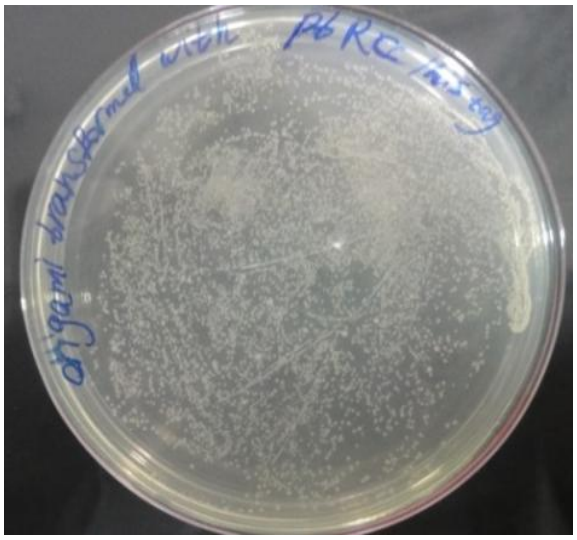
Archive of SID

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

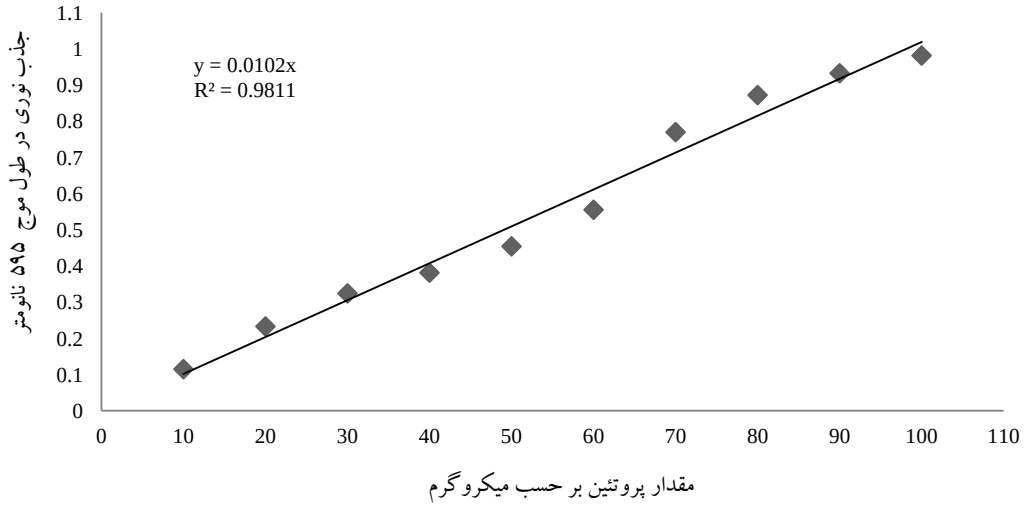
نتایج

ترانسفورماسیون: ازسویه اوریگامی سلول مستعد تهیه و سپس، با پلازمید pTrcHisTopo کدکننده 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 آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و تتراسایکلین برای اوریگامی را نشان می‌دهد.

نتایج استخراج پروتئین به روش انجماد و ذوب سریع با برادفورد: پس از هر بار تکرار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد سنجیده شد. این روش کل پروتئین‌های استخراج‌شده را می‌سنجد. جذب نمونه‌ها در طول موج برادفورد ثبت و طبق نمودار استاندارد (شکل ۲) به غلظت میکروگرم تبدیل شد. نمودار به دست آمده نشان‌دهنده این است که تا تکرار پنجم، با افزایش تکرار میزان پروتئین بیشتری استخراج شده اما پس از آن میزان پروتئین استخراجی کاهش می‌یابد (شکل۳).



