

بررسی کلون و بیان هورمون نو ترکیب انسانی پاراتیروئید در مقیاس آزمایشگاهی

صادق مجدی، حسین امانی⁺، قاسم نجف پور

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران

مجید شهبازی

دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

چکیده: حفظ سطح غلظت کلسیم خون یک فرایند پویا است که با برهم کنش چند عضو مانند روده، کلیه و غده‌های پاراتیروئید صورت می‌گیرد. هورمون انسانی پاراتیروئید (hPTH) با افزایش جذب روده ای کلسیم و کاهش دفع کلیوی موجب افزایش سطح کلسیم خون می‌شود. از آنجایی که در صورت ناکافی بودن مقدار کلسیم در خون، به طور معمول این عنصر از استخوان‌ها برداشته می‌شود بنابراین کمبود این هورمون باعث پوکی استخوان و بیماری‌های ناشی از اختلال‌های غده‌های پاراتیروئید می‌شود. در این پژوهش از پلاسمید Puc 57 و سویه *Escherichia coli* DH5a برای کلون کردن و از پلاسمید Pet 32a(+) و سویه *Escherichia coli* BL21 برای بیان پروتئین استفاده شدند. در این پژوهش تولید پروتئین به صورت ناپیوسته در ارلن‌های یک لیتری و همچنین به صورت ناپیوسته به همراه خوراک دهی در یک فرماتور ۱۰ لیتری همزن دار بررسی شد. طبق نتیجه‌های این پژوهش، کشت ناپیوسته در ارلن‌ها نشان داد که پس از ۱۶ ساعت مقدار زیست توده و پروتئین نو ترکیب به ترتیب به $6/5 \text{ g/L}$ و $1/7 \text{ g/L}$ می‌رسد. همچنین در حالت ناپیوسته به همراه خوراک دهی، بیشترین مقدار زیست توده و پروتئین نو ترکیب درون فرماتور پس از ۱۲ ساعت به ترتیب به 81 g/L و 22 g/L به دست آمد. سرانجام تولید پروتئین نو ترکیب با دو آزمایش SDS-PAGE و Western blot مورد تایید قرار گرفت. در این پژوهش وجود باند پروتئینی در ناحیه ۳۷ کیلو دالتون نشان دهنده درستی بیان هورمون پاراتیروئید می‌باشد. با توجه به تولید موفقیت آمیز هورمون انسانی پاراتیروئید در این پژوهش و همچنین مزیت‌های باکتری اشریشاکولی به عنوان میزبان، به نظر می‌رسد این روش میتواند جایگزین مناسبی برای تولید این ماده ارزشمند دارویی باشد.

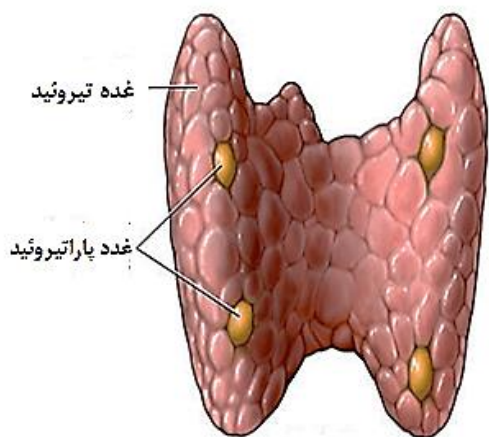
واژه های کلیدی: هورمون پاراتیروئید انسانی نو ترکیب، کلون، بیان، راکتور زیستی، کشت باکتری، Pet 32a(+), اشریشاکولی.

KEYWORDS: Recombinant human parathyroid hormone, Cloning, Expression, Bioreactor, Cultivation of bacteria, Pet 32a(+), *Escherichia coli*

مقدمه

داروهای زیستی به‌طور معمول شبیه ترکیب‌های موجود در بدن هستند و توسط بیوراکتورهای زیستی به روش زیست فناوری تولید می‌شوند. امروزه استفاده از این ویژگی‌ها برای درمان بیماری‌ها با عارضه‌های جانبی کم‌تر گسترش زیادی یافته است. بهترین و کاربردی‌ترین روش درمان برخی از بیماری‌ها استفاده از پروتئین‌ها می‌باشد. نخست پروتئین‌های طبیعی مورد نیاز از حیوانات، گیاهان و منابع انسانی تامین می‌شد. به تازگی با پردازش پلاسماي خون انسان بسیاری از پروتئین‌ها جداسازی شده و در درمان بیماری‌هایی مانند هموفیلی استفاده می‌شود [۱]. مطالعه‌های گذشته نشان داده است که انسولین تهیه شده از خون خوک که تنها در یک اسید آمینه با شکل انسانی متفاوت می‌باشد می‌تواند یک راه برای درمان بیماری دیابت باشد. اولین داروی نوترکیب انسولین با نام تجاری همولین^۱ با همکاری دو شرکت *الی لیلی*^۲ و *ژن تک*^۳ در سال ۱۹۸۲ میلادی توسط FDA^۴ تأیید و به بازار عرضه شد. این پروتئین‌های نوترکیب به تدریج جایگزین پروتئین‌های طبیعی شدند که از منابع حیوانی و انسانی به دست می‌آمدند [۱]. یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های نوترکیب هورمون پاراتیروئید است که می‌تواند کلسیم و فسفر خون را تنظیم کند [۲-۶]. این هورمون از ۴ غده پاراتیروئید که در پشت تیروئید قرار دارند ترشح می‌شوند. شکل ۱ جایگاه غده هورمون پاراتیروئید را نشان می‌دهد [۷]. همچنین تولید این نوع پروتئین‌ها در باکتری‌ها که به صورت میزبان عمل می‌کنند نیز صورت می‌گیرد. یک سوم از پروتئین‌های درمانی در باکتری *اشریشیا کلائی* تولید می‌شوند که این امر قابلیت بالای *اشریشیا کلائی* را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب را نشان می‌دهد.

برتری استفاده از این باکتری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب سرعت رشد بالا، وجود سوبه‌های متنوع قابل دسترس از این باکتری، وجود سامانه‌های بیان ژنی زیاد برای تولید پروتئین‌های بیرونی، توسعه روش‌های تخمیری برای این باکتری و پایداری ژنتیکی مناسب می‌باشد [۷]. *توماس*^۵ و همکاران هورمون انسانی پاراتیروئید (hPTH^۶) را با همراه ترشحی^۷ فاکتور X قابل برش در باکتری *اشریشیا کلائی* بیان کرده و تا ۵۰ mg/L خالص سازی



شکل ۱: جایگاه غده پاراتیروئید هورمون [7]

کردند [۹، ۸]. با توجه به پایداری گرمایی پاراتیروئید هورمون، گو^۸ و همکاران با ادغام دو روش شوک اسمزی و تیمار گرمایی، pET32a (+) را باکتری *اشریشیا کلائی* با خلوص ۷۲٪ استخراج کردند. آن‌ها همچنین نشان دادند که این روش اقتصادی و آسان تر برای پروتئین‌های ترشعی با پایداری گرمایی، در مقایسه با کروماتوگرافی تمایلی است [۱۰]. لیو^۹ و همکاران، hPTH را با پلاسمید pET32a (+) باکتری *اشریشیا کلائی* بیان کردند و با سه مرحله کروماتوگرافی تمایلی تثبیت شده، تعویض یونی و غربال مولکولی به ۳۰۰ mg/L هورمون پاراتیروئید با خلوص ۹۹٪ رسیدند. در پایان نیز فعالیت زیستی آن را با رده سلولی UMR-106 موش صحرایی تأیید کردند [۱۱]. خوراک دهی آهسته و همچنین خالص سازی بالای ۹۹٪ هورمون پاراتیروئید با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی و فاز معکوس^{۱۰} به صورت متعادل از ابتکارهای *اوما*^{۱۱} و همکاران بود [۱۲]. ون جو^{۱۲} و همکاران نیز ژن hPTH را با روش *بایسیسترونیک*^{۱۳} سنتز و به صورت محلول غیر ترشعی در باکتری *اشریشیا کلائی* در فرماتور ۱۵ لیتری بیان کردند و به زیست توده ۲۷ g/L دست یافتند [۱۳]. آن‌ها سپس با سه مرحله کروماتوگرافی خالص سازی را انجام داده و فعالیت زیستی آن را با افزایش چشمگیر در میزان cAMP^{۱۴} سلول‌های موش صحرایی تأیید کردند [۱۳]. با توجه به موفقیت آمیز بودن پژوهش‌های گذشته به نظر می‌رسد که تولید هورمون پاراتیروئید انسانی در باکتری *اشریشیا کلائی* و رسیدن به دانش فنی بومی آن

(۱) Humulin
(۲) Genetech
(۳) Tomus
(۴) Fusion partner
(۵) Liu
(۶) Uma
(۷) Bicistronic

(۸) Eli Lilly
(۹) Food and Drug Administration
(۱۰) Human parathyroid hormone
(۱۱) Guo
(۱۲) Reverse Phase Chromatography
(۱۳) Wenju
(۱۴) Cyclic adenosine monophosphate

کم مقدار در یک لیتر HCl یک مولار شامل $2/78 \text{ g FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $1/74 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، $1/89 \text{ g CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $1/8 \text{ g MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، $1/92 \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $1/71 \text{ g CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ بود. دلیل استفاده از عنصرهای کم مقدار به این خاطر است که عنصرهایی مانند Mn، Fe، Zn، Cu، Ca، Co، نیز برای رشد باکتری مورد نیاز است و بایستی حتماً در محیط کشت وجود داشته باشند. اگر این عنصرها در محیط کشت کم باشند باید با املاح موجود در آب تامین شوند و گرنه رشد میکروارگانیسمها مختل خواهد شد.

کشت سلولی

کشت ناپیوسته در مقیاس ارلن

برای تولید مایه تلقیح بهترین تک کلونی را از محیط کشت جامد برداشته و در محیط کشت ZYP-0.8G به حجم ۵۰ mL تلقیح و در 37°C و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶ ساعت گرما گذاری شد. سپس ۵۰ mL از مایه تلقیح در ۴۵۰ mL محیط کشت ZYP-5052 که درون ارلن یک لیتری قرار داشت تلقیح شد و در 37°C و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت گرماگذاری شد. برای بررسی رشد باکتری و آنالیز پروتئین‌های تولید شده در زمان‌های گوناگون کشت از این ارلن نمونه گیری شد.

کشت ناپیوسته در مقیاس فرماتور ۱۰ لیتری

کشت ناپیوسته همراه با خوراک‌دهی در فرماتور استوانه‌ای ۱۰ لیتری با حجم کاری ۸ لیتر شامل دو همزن توربینی با یک محور انجام شد. برای این منظور ابتدا فرماتور و اتصالات به همراه ۳ لیتر محیط کشت اولیه اتوکلاو شد. از مایه تلقیح مرحله ناپیوسته پیشین به مقدار ۵٪ حجمی به درون فرماتور که شامل محیط کشت ZPY-5052 می‌باشد، تلقیح می‌شد. دانسیته نوری محیط کشت به طور پیوسته بر حسب زمان اندازه گیری شد. در طول دوره خوراک‌دهی pH محیط تخمیر با استفاده از محلول ۲۰٪ w/v (وزنی بر حجمی) سود و محلول فسفریک اسید ۳ نرمال در ۷ تنظیم شد. غلظت اکسیژن محلول نیز با تغییر دور همزن و شدت هوادهی و همچنین در صورت نیاز غنی‌سازی اکسیژن هوای ورودی به صورت دستی در حدود ۴۳٪ اشباع حفظ شد. دما در طول فرایند در 37°C کنترل و تولید کف با افزودن ضد کف (روغن سیلیکون سترون) به صورت دستی مهار شد.

در کشور ما نیز امری ضروری باشد. لذا هدف از این پژوهش بررسی کلون و بیان هورمون پاراتیروئید انسانی نوترکیب درون باکتری E.coli و کشت دادن آن در به صورت ناپیوسته در مقیاس ارلن و کشت ناپیوسته همراه با خوراک‌دهی در فرماتور می‌باشد. استخراج پروتئین نوترکیب و خالص سازی آن نیز از اهداف نهایی این پژوهش می‌باشد.

بخش تجربی

تهیه سویه مناسب جهت بیان هورمون پاراتیروئید نوترکیب انسانی

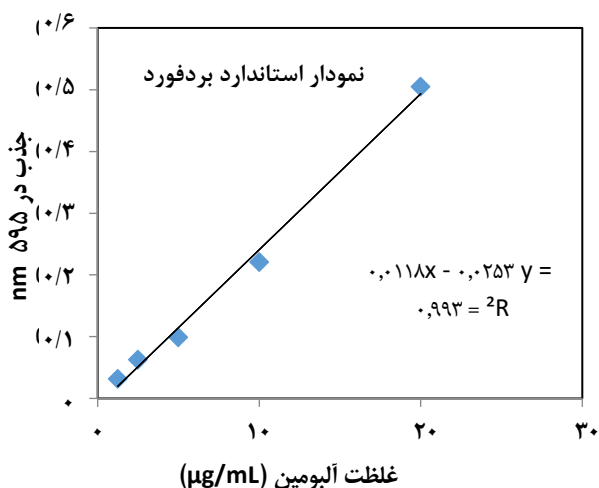
پلاسمید pUC57^۱ حاوی ژن Trx-His6-EK-PTH84، سنتز شده توسط شرکت GenScript (USA) پس از تکثیر در باکتری Escherichia coli DH5 α ، به وسیله کیت استخراج پلاسمید شد. ژن Trx-His6-EK-PTH84 پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های BstI و MscI محدود^۲، از پلاسمید pUC57 خارج و به کمک آنزیم مای با اثر محدود T4 DNA لیگاز در پلاسمید pET32a(+) قرار داده شد و برای بیان به باکتری BL21 Escherichia coli منتقل شد.

محیط کشت برای بیان هورمون پاراتیروئید نوترکیب انسانی

در این پژوهش کلیه مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت مرک تهیه شد. برای نگهداری میکروارگانیسم از محیط کشت LB جامد (تریپتون ۱۰ g/L، عصاره مخمر ۵ g/L، سدیم کلرید ۵ g/L، آگار ۱۵ g/L) استفاده شد. برای پیش کشت از محیط کشت ZYP-0.8G (تریپتون ۹/۳ g/L، عصاره مخمر ۴/۶۵ g/L، منیزیم سولفات ۰/۱۲ g/L، گلوکز ۰/۸ w/v، آمونیوم سولفات ۳/۳ g/L، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۶/۸ g/L، دی سدیم هیدروژن فسفات ۷/۱ g/L و آمپلی سیلین ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$) استفاده شد. برای بیان پروتئین در کشت ناپیوسته از محیط کشت ZYP-5052 (تریپتون ۹/۳ g/L، عصاره مخمر ۴/۶۵ g/L، منیزیم سولفات ۱ mM، آمونیوم سولفات ۳/۳ g/L، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۶/۸ g/L، دی سدیم هیدروژن فسفات ۷/۱ g/L، آمپلی سیلین ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ ، گلوکز ۰/۵ (w/v)٪، لاکتوز ۰/۲ w/v، گلیسرول ۰/۵ (w/v)٪) استفاده شد. محیط کشت ها به صورت جدا به مدت ۱۵ دقیقه در 121°C اتوکلاو شده و برای ادامه کار خنک شدند. برای خوراک‌دهی در زمان کار نیز از محلول اتوکلاو شده که شامل تریپتون ۳۵۰ g/L، منیزیم سولفات ۲۰ g/L، گلوکز ۶۰۰ g/L و عنصرهای کم مقدار ۵ ml/L استفاده شد. عناصرهای

(۱) Plasmid, University of California

(۲) Restriction Enzyme



شکل ۲: منحنی استاندارد برای اندازه گیری غلظت کل پروتئین به روش بردفورد

نمونه‌های مجهول و استاندارد به نسبت یک به یک با رنگ کوماسی ترکیب شدند. بلانک نیز از نسبت یک به یک، نرمال سالین با رنگ کوماسی تهیه شد. سپس جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر بلانک، نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های مجهول خوانده شد. در پایان غلظت پروتئین نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی کالیبراسیون و تراکم نوری آن‌ها تعیین شد.

نتیجه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. برای افزایش دقت اندازه‌گیری، صرفه جویی در مصرف آلبومین و سادگی در اندازه‌گیری نمونه‌های آلبومین و مجهول هزار برابر رقیق شد.

نتیجه‌ها و بحث

بررسی بیان پروتئین نوترکیب در کشت ناپیوسته درون ارلن

در این پژوهش ابتدا کشت به صورت ناپیوسته در ارلن بررسی شد. برای سنجش بیان در کشت ناپیوسته در ساعت‌های گوناگون نمونه‌برداری شد. نتیجه‌های این آزمایش نشان داد که در کشت ناپیوسته اگر از محیط کشت ZYP-5052 که دارای سه منبع کربنی w/v ۰/۰۵٪ گلوکز، w/v ۰/۵٪ گلیسرول، w/v ۰/۲٪ لاکتوز می‌باشد استفاده شود پس از ۱۶ ساعت مقدار زیست توده به ۶/۵ g/L می‌رسد. منحنی رشد باکتری *Escherichia coli* BL21 در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از گسستن دیواره سلولی مقدار پروتئین نیز اندازه‌گیری شد که در ساعت ۱۶ برابر ۱/۷ g/L به دست آمد. نتیجه آزمایش الکتروفورز نیز در شکل ۴ آورده شده است. همان گونه که در این شکل نشان داده شده است بیش‌ترین بیان

گسستن دیواره سلولی

جداسازی پروتئین نوترکیب با اولترا فیلتراسیون

نخست محیط کشت حاوی باکتری نوترکیب با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در ۴°C سانتریفوژ شد و سپس زیست توده به دست آمده در ایمیدازول حل شده و برای عمل تخریب دیواره سلولی از روش اولترا سونیک با توان ۶۹۰ وات استفاده شد. این عملیات با شدت ۷۰٪ آمپلی تود به مدت ۱۵ دقیقه به صورت ناپیوسته با توقف‌های ۱۵ ثانیه‌ای انجام شد تا از گرم شدن و تخریب پروتئین‌ها خودداری شود. در حین عمل همگن‌سازی، نمونه‌ها درون یخ قرار داده شدند تا فعالیت آن‌ها حفظ شود. از آنجایی که این فرآورده درون سلولی نیست و به صورت محلول است، به علت اختلاف دانسیته با ذرات باقی‌مانده، محلول رویی با سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴°C برای ادامه مرحله‌های جدا شد. با توجه به وزن مولکولی ۲۶ kDa پروتئین و تگ‌های همراه، در این پژوهش از اولترا فیلتراسیون با غشاهای سلولزی با برش - حذفی ۵ و ۳۰ کیلو دالتون برای جداسازی و تغلیظ محلول دارای مجموعه‌ای از پروتئین‌ها استفاده شد. برای جداسازی پروتئین مورد نظر از غشای ۳۰ KD استفاده شد و از غشاء ۵ KD برای تغلیظ و حذف پروتئین‌های کوچک‌تر از ۵ KD استفاده شد.

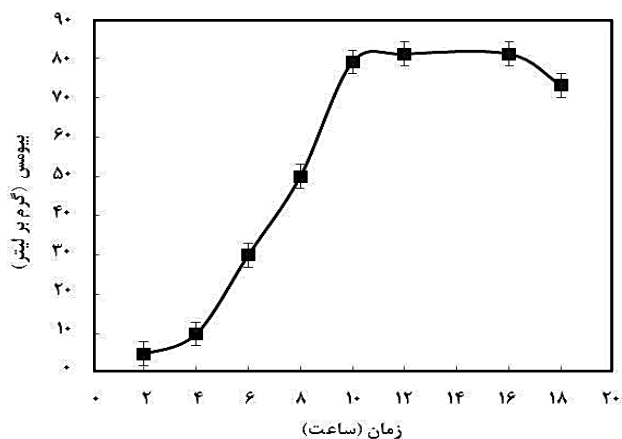
سنجش نتیجه‌های مرحله‌های گوناگون خالص سازی

برای تعیین میزان بیان هورمون پاراتیروئید انسانی در سلول‌های نوترکیب و برای تعیین خلوص در مرحله‌های گوناگون خالص‌سازی، از روش الکتروفورز با ژل اکریل آمید ۱۳٪ در حضور سدیم دودسیل سولفات SDS-PAGE استفاده شد.

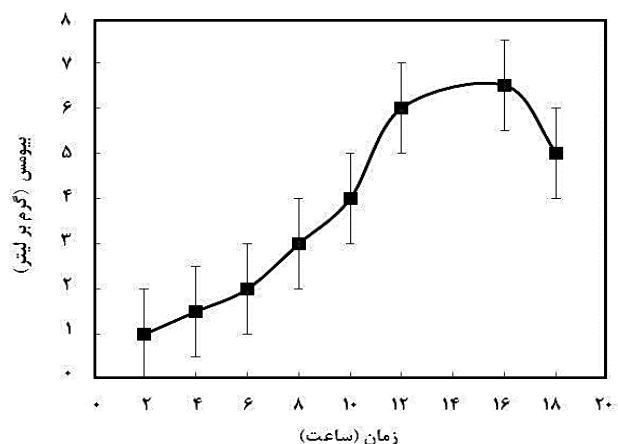
اندازه گیری غلظت کل پروتئین به روش برد فورد^۱

برد فورد روشی سریع و حساس برای اندازه گیری پروتئین می‌باشد [۱۴]. در این روش برای رسم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. پس از آماده سازی نمونه و خواندن جذب نمونه‌ها، منحنی استاندارد ترسیم شد. از این نمودار برای اندازه‌گیری غلظت کل پروتئین نمونه‌های پروتئینی استفاده شد. برای این منظور ابتدا از سرم آلبومین با غلظت اولیه ۲ mg/mL نمونه‌های استاندارد ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر را با رقیق سازی به وسیله نرمال سالین ۰/۹٪ تهیه و سپس نمونه‌های مجهول ۱۰۰۰ برابر با نرمال سالین ۰/۹٪ رقیق شدند.

(۱) Bradford



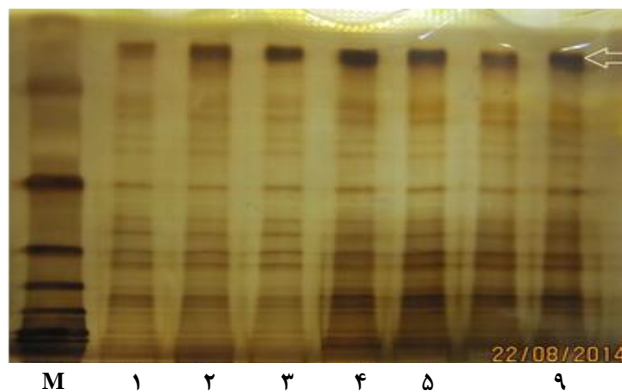
شکل ۵: منحنی رشد باکتری *Escherichia coli* BL21 بر حسب زمان در بیوراکتور



شکل ۳: منحنی رشد باکتری *Escherichia coli* BL21 بر حسب زمان در مقیاس ارلن

خوراک دهی ثانویه برای مصرف سوخت و ساز باکتری *Escherichia coli* BL21 استفاده می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است در ساعت ۱۲ ام از آغاز کشت بیشینه تولید زیست توده به دست آمد که پس از آن باکتری وارد فاز مرگ شد. وزن تر سلولی به 81 g/L رسید. برای سنجش بیان در ساعت‌های گوناگون پس از خورک‌دهی نمونه برداشته شد. پس از جداسازی زیستی توده زیستی با سانتریفیوژ و شکستن دیواره سلولی مقدار پروتئین در ساعت ۱۲ ام به 22 g/L رسید.

سرانجام برای تأیید پروتئین تولید شده از روش وسترن بلائینگ^۱ استفاده شد. اطمینان بخش‌ترین روش برای درستی تولید پروتئین روش وسترن بلائینگ است زیرا در این آزمایش پیوندی که سبب رنگ آمیزی می‌شود به‌طور کامل اختصاصی بوده و در نتیجه تنها پروتئین هدف رنگ آمیزی می‌شود. در این روش آنتی پاراتیروئید هورمون در یک واکنش ایمونولوژیک اختصاصی به پاراتیروئید هورمون انسانی متصل شده و پس از آن آنتی بادی ثانویه نیز در واکنشی ایمونولوژیک به آنتی بادی اولیه متصل می‌شود. سپس با اتصال عامل رنگ آمیزی DAB به آنتی بادی ثانویه باند پاراتیروئید هورمون انسانی همان‌گونه که در شکل ۶ دیده می‌شود ظاهر شود. وجود باند پروتئینی در ناحیه 37 کیلو دالتون نشان دهنده درستی بیان هورمون پاراتیروئید می‌باشد. در اغلب آزمون‌ها به دلیل تشکیل دی مر، تری مر، و ... وزن باند دیده شده درست نیست، و از این روش تنها برای اثبات وجود و نبود آن استفاده می‌شود. به هر حال با توجه به نتیجه‌های این پژوهش



شکل ۴: نتیجه آزمایش ژل SDS-PAGE ۱۳٪ برای نمونه‌های به دست آمده از بیان پروتئین در ساعت‌های گوناگون کشت ناپیوسته در محیط کشت ZYP-5052 با القای خودکار، M: شاخص وزن مولکولی، ۱ نمونه ساعت ۱، ۱۱، ۲ نمونه ساعت ۱۲، ۳ نمونه ساعت ۱۳، ۴ نمونه ساعت ۱۴، ۵ نمونه ساعت ۱۵، ۶ نمونه ساعت ۱۶.

پروتئین در ۱۶ ساعت پس از کشت به دست آمده است که در ناحیه 35 کیلو دالتون است. با توجه به رشد خوب باکتری در این پژوهش و سایر پژوهش‌ها [۱۵] و همچنین نتیجه‌های آزمایش الکتروفورز می‌توان گفت تولید پروتئین نو ترکیب با بیان در باکتری *Escherichia coli* BL21 با موفقیت انجام پذیرفته است.

کشت ناپیوسته به همراه خوراک دهی درون فرماتور ۱۰ لیتری

برای رسیدن به دانسیته سلولی بالا، کشت ناپیوسته باکتری *Escherichia coli* BL21 همراه با خوراک دهی انجام شد. در واقع

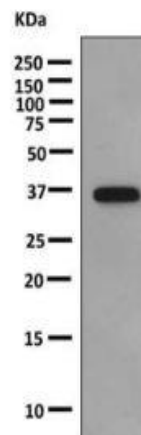
(۱) Western Blot

بازسازی ساختار استخوان است. بیماری پوکی استخوان توسط سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۱ میلادی به عنوان چهارمین عامل تهدیدکننده زندگی بشر پس از سرطان، سکته قلبی و مغزی در نظر گرفته شده است.

نتیجه گیری

هورمون انسانی پاراتیروئید با افزایش جذب روده‌ای کلسیم، کاهش دفع کلیوی و افزایش فعالیت استئوکلاستها موجب افزایش سطح کلسیم خون می‌شود. در صورت ناکافی بودن کلسیم در خون، این عنصر به طور معمول از استخوان‌ها برداشته می‌شود تا میزان آن در خون ثابت بماند که این موضوع نیز باعث پوکی استخوان خواهد شد. بنابراین این هورمون در درمان پوکی استخوان و بیماری‌های ناشی از اختلال‌های غدد پاراتیروئید کاربرد فراوانی دارد. در این پژوهش از پلاسمید Puc 57 و سویه E.coli DH5 α برای کلون کردن و از پلاسمید Pet 32a(+) و سویه E.coli BL21 برای بیان پروتئین استفاده شد. نتیجه‌های کشت ناپیوسته و ناپیوسته به همراه خوراک دهی E.coli BL21 در دو مقیاس ارلن و فرمانتور نشان داد که هورمون پاراتیروئید انسانی به صورت موفقیت آمیزی تولید می‌شود. نتیجه‌های آزمایش‌های وسترن بلات و الکتروفورز نیز تأیید کننده تولید این پروتئین نوترکیب بود. با توجه به عملکرد خوب میزبانی باکتری اشریشیاکلی جهت تولید پروتئین نوترکیب، این روش می‌تواند جایگزین مناسبی جهت تولید این پروتئین ارزشمند دارویی نسبت به سایر روش‌های تولید پروتئین باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۸



شکل ۶: آزمایش وسترن بلات پاراتیروئید هورمون انسانی

می‌توان گفت که پاراتیروئید هورمون انسانی نوترکیب در محیط کشت ZYP-5052 در دو حالت ناپیوسته و ناپیوسته همراه با خوراک دهی، با موفقیت تولید می‌شود.

