مقاله پژوهشی

کلونینگ و بررسی بیان ژن کد کننده BMP-2 انسانی در باکتری E. coli به منظور تولید یک داروی نوترکیب

نژاد محمدی*، دکتر جمشید کریمی**، نوشین شباب***، سمانه نادری*، دکتر رضا یادگار آذری****
دکتر مسعود سعیدی جم*****

دریافت: ۹۳/۲/۳ پذیرش: ۹۳/۶/۱۸

چکیده:

مقدمه و هدف: پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی، گروهی از سایتوکاین‌های متعلق به ابرخانواده TGFβ می‌باشند. این پروتئین‌ها در تکامل بسیاری از ارگان‌ها و بافت‌ها، طی دوران جنینی و پس از آن در ترمیم و بازسازی بافت‌های استخوان و غضروف، نقش دارند. هدف از این مطالعه، کلونینگ و بررسی بیان این پروتئین در باکتری E.Coli می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی توالی cDNA مربوط به پپتید بالغ پروتئین مورفوژنتیک انسانی۲ (BMP-2) در باکتری E.Coli کلون شد. پلاسمید نوترکیب pET28a/BMP-2 پس از توالی یابی به باکتری بیانی E.coli BL21(DE3) ترانسفرم گردید. باکتری نوترکیب در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷°C کشت داده شد. القا با IPTG صورت گرفت. بررسی بیان به کمک RT-PCR و SDS-PAGE و تأیید بیان با وسترن‌بلاتینگ انجام شد.

نتایج: توالی ژنی به کمک PCR تکثیر یافت. بعد از آماده‌سازی ژن و پلاسمید، واکنش اتصال صورت گرفت. توالی یابی، صحت کلونینگ را نشان داد. بررسی بیان با RT-PCR و SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان پروتئین بود. وسترن بلاتینگ نتایج را تأیید کرد.

نتیجه نهایی: بیان بالای پروتئین نوترکیب در سیستم پروکاریوتی حاصل شد. استفاده از غلظت‌های متفاوت القا کننده در ساعت‌های مختلف نشان داد که ٤ ساعت بعد از القا با غلظت 1mM از IPTG، بیشترین بیان را داریم.

کلید واژه ها: اشریشیاکلی / پروتئین های مورفوژنتیک استخوانی / پروتئین های نوترکیب

مقدمه:

پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (Bone Morphogenetic Proteins)، گروهی از سایتوکاینهای متعلق به خانواده BMP و ابرخانواده فاکتور ترانسفورم کننده رشد (TGFβ) می‌باشند. این پروتئین‌ها در تکامل بسیاری از ارگان‌ها و بافت‌ها، طی دوران جنینی و پس از آن در ترمیم و بازسازی بافت‌هایی همچون استخوان و غضروف، متعاقب آسیب و بیماری نقش دارند. BMP ها توانایی تنظیم چسپندگی سلولی، تکثیر، تمایز و آپوپتوز را در انواع بافت‌های مختلف از جمله استخوان دارند. تاکنون حدود ۲۰ نوع از BMP ها شناسایی شده‌اند که هر کدام از این پروتئین‌ها درجات متفاوتی از توانایی القای استخوان یا غضروف را دارا می‌باشند (۱،۲).

BMP ها بطور مستقم از استخوان نیز جدا می شوند اما مقدار تولیدی آنها کم می باشد (1-3 ηg/kg) بعلاوه، مراحل خالص سازی پیچیده و وقت‌گیر و مهمتر از همه آنتی ژنیسیته برای سیستم ایمنی بدن و خطر انتقال آلودگی در ارتباط با استخوان دهنده، باعث می شود تا BMP ها با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب، در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی تولید گردند (۳).