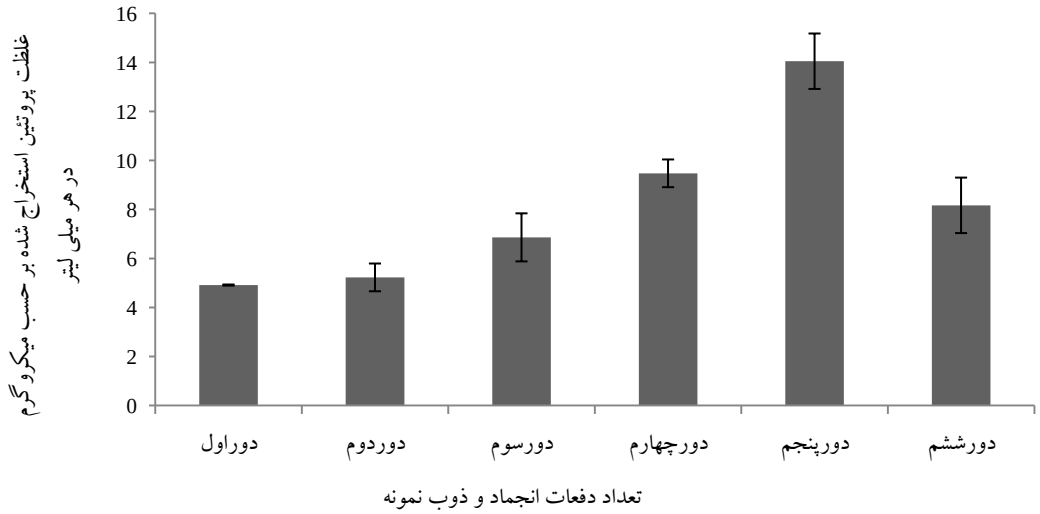
شکل ۱- تصویری از کلونی‌های ترانسفورم شده سویه‌ی اوریگامی



شکل۲- نمودار استاندارد آلبومین سرم گاوی در طول موج ۵۹۵ نانومتر

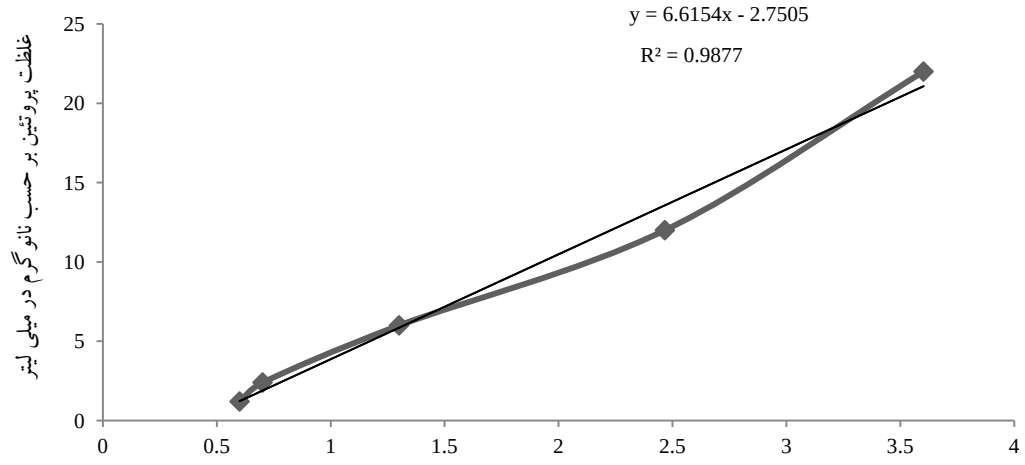
www.SID.ir

Archive of SID



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.

