

## Cloning, Expression, and Purification of $\alpha$ , $\beta a$ , and $\beta b$ Subunits of Human Inhibin Protein in *Escherichia coli*

Mohammad Ataei<sup>1\*</sup>, Elaheh Motevaseli<sup>2\*</sup>, Mohammad Hossein Modarressi<sup>2</sup>, Esmail Sadroddiny<sup>1</sup>, Gholamreza Tavoosidana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\*Corresponding Author:  
Elaheh Motevaseli;

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:  
mataei3@gmail.com

Received: 9 Jul, 2017

Accepted: 29 Aug, 2017

### Abstract

**Background and Objectives:** Inhibin is a glycoprotein hormone commonly found in the circulation, but its level increases in some diseases, and its measurement by serological method using anti-inhibin monoclonal antibodies, can help in diagnosis of some genetic diseases. This study was performed with the objective of cloning, expression, and purification of  $\alpha$ ,  $\beta a$ , and  $\beta b$  subunits of human inhibin protein in *Escherichia coli*.

**Methods:** For each Inhibin subunit gene, a primer pair was designed. Then, the gene sequence of each of the subunits, was obtained from human genomic DNA using polymerase chain reaction (PCR) method, and then was cloned into pET22b vector after enzymatic digestion. Recombinant vector associated with each subunit, was transferred to the host cell *E. coli* (strain BL21). The transformed cells were cultured in LB culture medium containing ampicillin, and positive colonies were isolated for mass production of recombinant protein. After mass culture and induction of transformed strains by isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), the produced recombinant protein, was isolated using nickel column chromatography.

**Results:** The inhibin hormone subunit genes, was correctly cloned in pET22b vector and its expression in *E. coli*, was considerably high. The results of the expression of inhibin hormone also showed that in the absence of codon optimization, the inhibin expression in the prokaryote host increases significantly. The protein subunits  $\alpha$ ,  $\beta a$ , and  $\beta b$  of inhibin hormone, were purified, respectively, with molecular weights of 13.7, 12, and 12 kDa.

**Conclusion:** protein subunits of inhibin hormone, can be expressed in the prokaryotic host due to their small size, short gene sequence, and minor post-transcriptional modifications.

**Keywords:** Inhibins; Recombinant proteins; *Escherichia coli*.

## کلونینگ، بیان و خالص سازی زیرواحدهای $\alpha$ ، $\beta a$ و $\beta b$ پروتئین اینهبین انسانی در اشرشیاکلی

محمد عطائی<sup>۱</sup>، الهه متوسلی<sup>۲\*</sup>، محمدحسین مدرسی<sup>۲</sup>، اسماعیل صدرالدینی<sup>۱</sup>، غلامرضا طاوسی دانا<sup>۲</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** اینهبین، یک هورمون گلیکوپروتئینی است که به طور معمول در گردش خون وجود دارد، اما در برخی بیماری‌ها میزان آن افزایش می‌یابد و اندازه گیری آن به روش سرولوژی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه آن نیز می‌تواند به تشخیص برخی بیماری‌های ژنتیکی کمک کند. این مطالعه با هدف کلونینگ، بیان و خالص سازی زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  پروتئین اینهبین انسانی در اشرشیاکلی انجام شد.

**روش بررسی:** برای ژن هر کدام از زیرواحدهای اینهبین، یک جفت پرایمر طراحی گردید، سپس توالی ژنی هر یک از زیرواحدهای اینهبین به روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) از DNA (دزوکسی ریبونوکلوئید اسید) ژنومی انسان به دست آمد و پس از هضم آنزیمی در وکتور pET22b کلون شد. وکتور نو ترکیب مربوط به هر یک از زیرواحدها، به میزبان اشرشیاکلی (سویه BL21) انتقال یافت. سلول‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند، سپس کلنی‌های مثبت جهت تولید انبوه پروتئین نو ترکیب جداسازی گردید. پس از کشت انبوه و القای سویه‌های ترانسفورم شده با IPTG (ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتوپیرانوزید)، پروتئین نو ترکیب تولید شده به کمک روش کروماتوگرافی میل ترکیبی ستون نیکل جداسازی شد.

**یافته‌ها:** ژن زیرواحدهای هورمون اینهبین به درستی در وکتور pET22b کلون و بیان آن در اشرشیاکلی، به طور قابل ملاحظه‌ای بالا بود. نتایج حاصل از بیان هورمون اینهبین نشان داد در صورت عدم انجام بهینه سازی کدونی، بیان اینهبین در میزبان پروکاریوت به طور قابل توجهی بالا می‌رود. زیرواحدهای پروتئینی  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  هورمون اینهبین به ترتیب با اوزان مولکولی ۱۳/۷، ۱۲ و ۱۲ کیلودالتون خالص سازی شدند.