* کارشناسی ارشد زیست فن آوری پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
*** کارشناس آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان
**** استادیار گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
***** دانشیار زیست فن آوری پزشکی عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی همدان (sjam110@yahoo.com)

Archive of SID
www.SID.ir

BMP-2 درون بدن بصورت پیش‌ساز مولکولی بزرگ ۳۹۶ آمینو اسیدی شامل پپتید نشانه، پرودومن و دومن بالغ سنتز می شود. پس از گلیکوزیلاسیون و شکست پروتئولیتیکی، دو پلی پپتید بالغ فعال از نظر بیولوژیکی شامل ۱۱۴ آمینو اسید، به کمک پیوندهای دی‌سولفیدی، شکل دایمر BMP-2 را بوجود می آورند (۴).

BMP-2 برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط مارشال یوریست، از استخوان، جداسازی و شناسایی گردید (۵). BMP-2 برای استفاده کلینیکی در سال ۲۰۰۲ توسط FDA تأیید گردید. این پروتئین هم اکنون بصورت تجاری در دسترس بوده و بعنوان یک جایگزین مناسب پیوند آلوگرافت استخوان در مواردی همچون جوش خوردن مهره‌ها، درمان نقایص استخوانی،ثابت کردن شکستگی‌ها و ترمیم ناهنجاری و شکستگی استخوان‌های صورت و فک مورد استفاده قرار می گیرد. در این موارد،BMP ها با استفاده از یک حامل زیست تخریب پذیر، به محل آسیب انتقال داده می شوند (۸-۶).

هدف از این مطالعه، کلون کردن توالی مربوط به پپتید بالغ BMP-2 جهت تولید انبوه این پروتئین در باکتری اشریشیا کلی به منظور تولید یک داروی نوترکیب در داخل کشور می باشد. این پروتئین جهت درمان شکستگی‌های استخوانی، ترمیم ساییدگی مفاصل و درمان افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن استخوانی، کاربرد دارد.

روش کار:

بخش بیوانفورماتیکی: توالی cDNA مربوط به BMP-2 بالغ از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج گردید(NM_001200.2). جهت تسهیل در امر کلونینگ و ترجمه تغییراتی از جمله اضافه کردن کدون شروع و خاتمه، توالی برش آنزیم محدود کننده در انتهای '۵ و '۳، برچسب هیستیدینی و توالی برش انتروکیناز روی توالی ژن صورت گرفت. با مجموعه تغییرات صورت گرفته توالی مورد نظر به ۳۹۲ جفت باز افزایش یافت. سپس توالی جدید بصورت بیوشیمیایی سنتز گردید (Biomatic, Canada).

تکثیر ژن: توالی cDNA سنتز شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و به کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر داده شد. فرایند PCR تحت شرایط زیر انجام شد: مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل متوالی از مراحل واسرشت در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. پس از تکثیر ژن محصول PCR بر روی ژل آگارز ٪۱ بارگذاری گردید.

هضم آنزیمی: محصول واکنشPCR و پلاسمید pET28a هر دو تحت هضم دو آنزیمی باNcoIوXhoI از محصولات شرکت فرمنتاز آلمان قرار گرفتند. محصول هردو واکنش دو آنزیمی روی ژل۱٪ بار گذاری شدند و با کیت استخراج از ژل (Bioneer, Korea) خالص گردیدند. غلظت ژن و پلاسمید خالص شده، با نانودراپ (BioTek, USA) سنجش شد.

واکنش اتصال: با استفاده از آنزیم T_4 لیگاز (Fermentase, Germany)، ژنBMP-2 به درون پلاسمیدpET28a وارد شد و پلاسمید نوترکیب ایجاد شده،pET28a/BMP-2 نام گرفت. جهت تأیید صحت وارد شدن ژن به درون پلاسمید، ابتدا پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید از باکتریE.Coli TOP10، استخراج و تحت واکنش هضم دو آنزیمی قرار گرفت و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پلاسمید نوترکیب توالی یابی گردید (Biomatic, Canada).