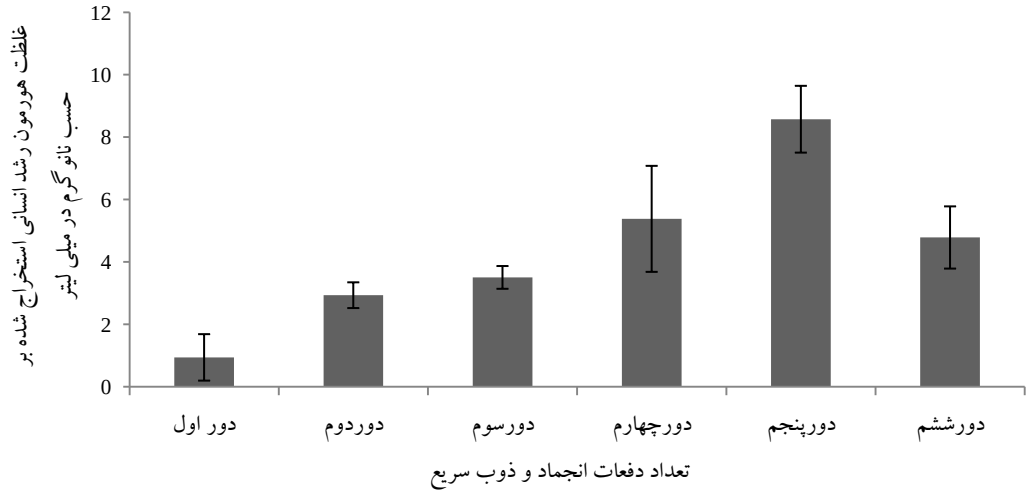


شکل ۴- نمودار استاندارد غلظت‌های الایزا

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 هرکدام از نمونه‌ها به شکل تکرار دوتایی انجام گرفت و جذب آن‌ها در طول موج 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).

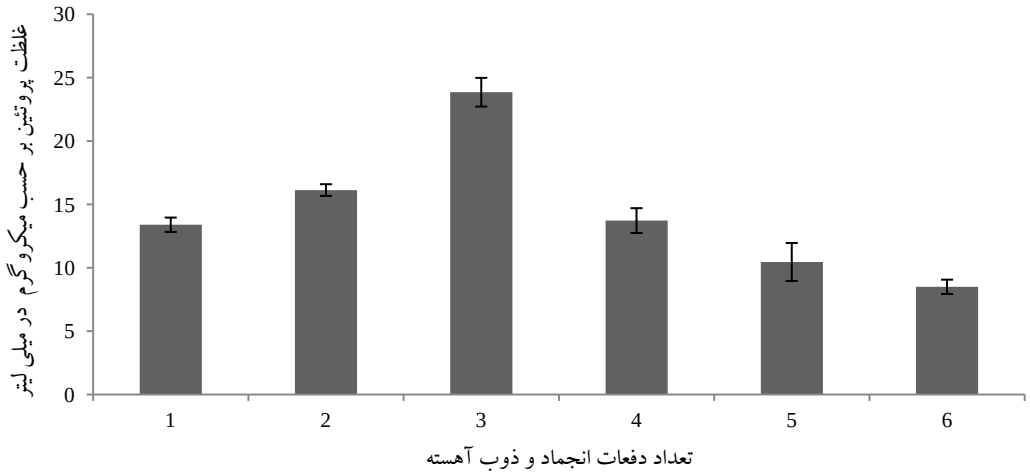
www.SID.ir

Archive of SID



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 می‌یابد.



شکل ۶- نمودار میزان پروتئین استخراج شده بعد از تعداد دفعات متفاوت انجماد و ذوب آهسته با روش برادفورد

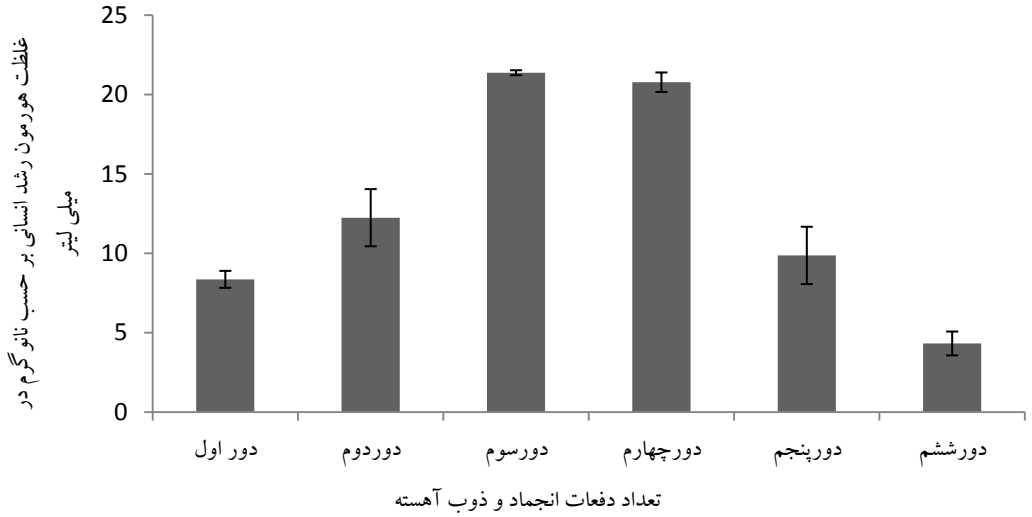
نتایج این نمودار نشان دهنده این است که میزان پروتئین استخراج شده تا چرخه سوم رو به افزایش و پس از آن کاهش می‌یابد.