به هر حال با توجه به اهمیت این پژوهش می‌توان از این دانش به دست آمده در تولید داروهای مهمی در جهت رفع پوکی استخوان استفاده نمود. پوکی استخوان بیماری خاموشی است که با کاهش دانسیته مواد معدنی ساختار استخوان همراه است و سبب ضعیف شدن ساختار استخوان و در پی آن افزایش احتمال شکستگی است. قابلیت یگانه پاراتیروئید هورمون در درمان پوکی استخوان افزایش دانسیته استخوان به صورت آنابولیک است. در واقع پاراتیروئید هورمون پلی پپتیدی ۸۴ اسیدآمینوای است که در مقابل کاهش سطح کلسیم خون از غدد پاراتیروئید ترشح می‌شود. اصلی‌ترین فعالیت پاراتیروئید هورمون انسانی تنظیم غلظت کلسیم و فسفات خون با تأثیر مستقیم روی استخوان کلیه، همچنین

مراجع

- [1] Schmidt S.R., "Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals", John Wiley & Sons Inc. (2013).
- [2] Huang C.J., Lin H., Yang X., Industrial Production of Recombinant Therapeutics in Escherichia Coli and its Recent Advancement, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **3**: 383-399 (2012).
- [3] Bieglmayer C., Prager G., Niederle B., Kinetic Analyses of Parathyroid Hormone Clearance as Measured by Three Rapid Immunoassays During Parathyroidectomy, *Clinical Chemistry*, **48**: 1731-1738 (2002).
- [4] Francis S., "Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology", McGraw Hill (2011).

- [5] Al-Badran A.E., Abdul-Jabbar R.A., Extraction and Purification of Recombinant Intact Human Parathyroid Hormone (hPTH) from Bacterial Cell, *Journal of Biomedical Engineering and Informatics*, **3(2)**: 1-10 (2017).
- [6] Hamedifar H., Salamat F., Saffarion M., Ghiasi M., Hosseini A., Lahiji H., Mahboudi F. A Novel Approach for High-Level Expression of Soluble Recombinant Human Parathyroid Hormone(rhPTH 1-34) in *Escherichia coli*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* , **5(3)**: 193-201 (2013).
- [7] Lövblad K. O., Essig M., Head and Neck Imaging. *European Radiology Supplements*, **2(1)**: 18-35 (2008).
- [8] Vasicek, T.J., McDevitt B.E., Freeman M.W., Fennick B.J., Hendy G.N., Potts J. T.J., Kronenberg H.M., Nucleotide Sequence of the Human Parathyroid Hormone Gene, *Proc Natl Acad Sci*, **80**: 2127-2131(1983).
- [9] Gardella T.J., Rubin D., Abou- Samra A.B., Keutmann H.T ., Potts J .T., Kronenberg H.M., Nussbaum S. R., Expression of Human Parathyroid Hormone-(1-84) in *Escherchia Coli* as a Factor X-Cleavable Fusion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, **265**:15854-15859 (1990).
- [10] Guo Q. R., Wei D.-Z., Tong W. Y., Partial Purification oh Human Parathyroid Hormone 1-84 as a Thioredoxin Fusion form in Recombinant *Escherichia Coli* by Thermoosmotic Shock. *Protein Expression and Purification*, **49 (1)**: 32-8 (2006).
- [11] Liu Q., Lin J., Liu M., Tao X., Wei D., Ma X., Yang S., *Large Scale Preparation of Recombinant Human Parathyroid Hormone 1-84 from Escherichia Coli*, *Protein Expression and Purification*, **54(2)**: 212-219 (2007).
- [12] Uma S., Orthogonal Process for Purification of Recombinant Human Parathyroid Hormone(rhPTH), *US Patent 8298789B2*. (2012).
- [13] Wang W., Tang W., Yan M., He K., Yang L., Jiang L., Li H. A Bicistronic Expression Strategy for Large Scale Expression and Purification of Full-Length Recombinant Human Parathyroid Hormone for Osteoporosis Therapy, *Protein Expression and Purification*, **69(2)**: 178-85(2010).
- [14] Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram of 1976 Bradford M.M Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254 (1976).
- [۱۵] خوانچه زر س.، هاشمی نجف آبادی س.، محمدیان ج.، خلیل زاده ر.، اسفندیار س.، بهینه سازی شرایط کشت باکتری اشرشیا کولی برای اصلاح تولید قطعه نوترکیب باکتیریورودوپسین، نشریه شیمی و مهندسی شیمی/ایران، ۳۲(۲)، ۹۳ تا ۱۰۱ (۱۳۹۲).