بیان پروتئین: پلاسمید نوترکیب به باکتری E.coli BL21(DE3) مستعد شده به روش شیمیایی با استفاده از شوک حرارتی انتقال گردید. سپس باکتری انتقال شده در محیط لوریا برتانی (LB) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۱۰mg/ml) در شیکر انکوباتور°c ۳۷ با دور rpm 200 به مدت۱۶-۱۲ ساعت کشت داده شد. زمانیکهOD به۰/۶-۰/۴ رسید، القا با IPTG در غلظت نهایی یک میلی مولارصورت گرفت و در همان دما و دور قرار داده شد. دو ساعت بعد از

جدول ۱: توالی پرایمرهای پیشرو و پیرو

ردیف	نوع پرایمر	طول قطعه تکثیری (توکلوتید)	جایگاه برش آنزیم	سایت برش آنزیمی	سکانس پرایمر
1	*BMP-2a* **F**	**392**	***Nco* I**	**5...CCATGG...3 3...GGTACC...5**	5'GTCAGACCATGGGACACCACCACC ACCACCACGAC-3'
2	*BMP-2a* **R**	**392**	***Xho* I**	**5...CTCGAG...3 3...GAGCTC...5**	5'GTCAGACTCGAGCTAGCGACACCC ACAACCCT-3'

Archive of SID

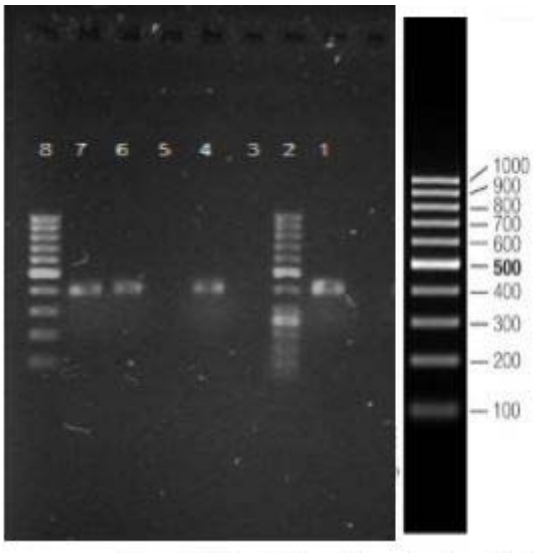
www.SID.ir

القـا و چهـار سـاعت بعـد از القـا، جهـت بررسـی بیـان، رسوب‌گیری با سـانترفوژ در دور 12000 rpm بـه مـدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

بررسی بیان: بررسی بیـان در سـطح RNA و پـروتئین بـه ترتیـب بـه کمـک روش Reverse Transcriptase PCR و تکنیک SDS-PAGE و تأییـد بیـان بـا وسـترن بلاتینـگ صورت گرفت. استخراج RNA با استفاده از محلول تجاری RNX-Plus و سنتز cDNA با استفاده از RevertAid M-Mul Reverse Transcriptase و پرایمـرهـای هگزامـر تصادفی طبق پروتکل، از کلنی‌هـای غربـال شـده، صـورت گرفت. بـه منظـور حـذف DNA Genomic، از DNAase استفاده شد. در نهایت با استفاده از cDNA سنتز شده بـه عنوان template و پرایمـرهـای اختـصاصی طراحـی شـده واکنش PCR صورت گرفت. پـس از انجـام واکـنش PCR، محصول بدست آمده برای مشاهده نتیجه حاصل از بیـان ژن در سـطح RNA، بـر روی ژل آگـارز ۱٪ منتقـل شـد. همچنین جهت بررسی بیان در سطح پروتئین، رسـوب دو میلی لیتر از باکتری همراه با بافر نمونه آمـاده‌سـازی و بـر روی ژل اکریل آمید ۱۵٪ به همراه مارکر وزن مولکولی بار گذاری گردید. تأیید بیان به کمک آنتی‌بـادی مونوکلونـال تک مرحله‌ای اختصاصی علیه ناحیـه هیـستیدین نـشاندار شده با HRP از کلاس Mouse Ig، انجام گرفـت. پـروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده از ژل الکتروفورز، مشخص و به غشای نیتروسلولزی منتقل گردید سپس بـا اسـتفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی ضد برچسب هیـستیدینی تک مرحله‌ای نـشاندار شـده بـا HRP مـورد بررسـی قـرار گرفت.

نتایج:

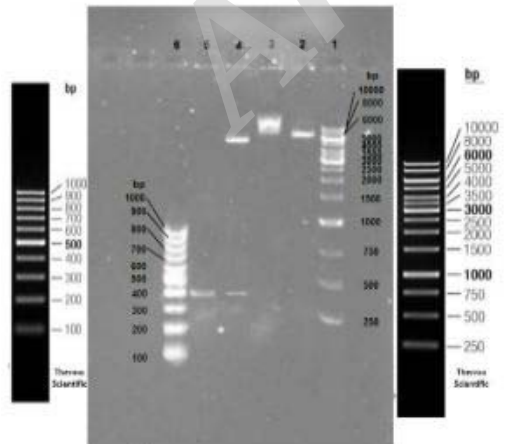
بعد از انجـام کلونینـگ، صـحت پلاسـمید نوترکیـب pET28a/BMP-2 تولید شده مورد بررسـی قـرار گرفتـه و غربالگری کلنی‌های بدست آمده با واکنش PCR مـستقیم از کلنی‌ها انجام شد. نتایج در شکل ۱، نشان‌دهنده وجـود کلنی‌های دارای ژن مورد نظر بود. در این شکل ستون‌های ۴ و ۶ و ۷، کلنی‌های رشـد کـرده دارای پلاسـمید بیـانی حاوی ژن و ستون ۵، کلنـی رشـد یافتـه دارای پلاسـمید بیانی اما فاقد ژن مورد نظر می‌باشد. همچنین سـتون ۳ و ۱ به‌ترتیب بعنوان کنترل مثبت (محصول PCR) و کنتـرل منفـی (کلنـی دارای پلاسـمید بیـانی فاقـد ژن) گذاشـته شده‌اند.



شکل ۱: بررسی واکنش اتصال با PCR مستقیم

ستون ۱، کنترل مثبت(نتیجه PCR بر روی پلاسمید pGEM دارای ژن سنتز شده). ستون ۲ و ۸ مارکر DNA (Thermo Scientific) ستون ۳، کنترل منفی (کلنی دارای پلاسمید بیانی فاقد ژن). ستون های ۴ و ۶ و ۷، کلنی های رشد کرده دارای پلاسمید بیانی حاوی ژن. سـتون ۵، کلنی رشد یافته دارای پلاسمید بیانی اما فاقد ژن مورد نظر

واکنش هضم تک و دو آنزیمـی بـا آنـزیم‌هـای NcoI و XhoI برای تأیید واکنش اتصال صورت گرفـت کـه نتـایج حاصل از این هضم دو آنزیمی نـشان‌دهنـده خـروج ژن از بدنـه وکتـور و قـرارگیـری در ناحیـه ۳۹۲ جفـت بـازی بود، این وکتور سبک‌تر از وکتور دارای ژن بوده و در طـول ژل، بیشتر حرکت کرده است. نتایج حاصل از تـوالی یـابی نیز نشان داد که ژن مورد نظر در ناحیـه MCS پلاسـمید، بین جایگاه آنـزیم‌هـای NcoI و XhoI قـرار گرفتـه اسـت (شکل ۲).



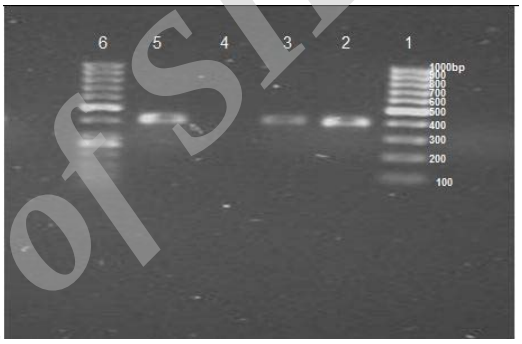
شکل ۲: بررسی واکنش اتصال با برش تک و دو آنزیمی

سـتون ۱ و ۶، مـارکر DNA (Thermo Scientific)، سـتون ۲، پلاسـمید نوترکیب تک برشی با RE. ستون ۳، پلاسمید نوترکیب فاقد بـرش. سـتون۴، پلاسمید نوترکیب برش یافته با دو RE. ستون ۵، محصول PCR

Archive of SID

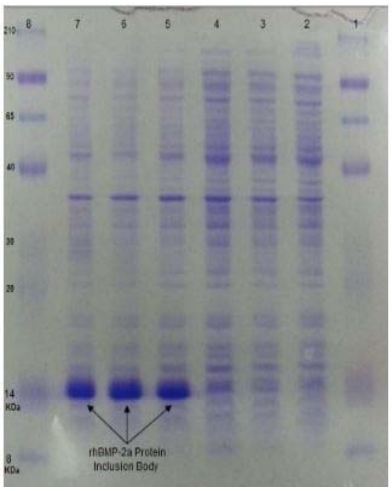
www.SID.ir

بیان پروتئین در باکتری میزبان: ابتدا بررسی بیان در سطح RNA و با استفاده از روش PCR Reverse Transcriptase صورت گرفت. همانطور که در شکل ۳ پیداست؛ نتایج نشان‌دهنده وجود باند ژنی در ناحیه ۳۹۲ جفت بازی می باشد. در این شکل، از باکتری دارای پلاسمید نوترکیب؛ قبل از القا، دو و سه ساعت بعد از القا نمونه برداری شد. نتایج نشان‌دهنده وجود mRNA مربوط به ژن BMP-2 در ساعت‌های بعد از القا بود (ستون ۲ و ۳). همچنین بررسی بیان به کمک SDS-PAGE انجام شد، نتایج نشان‌دهنده باند پروتئینی در ناحیه ۱۴ کیلو دالتون بود (شکل ۴). تأیید بیان پروتئین نیز با استفاده از روش وسترن بلاتینگ انجام شد. نتایج مؤید وجود پروتئین نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی بود (شکل ۵).



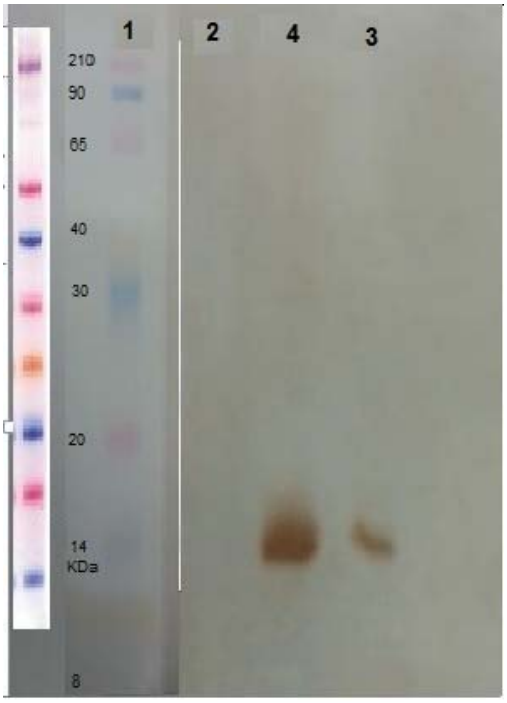
شکل ۳: واکنش RT-PCR

ستون ۱و ۶ ، مارکر DNA. ستون ۲و ۳ باکتری دارای پلاسمید نوترکیب به ترتیب در دو و سه ساعت بعد از القا، ستون ۴، باکتری دارای پلاسمید نوترکیب قبل از القا. ستون ۵، کنترل مثبت (محصول PCR)



شکل ۴: بررسی بیان با SDS-PAGE

ستون های ۱و۸ مارکر پروتئینی (sigma). ستون۲، باکتری BL21(DE3) فاقد پلاسمید نوترکیب قبل از القا. ستون۳، باکتری BL21(DE3) فاقد پلاسمید نوترکیب بعد از القا. ستون ۴، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب قبل از القا. ستون ۵، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب ۲ساعت بعد از القا. ستون ۶، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب ۴ ساعت بعد از القا. ستون ۷، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب ۱۶ ساعت بعد از القا



شکل ۵: نتیجه وسترن بلاتینگ با آنتی بادی علیه توالی برچسب هیستیدینی

ستون ۱، مارکر پروتئینی. ستون ۲، بلاتینگ بر روی عصاره باکتری دارای پلاسمید نوترکیب در زمان قبل از القا. ستون ۳، نتیجه بلاتینگ بر روی عصاره باکتری دارای پلاسمید نوترکیب ۲ ساعت بعد از القا. ستون ۴، بلاتینگ بر روی عصاره باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب ۴ ساعت بعد از القا

بحث:

پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (BMPs) از اعضای خانواده پروتئین مورفوژنتیک استخوانی و ابر خانواده (TGFβ) می‌باشند. BMP-2 یکی از اعضای این خانواده است که از همان اوایل جنینی در تکامل اعضاء، کنترل پروسه‌های سلولی، تنظیم ساخت و بازسازی استخوان، غضروف، تاندون و رباط مشارکت می کند اما بواسطه نقش پر اهمیت آن در بازسازی استخوان و غضروف، شناخته شده است. BMP-2 از طریق تمایز پیش‌سازهای استخوانی به سلول‌های تشکیل دهنده بافت استخوانی، به بازسازی بافت قابل تغییر استخوان کمک می‌کند. بواسطه اهمیت این پروتئین، تصمیم به تولید فرم نوترکیب BMP-2 در سیستم پروکاریوتی گرفته شد نتایج نشان‌دهنده تولید این پروتئین نوترکیب به مقدار زیاد در این سیستم بود.

BMP-2 برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ میلادی کلون شد. رتنونینگرام و همکارانش در سال ۲۰۱۲ (۹) و گو و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۱۰)، بخش کد کننده مربوط به

Archive of SID
www.SID.ir

پپتیـد بـالغ ایـن پـروتئین را بـه ترتیـب در پلاسـمید بیانیpET32b و pET11b کلون کردند. همچنـین آنهـا از برچسب هیـستیدینی تعبیـه شـده در بخـش N-ترمینـال برای خالص سازی استفاده نمودند. مقایسه نتـایج بدسـت آمـده از مطالعـه حاضـر بـا نتـایج بدسـت آمـده توسـط رتنونینگرام و همکـارانش، یکـسان بـود. از آنجـا کـه آنهـا فراینـد خـالص سـازی و بررسـی اثـرات بیولـوژیکی ایـن پروتئین را انجام دادند و تمایز سـلول‌هـای پـیش‌سـاز بـه سلول‌های استخوانی را مشاهده کردنـد مـی شـود نتیجـه گرفت که با خالص سازی ایـن پـروتئین بـه همـان نتـایج حاصل شده از کار آنها می توان دست یافت.

هدف از انتخاب بخش کد کننده پپتید بالغ این بود که با وجود حذف توالی‌های مربوط به پرودومن و پپتید نشانه، باز هم اثرات زیستی و قابلیت تمایز پیش‌سازها به سلولهای استخوانی و غـضروفی در پپتیـد بـالغ ۱۱۴ آمینـواسـیدی مشهود است و می‌توانـد بـه گیرنـده‌هـای سـرین‌ترئـونین کینازی اتصال یابـد و خـانواده پروتئینـی Smad را جهـت پیام رسانی بکار گیرد. چون پپتید بـالغ فاقـد بخـش‌هـای قندی است و نیازی به گلیکوزیلاسیون ندارد، می‌تـوان آن را در سیستم بیانی پروکاریوتی کـه فاقـد گلیکوزیلاسـیون اسـت، کلـون کـرد. پـس از تخلـیص ایـن پـروتئین مـی‌تـوان بـا انجـام پروسـه رناتوراسـیون پیونـدهـای دی سـولفیدی را احیـاء و شـکل دایمـر فعـال از نظـر بیولوژیکی را ایجاد کرد (۱۱).

پروتئین‌های هترولوگ در سیستم بیـانی پروکـاریوتی بـصورت انکلیـوژن بـادی در سیتوپلاسـم میزبـان تجمـع می‌یابند. این تجمعات علاوه بر اینکه بار متابولیکی وسیعی به سلول میزبان تحمیل می‌کنند، دارای اثرات سـمی نیـز می‌باشند و سلول زودتر وارد فـاز سـکون و در نهایـت فـاز مرگ می‌شود. در ایـن مطالعـه از وکتـورهـای گـروه pET استفاده شد. این وکتورها دارای پروموتر قوی T_7 می‌باشند و بیان بالایی از ژن پایین دست خود را حمایت مـی‌کننـد. سرعت تولید زیاد فرم نوترکیب ایـن پـروتئین در بـاکتری بیـانی E.coliBL21(DE3) منجـر بـه تجمـع پـروتئین هترولوگ در سیتوپلاسم میزبان، بـه فـرم انکلیـوژن بـادی می‌شود. با بررسی‌های انجام شده در زمان‌ها و غلظت‌هـای متفاوت از IPTG، این نتیجه بدست آمد که بیشترین بیان در ۴ ساعت بعد از القا و بهترین غلظت با 1mM از IPTG صورت می گیرد با توجه به این یافته می‌توان گفت کـــه؛ به دلیـل مـصرف انـرژی بـالا بـرای ترجمـــــه پـروتئین نوترکیب، سلول در چهار ساعت بعد از القا با کاهش انرژی مواجه شده و از آنطرف سمیت پـروتئین هترولـوگ بـرای سلول باعث می‌شود سلول زودتر وارد فـاز سـکون گـردد و مرحله به مرحله تولید پـروتئین نوترکیـب را کمتـر کنـد. همچنین غلظت 1mM از IPTG حداکثر توانایی بکارگیری اپرون Lac و پروموتر T_7 می‌باشد. با استفاده از روش‌هـایی چون کنترل دمایی در زمان القا و بعد از القا، تغییـر سـوش میزبـان، هـوادهی مناسـب و ... مـی‌تـوان بـه کـاهش تجمع پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم باکتریـایی کمـک کرد (۱۲،۱۳).

جهت افزایش کارایی اثر BMP-2 ها از حامل‌ها جهـت انتقـال دارو بـه بـدن اسـتفاده مـی شـود. پـس BMP-2 نوترکیب انسانی برای درمان شکستگی‌های استخوان ران و همچنین برای درمان نقایص و شکـستگی‌هـای اسـتخوان درشـت نـی، بـدون هـیچ عارضـه جـانبی و بـا نتـایج فوق العاده، بکار گرفتـه مـی‌شـوند. ایمپلنـت‌هـای حـاوی BMP، ممکـن اسـت در آینـده ای نزدیـک جـایگزین اتوگرافت‌های معمول در ترمیم شکستگی‌ها، نقایص سـر و صورت و اتصالات سـتون فقـرات شـوند کـه در نتیجـه آن سـرعت تـشکیل اسـتخوان جدیـد بیـشتر خواهـد شد (۳،۱۴،۱۵).

نتیجه نهایی:

با اتکا بر نتایج حاصله می‌توان پـروتئین BMP-2 را در سیستم‌های بیانی پروکاریوتی هماننـد اشریـشیا کلـی بـه میزان زیادی و در سطح انبوه در داخل کشور تولیـد نمـود تـا بتوانـد بـصورت یـک داروی نوترکیـب بـه راحتـی در دسترس عمـوم قـرار بگیـرد. ضـمن اینکـه باعـث کـاهش هزینه‌های درمانی و تسریع روند بهبودی بیمـاران گـردد و کمکی به بومی سازی علوم در کـشور شـود. همچنـین بـا توجه به نقش BMP-2 در مسیر سیگنالینگ و اهمیـت آن در بدن، نیاز است تـا جنبـه‌هـای دیگـر اثـر گـذاری ایـن پروتئین بر مسیرهای پیام رسانی، ترمیم، درمان و آپوپتـوز بافت‌های مختلف شناسایی گردد.

سپاسگزاری:

این مقاله برگرفته شده از پایان نامه کارشناسی ارشـد رشته زیست فنآوری پزشکی می باشد. از معاونـت محتـرم تحقیقات و فنآوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خـاطر حمایت مالی از این پروژه قدردانی می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع:

1. Du Y, Yip H. Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. Differentiation 2010;79: 84-92.
2. Balemans W, Hul WV. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. Dev Biol 2002;250 231-50.
3. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. Adv Drug Deliv Rev 2000;43(1):65-92.
4. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeyer M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. J Mol Biol 1999; 287(1): 103-15.
5. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965;150(3698):893-9.
6. Capra P, Conti B. The role of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in bone tissue engineering: a mini review. Scientifica Acta 2009;3(1):25-32.
7. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic. J Tissue Eng Regen Med 2008;2:10-13.
8. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). Int Orthop 2007;31: 729-34.
9. Retnoningrum DS. Codon optimization for high level expression of human BMP-2 in Escherichia coli. Protein Expres Purifi 2012; 84: 188-94.
10. Guo W. Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from Escherichia coli. Proc Biochem 2012;47: 960-967.
11. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev 2009;20(5):343-55.
12. Alfasi SN. Physiological aspects underpinning recombinant protein production in Escherichia coli. Birmingham: University of Birmingham, 2011.
13. Rodríguez-Carmona E, Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Villaverde A, García-Fruitós E.. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. Microb Cell Fact 2010. doi: 10.1186/ 1475-2859-9-71.
14. Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. Spine 2002;27(16):16-23.
15. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone 1998;22(6):591-603

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Cloning of BMP-2 Gene and Its Expression Study in E. coli in Order to Produce a Recombinant Drug

N. Mohammadi, M.Sc.[*] ; J. Karimi, Ph.D.[**] ; N. Shabab, B.Sc.[***] ; S. Naderi, M.Sc.[*]
R. Yadegar Azari, Ph.D.[****], M. Saidijam, Ph.D.[*****]

Received: 23.4.2014 Accepted:

Abstract

Introduction & Objective: Bone morphogenetic proteins are a group of cytokines that belongs to superfamily TGFβ. These proteins play an important role in evolution of many of organs and tissues through germinal period followed by amending and rebuilding of bone tissue and cartilage. The aim of this study was to clone and expression analysis of BMP-2 gene in E. coli bacteria.

Materials & Methods: In this experimental study the sequence of cDNA related to the mature peptide of human morphogenetic protein-2 (BMP-2) in E.coli was synthesized and cloned in a PET system. After sequencing, recombinant plasmid pET28a/BMP-2 was transformed into the expression host, E.coli BL21 (DE3). The transformed bacteria were cultured in LB medium containing kanamaycin antibiotic at 37° C for O/N. Then, induction with IPTG took place. The expression was evaluated by reverse transcriptase PCR and SDS-PAGE followed by western blotting to confirm its identity. The observed band on SDS-PSGE showed the presence of the expressed protein at the 14k Dalton segment which was confirmed by western blotting technique.

Results: The gene sequence was amplified by PCR. After gene and plasmid preparation, legation was performed. Sequencing confirmed accuracy of cloning. Protein expression was demonstrated by RT-PCR and SDS-PAGE. Results were confirmed by western blotting.

Conclusion: In this study over-expression of this recombinant protein was achieved in a prokaryotic system. Different concentrations of inducer were applied and harvesting was performed in different times after induction. The best expression was detected in 4 hours after induction with a concentration of 1mM IPTG.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 21 (3): 196-202)

Keywords: Bone Morphogenetic Proteins / Escherichia coli / Proteins Recombinant

Archive of SID

* M.Sc. in Medical Biotechnology
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
* Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
*** B.Sc. in Biology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran
**** Assistant Professor, Department of Molecular Medicine & Genetics, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.
***** Associate Professor of Biotechnology, Molecular Medicine & Genetics Research Center
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (sjam110@yahoo.com)

www.SID.ir