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

نتایج استخراج پروتئین به روش انجماد و ذوب آهسته با الایزا: در این روش پس از انجام الایزا با آنتی‌بادی اختصاصی ضد هورمون رشد انسانی به شکل دوتایی برای هر ۶ نمونه بعد از هر تکرار و تبدیل جذب نوری نمونه‌ها 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 می‌یابد.

www.SID.ir

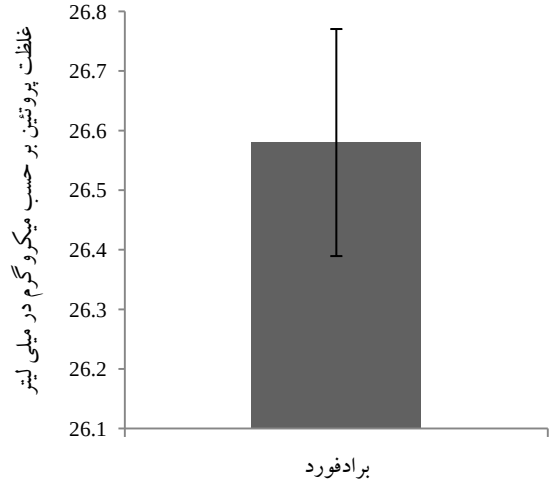
Archive of SID



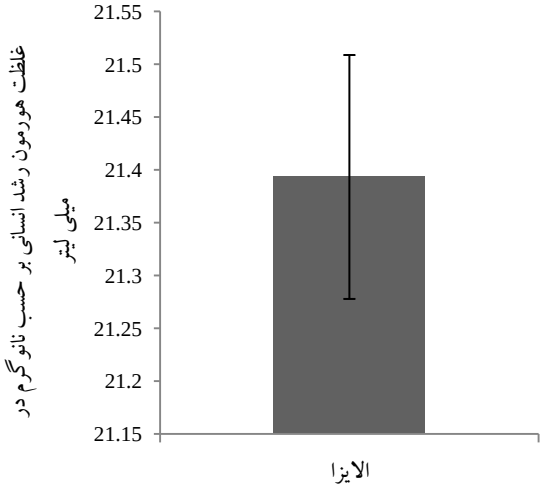
شکل ۷- نمودار میزان پروتئین استخراج شده بعد از تعداد دفعات متفاوت انجماد و ذوب آهسته با الایزا

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).

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 الایزا سنجیده شد. جذب نوری آن در ۴۵۰ نانومتر ۲۱/۳۹ نانوگرم بود (شکل ۹).



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



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.