**نتیجه گیری:** زیرواحدهای پروتئینی هورمون اینهبین به دلیل اندازه کوچک و توالی کوتاه ژن، همچنین تغییرات بعد از ترجمه‌ای اندک، در میزبان پروکاریوتی قابل بیان هستند.

**کلید واژه‌ها:** اینهبین‌ها؛ پروتئین‌های نو ترکیب؛ اشرشیاکلی.

دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی،  
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران،  
ایران.

گروه پزشکی مولکولی، دانشکده  
فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم  
پزشکی تهران، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

الهه متوسلی، گروه پزشکی مولکولی،  
دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی،  
دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران،  
ایران.

آدرس پست الکترونیکی:  
mataei3@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ataei M, Motevaseli E, Hossein Modarressi M, Sadroddiny E, Tavoosidana Gh.  
Cloning, expression, and purification of  $\alpha$ ,  $\beta a$ , and  $\beta b$  subunits  
of human inhibin protein in *Escherichia coli*.  
Qom Univ Med Sci J 2018;12(5):44-52. [Full Text in Persian]

mRNA زیرواحدها پس از ترجمه به صورت پیش سازهای درآمده که به صورت دایمر با پیوند دی سولفیدی بهم متصل می شوند؛ بدین ترتیب که ابتدا زیرواحد  $\alpha$  به صورت یک پیش ساز ۳۶۶ اسید آمینه ای ساخته می شود، سپس با پیش ساز زیرواحد  $\beta$  (a یا b) از طریق یک باند دی سولفیدی بهم متصل می شوند. هر کدام از پیش سازها متشکل از نواحی sig-peptide، propeptide، ناحیه N-terminal و ناحیه C-terminal می باشند. ناحیه N-terminal فقط در پیش ساز زیرواحد  $\alpha$  دیده می شود و ناحیه C-terminal نیز همان زنجیره اصلی موجود در فرم دایمر پروتئین است. این نواحی به وسیله مناطقی به نام Cleavage Site هم جدا می شوند (۴). این جایگاه در واقع فاصله بین دو اسید آمینه بوده که در آن زنجیره پیش ساز شکسته می شود. در ساختار زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  به ترتیب ۴، ۵ و ۵ باند دی سولفید وجود دارد که یکی از آنها دارای نقش Interchain بوده و در اتصال دو زیرواحد و تشکیل فرم دایمر، نقشی اساسی ایفا می کند (جدول شماره ۱).

اینهیین، یک هورمون گلیکوپروتئینی است که در مردان از سلول های سرتولی بیضه و در زنان از جفت، جسم زرد، گنادها و غده هیپوفیز، تولید و ترشح می شود. مهم ترین عملکرد فیزیولوژیکی این پروتئین، مهار تولید هورمون محرک فولیکولی (FSH) به طور پسنورد از غده هیپوفیز است (۳-۱). همه اینهیین ها، کمپلکس های پروتئینی دایمری هستند و در ساختار آنها سه زیرواحد پروتئینی  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  دیده می شود (۱). از کنار هم قرار گرفتن این زیرواحدها، اینهیین A ( $\alpha$  و  $\beta a$ ) و اینهیین B ( $\alpha$  و  $\beta b$ ) به صورت دایمر تشکیل می گردد. mRNA زیرواحد  $\alpha$  دارای دو اگزون،  $\beta a$  و  $\beta b$  به ترتیب ۲ و ۳ اگزون دارند که طی فرآیند پردازش، اینترون ها حذف شده و در نهایت، صرف نظر از مناطق ۵'، ۳' UTR و poly A، یک ناحیه CDS (توالی کدکننده) که در واقع کدکننده زنجیره پلی پپتید است باقی می ماند. ژن زیرواحد  $\alpha$  و  $\beta a$  به ترتیب در ناحیه q35 و q14.2 کروموزوم ۲ و ژن زیرواحد  $\beta b$  نیز در ناحیه p14.1 کروموزوم ۷ قرار گرفته است.

جدول شماره ۱: مشخصات آمینواسیدی و تغییرات پس از ترجمه زیرواحدهای اینهیین

Signal Peptide (aa)	Propeptide (Aa)	N-ter (aa)	C-ter (aa)	Cleavage site	S-S count	M/W (KDa)	Glycosylation
$\alpha$	18	43	171	61-62 232-233	4	18	3
$\beta a$	20	290	-	20-21 310-311	5	14	1
$\beta b$	28	264	-	28-29 292-293	5	14	1

سطح سرمی اینهیین در بسیاری از ناهنجاری های کروموزومی و بیماری های ژنتیکی، از قبیل سندرم داون و سرطان تخمدان به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. سنجش میزان اینهیین به کمک آنتی بادی مونوکلونال علیه این زیرواحدها، روشی مؤثر در تشخیص این بیماری ها می باشد (۷، ۸). یکی از روش های تهیه آنتی بادی مونوکلونال علیه این هورمون، تکنیک هیبریدوما است. به دست آوردن آنتی بادی مونوکلونال با این روش، نیازمند مقادیر زیادی از این پروتئین جهت تزریق به موش نیز می باشد. از طرفی، به دلیل شباهت های زیاد این هورمون در انسان و موش، مقدار تزریق شده باید به اندازه ای باشد که بتواند سیستم ایمنی جانور را تحریک کند. تهیه آنتی بادی مونوکلونال علیه این هورمون نیز نیازمند زیرواحدهای پروتئینی خالص است (۴).

در زنان، میزان غلظت اینهیین A در طول دوره بارداری افزایش می یابد و می توان استنباط کرد این هورمون از جفت و جنین تولید می شود و تقریباً در هفته های ۸-۶، افزایش آن را به خوبی می توان مشاهده کرد؛ از این رو جهت بررسی میزان اثربخشی و موفقیت IVF استفاده می شود (۵). نکته قابل توجه اینکه در زنان دارای جنین چند قلو، میزان اینهیین A به طور قابل توجهی نسبت به جنین تک قلو افزایش می یابد (۶). در روش انتقال جنین، به علت اینکه تعدادی از زیگوت ها در همان ابتدای بارداری از بین می روند و این موضوع با روش های سونوگرافی و  $\beta hCG$  قابل شناسایی نبوده و تنها با اندازه گیری اینهیین A می توان به سلامت جنین پی برد؛ بنابراین اینهیین A یک مارکر عالی برای مانیورینگ IVF محسوب می شود (۵).

## Archive of SID

جایگاه آنزیم‌های محدودکننده XhoI و EcoRI به ترتیب در ۳' و ۵' پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار SnapGene V2.3 طراحی شدند. در انتهای ۵' هر یک از پرایمرها قبل از توالی مربوط به سایت آنزیمی، سه نوکلئوتید جهت اتصال صحیح آنزیم به رشته الیگونوکلئوتید اضافه شد. طول پرایمرهای طراحی شده بین ۳۰-۲۷ نوکلئوتید بود و هر یک از پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo V12.0 از نظر وجود پرایمر دایمر و لوپ بررسی شدند. در تمامی پرایمرها لوپ‌هایی وجود داشت که دمای تشکیل آنها کمتر از دمای مرحله اتصالی بود، سپس برای جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از پایگاه اطلاعاتی بیوتکنولوژی (NCBI)، بلاست انجام گرفت و اختصاصیت آنها تأیید گردید، پس از تأیید صحت پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند (جدول شماره ۲).

از آنجایی که جداسازی و تخلیص این زیرواحدها از سرم بسیار پرهزینه و ناکارآمد است (۹)، لذا استفاده از تکنیک کلونینگ و بیان پروتئین نو ترکیب می‌تواند روشی مؤثر برای تهیه زیرواحدهای پروتئینی این هورمون باشد (۱۰). این مطالعه با هدف کلونینگ، بیان و تخلیص زیرواحدهای پروتئینی هورمون اینهیبین انجام شد.

## روش بررسی

در این مطالعه، توالی کدکننده نواحی مورد نظر هر یک از زیرواحدها، از بانک اطلاعاتی استخراج و برای هر کدام یک جفت پرایمر طراحی گردید. توالی کدکننده فقط شامل یک اگزون بود که در نتیجه برای تکثیر آن از DNA ژنومی استفاده شد (۱۱).

جدول شماره ۲: لیست و جزئیات پرایمرهای طراحی شده

جهت	طول (نوکلئوتید)	باز اضافه	آنزیم محدودکننده	سایت برش	سایت اتصالی پرایمر	نام پرایمر	ژن
F	۳۰	CGC	EcoRI	GAATTC	TCAACTCCCCTGATGTCCTGG	E1/A	INHA
R	۳۰	CCG	XhoI	CTCGAG	GATACAAGCACAGTGCTGCGT	X1/A	
F	۳۰	CGC	EcoRI	GAATTC	GGCTTGAGTGTGATGGCAAG	E1/BA	INHBa
R	۳۰	CCG	XhoI	CTCGAG	TGAGCACCCACACTCCTCCAC	X1/BA	
F	۲۷	CGC	EcoRI	GAATTC	GGCCTGGAGTGCGATGGC	E1/BB	INHBB
R	۲۹	CCG	XhoI	CTCGAG	GGAGCAGCCGCACTCCTCCA	X1/BB	

پس از رسیدن به  $OD_{600}=0.4$ ، به کمک سانتریفوژ (با ۲۷۰۰ دور در دقیقه) رسوب سلولی جدا شد. سلول‌های مستعد با استفاده از ۱۰۰ میلی‌مولار کلسیم کلرید تهیه گردید، سپس پلاسمیدهای نو ترکیب با کمک شوک حرارتی به سلول‌های مستعد ترانسفورم شدند. سلول‌های ترانسفورم شده روی محیط LB agar حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شده و در مراحل بعدی کلنی‌های ترانسفورم شده از نظر وجود پلاسمید نو ترکیب غربالگری شدند. از کلنی‌های حاصل روی محیط کشت LB agar حاوی آمپی‌سیلین، ۷ کلنی انتخاب و روی آنها Colony PCR انجام گرفت. در این مرحله کلنی‌های انتخاب شده از نظر اندازه، متوسط بودند و بیشترین فاصله را از هم داشتند. در این فرآیند از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator طراحی شده روی وکتور استفاده گردید (۱۲).

واکنش PCR برای ژن هر یک از زیرواحدها به صورت جداگانه انجام گرفت و محصول هر واکنش پس از تفکیک روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت استخراج از ژل تخلیص شد. هضم آنزیمی محصول PCR هر یک از ژن‌ها، همچنین وکتور pET22b به وسیله آنزیم‌های محدودکننده EcoRI و XhoI انجام شد و واکنش لیگاسیون با نسبت ۳:۱ اینسرت/ وکتور با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase طبق پروتکل کارخانه صورت گرفت و پلاسمیدهای نو ترکیب pET22b-INHA، pET22b-INHBa و pET22b-INHBB به دست آمد.

در ادامه، کشت سلولی از اشرشیاکلی (سویه BL21) تهیه گردید، سپس به ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB Broth منتقل و مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (با دور ۲۵۰rpm) انکوبه شد.

## Archive of SID

در مرحله بعد، از سلول‌های ترانسفورم شده با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج و با استفاده از دو آنزیم محدودکننده EcoRI و XhoI، هضم دوگانه آنزیمی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت، سپس محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. پس از تفکیک روی ژل برای هر کدام از نمونه‌ها دو باند به دست آمد که به ترتیب قطعه بزرگتر مربوط به پلاسمید خطی و قطعه کوچکتر مربوط به اینسرت بود. پلاسمیدهای نو ترکیب تکثیر یافته در سلول‌های ترانسفورم استخراج و برای تعیین توالی به شرکت سیناکلون فرستاده شدند که پس از توالی‌یابی، وجود اینسرت در آن مورد تأیید قرار گرفت.

سلول‌های ترانسفورم شده (بیان کننده هریک از زیرواحدهای اینهیین)، در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth به طور جداگانه کشت داده شده و در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. پس از رسیدن به  $OD_{600}=0.4$  با IPTG (1Mm) القا شدند، سپس نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری در ساعت‌های ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القا، از نمونه اصلی تهیه و پس از سونیکاسیون از نظر بیان پروتئین نو ترکیب روی ژل SDS-PAGE 15% بررسی شدند. پس از بررسی نمونه‌های ترانسفورم شده از نظر بیان پروتئین نو ترکیب، بهترین نمونه انتخاب و در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth کشت داده شد و ۱۶ ساعت انکوبه گردید، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از نمونه اول به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه و در انکوباتور شیکردار (با دور ۲۵۰rpm) انکوبه شد. پس از رسیدن به  $OD_{600}=0.4$  با IPTG (1Mm) القا و یک Overnight انکوبه گردید، سپس توده سلولی به وسیله سانتریفوژ (با دور ۲۷۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) تهیه شد. زیرواحدهای پروتئینی با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTI طبق پروتکل کارخانه، استخراج و تخلیص شدند. در ادامه، پس از بررسی نمونه‌ها و تفکیک آنها در ژل پلی‌آکرلامید، باندهای پروتئینی به غشای PVDF منتقل شدند (۱۳)؛ که بدین منظور از بافر انتقال (بیس - تریس، متانول و گلیسین) استفاده شد، سپس غشا در محلول بلوکه کننده (شیر ۳٪ چربی) قرار گرفت و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار (با دور ۱۰۰rpm) انکوبه شد.

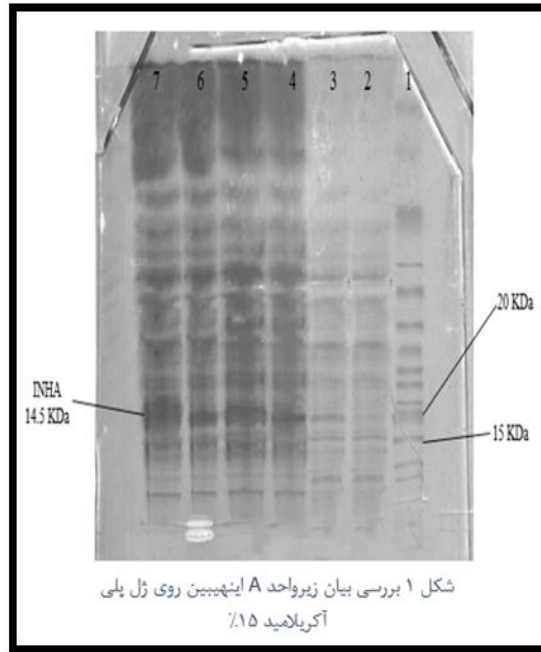
در مرحله بعد، His-Tag آنتی‌بادی موشی به آن اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور (با دور ۱۰۰rpm) قرار داده شد. پس از این مراحل، آنتی‌بادی ثانویه به نمونه افزوده شد. پس از گذشت یک ساعت انکوباسیون (در نتیجه واکنش  $H_2O_2$  و دی‌آمینوبنزیدين)، باندهای پروتئینی ظاهر شدند (۱۴).

توده سلولی حاصل، از ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تهیه گردید و به آن ۲۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده اضافه و به خوبی پیچاژ شد. طی یک برنامه سونیکاسیون ۶ مرحله‌ای، نمونه‌ها روی یخ سونیکه شدند. مایع رویی نمونه‌ها با استفاده از سانتریفوژ (با دور ۱۲۰۰۰rpm) جمع‌آوری شد، سپس ۲۰ میلی‌گرم از بیدهای نیکل به نمونه اضافه و پس از یک ساعت قرار گرفتن در دمای ۴ درجه، سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. مراحل شست‌وشو با بافر شست‌وشو، ۳ مرتبه تکرار گردید و در نهایت، به رسوب حاصل از آخرین مرحله شست‌وشو، ۳۰۰ میکرولیتر بافر الوشن افزوده و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه در شیکر قرار گرفت، سپس نمونه‌ها (با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه) سانتریفوژ شدند. مایع رویی (حاوی زیرواحدهای پروتئینی نو ترکیب) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۵).

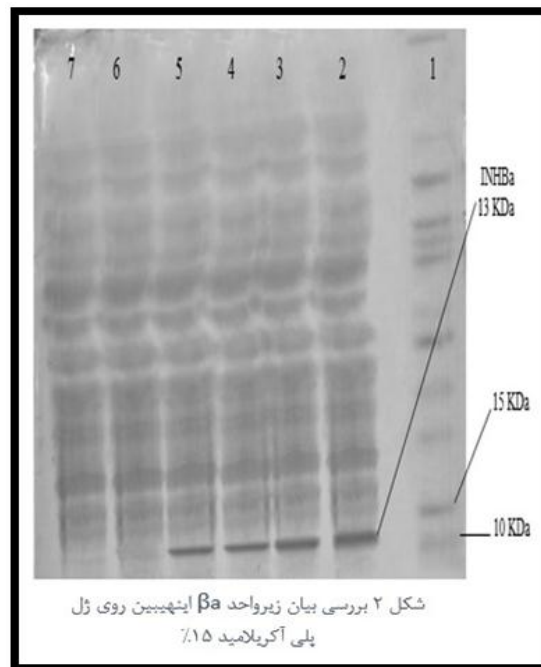
### یافته‌ها

نتایج حاصل از PCR ژن زیرواحدهای اینهیین نشان داد تکثیر این ژن در دمای ۶۳ و ۶۴ درجه به خوبی انجام شده است و این دمای بالا می‌تواند به علت وجود لوپ در ساختار پرایمرها باشد. همچنین تخلیص فرآورده PCR ژن زیرواحدهای اینهیین با کیت استخراج از ژل به درستی انجام گرفت و باندهای ۴۱۲، ۳۶۳ و ۳۶۰ کیلو بازی به ترتیب مربوط به زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  به دست آمد. تأیید فرآیند کلونینگ به روش هضم دوگانه آنزیمی با آنزیم‌های EcoRI و XhoI به درستی صورت گرفت که در این فرآیند قطعه بزرگتر مربوط به پلاسمید خطی شده و قطعه کوچکتر مربوط به اینسرت بود. شکل شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب نشان‌دهنده بررسی بیان زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  اینهیین در روش SDS-PAGE می‌باشند.

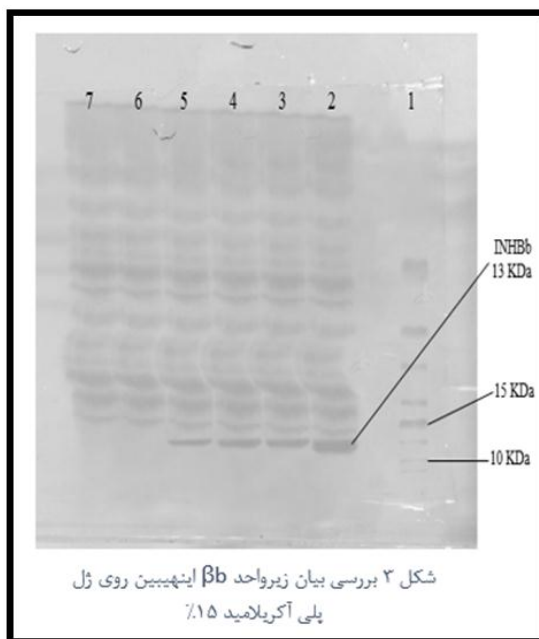
پس از بررسی نمونه‌های ترانسفورم شده از نظر بیان پروتئین نو ترکیب، بهترین نمونه انتخاب و در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth کشت داده شد و ۱۶ ساعت انکوبه گردید، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از نمونه اول به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه و در انکوباتور شیکردار (با دور ۲۵۰rpm) انکوبه شد. پس از رسیدن به  $OD_{600}=0.4$  با IPTG (1Mm) القا و یک Overnight انکوبه گردید، سپس توده سلولی به وسیله سانتریفوژ (با دور ۲۷۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) تهیه شد. زیرواحدهای پروتئینی با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTI طبق پروتکل کارخانه، استخراج و تخلیص شدند. در ادامه، پس از بررسی نمونه‌ها و تفکیک آنها در ژل پلی‌آکرلامید، باندهای پروتئینی به غشای PVDF منتقل شدند (۱۳)؛ که بدین منظور از بافر انتقال (بیس - تریس، متانول و گلیسین) استفاده شد، سپس غشا در محلول بلوکه کننده (شیر ۳٪ چربی) قرار گرفت و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار (با دور ۱۰۰rpm) انکوبه شد.



شکل شماره ۱: بررسی بیان زیرواحد  $\alpha$  اینهیبین روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪. به ترتیب از راست به چپ: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۲ نمونه کنترل منفی و ستون‌های ۳-۷ نمونه‌های القا شده با PTG(1Mm) در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ بعد از القای می‌باشد

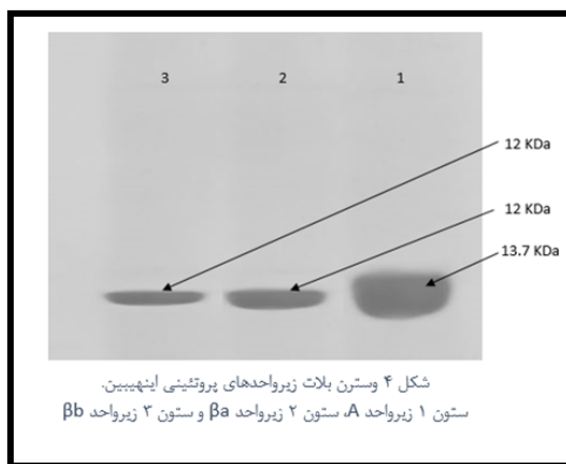


شکل شماره ۲: نتایج بررسی بیان زیرواحد  $\beta$  اینهیبین روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪. به ترتیب از راست به چپ: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۲ نشان‌دهنده نمونه کنترل منفی و ستون‌های ۳-۷ بیان پروتئین نو ترکیب را پس از القای با PTG(1Mm) به ترتیب در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القا نشان می‌دهد

شکل شماره ۳: بیان زیرواحد  $\beta b$  اینهیبین روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪.

به ترتیب: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۷ نمونه کنترل منفی و ستون‌های ۲-۶ بیان پروتئین نوترکیب در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القای با IPTG (1Mm) را نشان می‌دهد

همان‌طور که در این شکل‌ها مشاهده می‌شود، زیرواحدهای اینهیبین به ترتیب با اوزان مولکولی ۱۴/۷، ۱۳ و ۱۳ کیلودالتون بیان شده‌اند.

شکل شماره ۴: بیان زیرواحد  $\beta b$  اینهیبین روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪.

به ترتیب: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۷ نمونه کنترل منفی و ستون‌های ۲-۶ بیان پروتئین نوترکیب در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القا با PTG (1Mm) را نشان می‌دهد

### بحث

امروزه، هورمون اینهیبین به‌عنوان مارکری در تشخیص بیماری‌های ژنتیکی و ناهنجاری‌های جنینی شناخته شده است (۱۶)، و سنجش دقیق آن در تشخیص بسیاری از این بیماری‌ها نقش مؤثری دارد (۱۷).

در بررسی بیان زیرواحدهای اینهیبین به روش وسترن بلات باندهای پروتئینی زیرواحدهای اینهیبین روی غشای PVDF قابل ردیابی هستند (شکل شماره ۴).

پروتئین کامل اینهیبین دارای ۲ جایگاه گلیکوزیله و ۱ پیوند دی سولفیدی است، ولی به نظر می رسد با توجه به مطالعات گذشته، وجود یا عدم وجود این موارد در ساخت آنتی بادی تأثیری نداشته و می توان از میزبان های پروکاریوتی نیز به این منظور استفاده کرد. در مطالعه حاضر، قطعات ۱۳۴، ۱۱۶ و ۱۱۵ آمینواسیدی به ترتیب برای زیرواحدهای  $\alpha$ ،  $\beta a$  و  $\beta b$  جهت کلونینگ در نظر گرفته شدند و پس از کلون سازی در اشرشیاکلی، تولید و تخلیص شدند. در این طرح از میزبان اشرشیاکلی (سویه BL21) استفاده گردید که رشد سریعی داشته و می تواند مقادیر زیادی پروتئین نو ترکیب تولید کند (۱۹). همچنین با استفاده از وکتور pET22b به عنوان وکتور بیانی، توالی ژنی کدکننده هریک از زیرواحدهای پروتئین اینهیبین در آن کلون شد. مقادیر پروتئین نو ترکیب تولید شده در این طرح به طور قابل توجهی زیاد بود و محصول آن توانست در مطالعات دیگر برای ساخت آنتی بادی مونوکلونال استفاده گردد.

### نتیجه گیری

هورمون اینهیبین با وجود داشتن ساختار گلیکوپروتئینی و باندهای دی سولفیدی، در میزبان پروکاریوتی قابل تولید است و با توجه به نتایج، اشرشیاکلی (سویه BL21)، میزبان مناسبی برای کلونینگ و تولید هورمون اینهیبین نو ترکیب می باشد. به این ترتیب هورمون اینهیبین نو ترکیب تولید شده در این فرآیند به دلیل داشتن نواحی آنتی ژنیک هورمون بالغ، کاربردهای فراوانی جهت ساخت آنتی بادی مونوکلونال علیه اینهیبین خواهد داشت. همچنین کلون سازی هریک از زیرواحدهای اینهیبین در میزبان مجزا، امکان تخلیص هریک از آنها را به طور خالص فراهم کرده که این امر جهت ساخت آنتی بادی اختصاصی مناسب تر خواهد بود.

مهم ترین بیماری مرتبط با اینهیبین، سندرم داون است؛ به طوری که سطح سرمی آن در مادران با جنین مبتلا، افزایش معنی داری نشان می دهد. اندازه گیری اینهیبین در کنار سایر هورمون ها؛ از قبیل آلفا فیتوپروتئین، گنادوتروپین جفتی و استروژن غیر کونژوگه در تأیید سندرم داون انجام می شود (۱۸). علاوه بر این، سنجش میزان اینهیبین در خون زنان می تواند به عنوان مارکری برای تشخیص سرطان تخمدان استفاده گردد. در مردان نیز میزان اینهیبین نشان دهنده عملکرد اسپرماتوژنز و باروری است. در میان روش هایی که تاکنون برای سنجش میزان اینهیبین مورد استفاده قرار گرفته، روش های مبتنی بر آنتی بادی مونوکلونال از حساسیت بیشتری برخوردارند. در این روش ها با استفاده از آنتی بادی ساخته شده علیه زیرواحدهای اینهیبین می توان مقدار آن را به صورت کیفی (وسترن بلات) و یا کمی (الایزا) اندازه گیری کرد. روش های مبتنی بر آنتی بادی مونوکلونال مانند وسترن بلات و الایزا نسبت به سایر روش ها در سنجش میزان اینهیبین دقت بالایی دارند (۶). در بسیاری از این تست ها از آنتی بادی علیه سه زیرواحد اینهیبین استفاده می شود. زیرواحد  $\alpha$  در هر دو اینهیبین A و B وجود دارد و آنتی بادی علیه آن می تواند برای اندازه گیری آنها استفاده گردد. آنتی بادی علیه زیرواحدهای  $\beta$  نیز در افتراق اینهیبین A و B می تواند مورد استفاده قرار گیرد. بخش هایی از زیرواحدهای اینهیبین که در پروتئین کامل در گردش خون وجود دارند می توانند به عنوان اهدافی برای تولید آنتی بادی مونوکلونال استفاده شوند. ساخت آنتی بادی علیه اینهیبین نیازمند پروتئین سالم، خالص و فراوان بوده که می توان به این منظور از تکنیک کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب در میزبان پروکاریوتی استفاده کرد.

### References:

1. Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK. Molecular biology of inhibin action. *Semin Reprod Med* 2004;22(3):269-76. PubMed
2. Kim YI, Park SW, Kwon HS, Yang HS, Cho SY, Kim YJ, et al. Inhibin- $\alpha$  gene mutations and mRNA levels in human lymphoid and myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2017;50(4):1403-12.
3. Aitken DA, Wallace EM, Crossley JA, Swanston IA, van Pareren Y, van Maarle M, et al. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *N Engl J Med* 1996;334(19):1231-6. PubMed



4. Pangas S, Woodruff T. Production and purification of recombinant human inhibin and activin. *J Endocrinol* 2002;172(1):199-210. PubMed
5. Hall JE, Weltand CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 1999;14(2):409-15. PubMed
6. Maymon R, Cuckle H, Herman A. Maternal serum inhibin levels in twin and singleton pregnancies conceived by assisted reproduction. *Hum Reprod* 2006;21(5):1305-8. PubMed
7. Ahmad I, Jagtap DD, Kumar CS, Balasinor NH, Rani AB, Agarwal D, et al. Molecular characterization of inhibin-A: Structure and expression analysis in *Clarias batrachus*. *General and comparative endocrinology*. 2018;261:104-14.
8. Schwartz NB, Channing CP. Evidence for ovarian "inhibin": Suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by injection of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5721-4. PubMed
9. Good T, Weber P, Ireland J, Pulaski J, Padmanabhan V, Schneyer A, et al. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod* 1995;53(6):1478-88. PubMed
10. Forage RG, Ring JM, Brown RW, McInerney BV, Cobon GS, Gregson RP, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5721-4. PubMed
11. Esch F, Shimasaki S, Cooksey K, Mercado M, Mason A, Ying S-Y, et al. Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibins. *Mol Endocrinol* 1987;1(5):388-96. PubMed
12. Leversha L, Robertson D, De Vos F, Morgan F, Hearn M, Wettenhall R, et al. Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J Endocrinol* 1987;113(2):213-21. PubMed
13. Boributh S, Chanachai A, Jiratananon R. Modification of PVDF membrane by chitosan solution for reducing protein fouling. *J Membrane Sci* 2009;342(1-2):97-104.
14. Mayo KE, Cerelli GM, Spiess J, Rivier J, Rosenfeld MG, Evans RM, et al. Inhibin A-subunit cDNAs from porcine ovary and human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(16):5849-53. PubMed
15. Ramasharma K, Murthy HS, Moudgal N. A rapid bioassay for measuring inhibin activity. *Biol Reprod* 1979;20(4):831-5. Link
16. Davis S, Krozowski Z, McLachlan R, Burger H. Inhibin gene expression in the human corpus luteum. *J Endo* 1987;115(3):R21-R3. [PubMed](#)
17. Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, Boracchi P, Biganzoli EM, Panteghini M. Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: A systematic review. *J Clin Pathol* 2013;66(4):273-81. [PubMed](#)
18. Sonek JD, Nicolaides KH. Prenatal ultrasonographic diagnosis of nasal bone abnormalities in three fetuses with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(1):139-41. [PubMed](#)
19. Chen H, Wang B, Wang JX, Chen Q. Expression of epitopes of human inhibin subunits and preparation of its antibodies. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing. Natural Sci* 2009;12:18. Link