www.SID.ir

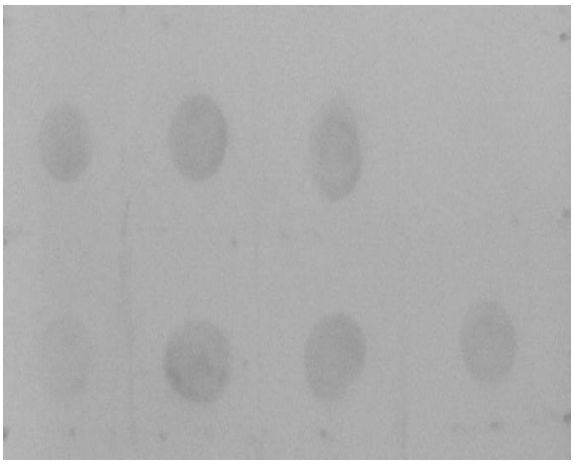
Archive of SID

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

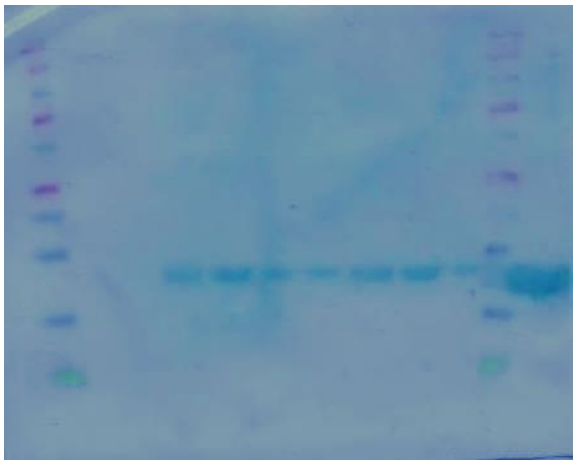
غلظت هورمون رشد سنجش شده با الایزا	غلظت پروتئین سنجش شده با برادفورد	
۲۱/۳۹ نانوگرم در میلی‌لیتر	۲۶/۵۸ میکروگرم در میلی‌لیتر	اولتراسونیک
۲۱/۳۷ نانوگرم در میلی‌لیتر	۲۳/۸۴ میکروگرم در میلی‌لیتر	انجماد و ذوب آهسته
۵۷/۸ نانوگرم در میلی‌لیتر	۱۴/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر	انجماد و ذوب سریع

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.

دات‌بلات و وسترن‌بلات: نتایج نشان داد در دات‌بلات، پس از انتقال نمونه‌ها به کاغذ نیتروسلولز و اضافه کردن سوبسترای آنزیم، پروتئین به خوبی تولید شده است (شکل ۱۰). پس از انجام الکتروفورز ژل دوبعدی و انتقال ژل به کاغذ نیتروسلولز 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 دات‌بلات. ردیف اول از سمت چپ به راست به ترتیب کنترل مثبت با رقت‌های ۱۰۰۰/۱، ۱۰۰/۱، ۱۰/۱ و کنترل منفی، ردیف دوم نمونه‌های حاصل از بیان



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

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش نشان داده شد که پروتئین نوترکیب بیان شده در *اشریشیاکلی* را می‌توان با روش ساده انجماد و ذوب به خوبی استخراج کرد. از آنجا که طیف وسیعی از پروتئین‌های نوترکیب تولیدشده در *اشریشیاکلی* داخل سلولی هستند و به خارج ترشح نمی‌شوند، روش انجماد و ذوب یک جایگزین ساده و ارزان برای روش‌های پر هزینه جداسازی پروتئین از باکتری است (۱۲). برای استخراج پروتئین نوترکیب 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 روش‌ها دیواره کامل تخریب می‌شود و پروتئین سیتوپلاسمی و پروتئین پری‌پلاسمی خارج می‌شوند. در تعدادی از روش‌ها غشا

www.SID.ir

Archive of SID

خارجی از غشا داخلی جدا می‌شود و فقط پروتئین پری‌پلاسمی استخراج می‌شوذ. 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 دناتوره‌شدن 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 میزان پروتئین استخراج شده از روش انجماد و ذوب آهسته تقریبا 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 اشریشیاکلی 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 ویا دیگر تجهیزات لازم برای تخریب سلول باکتریایی وجود ندارد، می‌توان از روش انجماد وذوب 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 ودارای 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 journa of Biotechnology* 2004; 2 (4): 250- 60.

www.SID.ir

Archive of SID

(4) Sonoda H., Sugimura A. Improved solubilization of recombinant human growth hormune 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- Ortiga 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) Mehigh 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) Wilkinson1 IR., Ferrandis E., Artymiuk PJ., Teillot M., Soulard Ch., Touvay 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. *Bilogical Journal of Microorganism* 2013; 1 (4) :7- 14.

---

[1]. *Eshershia 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

www.SID.ir

Archive of SID

[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)

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir