

کلونینگ و بیان پروتئین پاراتیروئید به صورت محلول در باکتری اشریشیاکلی

محمدحسین آقاجانی^۱، دکتر عباس تهذیبی^۲، دکتر مجید شهبازی^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده فن آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. ۲- استادیار، سازمان غذا و دارو، تهران، ایران.

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین پاراتیروئید در هموستازی کلسیم بدن نقش اساسی دارد. با افزایش سن و سایر عوامل، این هورمون قادر به انجام نقش خود در بدن نیست؛ به طوری که فرد دچار پوکی استخوان می‌شود. استفاده از پروتئین نوترکیب پاراتیروئید، مانع پیشرفت بیماری شده و به بهبودی آن کمک می‌کند. این مطالعه به منظور طراحی و ساخت سازه ژنی و انجام فرایند کلونینگ و ساب‌کلونینگ پروتئین پاراتیروئید به صورت محلول در باکتری اشریشیاکلی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه توصیفی با طراحی و اپتیمایز کردن سکوانس ژن هورمون پاراتیروئید (Parathyroid hormone: PTH) برای بیان پروتئین نوترکیب به صورت محلول انجام شد. بعد از ترانسفورم کردن سازه ژنی داخل باکتری و کشت باکتری اشریشیاکلی، استخراج پلاسمید انجام شد. قطعه کلکننده پروتئین موردنظر به روش هضم آنزیمی جدا و در ادامه به وکتور بیانی منتقل گردید. سپس عمل القا صورت گرفت و پروتئین مورد نظر در باکتری بیان شد.

یافته‌ها: بعد از برش آنزیمی، قطعه کلکننده پروتئین پاراتیروئید به درستی در محل موردنظر قرار گرفت. فرایند مذکور به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تایید گردید. بعد انجام عمل ترانسفورم، فرایند القا صورت گرفت که در نهایت پروتئین پاراتیروئید به صورت محلول در باکتری بیان شد.

نتیجه‌گیری: بیان پروتئین در باکتری به دلیل رشد سریع آن و نیاز به محیط کشت ارزان مقرون به صرفه است. بیان پروتئین به صورت محلول باعث کوتاه شدن فرایند پایین دستی تولید پروتئین نوترکیب گردید.

کلیدواژه‌ها: پروتئین نوترکیب پاراتیروئید، وکتور بیانی، هضم آنزیمی، PCR

* نویسنده مسؤول: دکتر مجید شهبازی، پست الکترونیکی shahbazimajid@yahoo.co.uk

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تلفن و نمابر ۰۱۷-۲۲۳۵۱۷۳۵

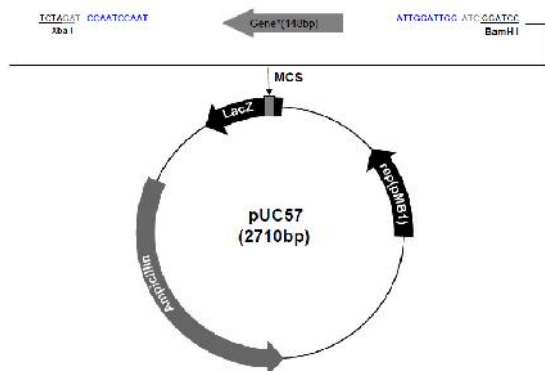
وصول مقاله: ۹۳/۱۰/۱۶، پذیرش مقاله: ۹۴/۱/۲۴

مقدمه

انتهای N-ترمینال، تقریباً تمام عملکرد هورمون دست نخورده را از خود نشان می‌دهد و این قطعه از هورمون می‌تواند هموستاز کلسیم و فسفات را تنظیم نموده و همچنین می‌تواند فرایند بازجذب در استخوان را کنترل نماید (۴). عمل فیزیولوژیکی این هورمون در استخوان تعدیل فرایند بازجذب از استخوان از طریق تحریک ادنیلات سیکلاز و پروتئین کیناز C است (۵). لذا پروتئین نوترکیب پاراتیروئید انسانی دارای کاربرد پزشکی و دارویی برای درمان پوکی استخوان است (۶). اهمیت بیولوژیکی هورمون پاراتیروئید انسانی و استفاده دارویی بالقوه از هورمون در درمان و رفع پوکی استخوان و اختلالات سوخت و ساز بدن، آن را به عنوان یک هدف مناسب برای تولید توسط کمپانی‌های داروسازی مطرح می‌سازد (۷). تزریق زیرجلدی روزانه هورمون پاراتیروئید نوترکیب انسانی (rhPTH)، باعث تشکیل استخوان و افزایش توده استخوان در

سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۱ بیماری پوکی استخوان را به عنوان چهارمین عامل تهدیدکننده زندگی انسان، پس از سرطان، سکته قلبی و سکته مغزی اعلام کرد (۱). پوکی استخوان یک بیماری بدون علامت همراه با کاهش تراکم بافت استخوانی است که با افزایش خطر شکستگی همراه بوده و به عنوان یک بیماری وابسته به سن در نظر گرفته می‌شود. این بیماری نه تنها یکی از دلایل اصلی شکستگی استخوان است؛ بلکه در میان بیماری‌های ایجاد کننده معلولیت رتبه بالایی دارد (۲). پروتئین پاراتیروئید از ۱۱۵ اسیدآمینه تشکیل شده و ۲۵ اسیدآمینه آن به عنوان سیگنال پپتید در شبکه اندوپلاسمی حذف می‌شود و ۶ اسیدآمینه دیگر آن نیز در دستگاه گلژی از این پروتئین جدا شده و در نهایت با ۸۴ اسیدآمینه از سلول‌های پاراتیروئید ترشح می‌شود (۲ و ۳). ۳۴ اسیدآمینه اول در

از بررسی سکانس توسط سایت Web cutter 2.0 و تعیین آنزیم‌های برشی، آنزیم‌های MCS1 و BamHI از شرکت New England Biolabs (R3136s # R0534s) خریداری شد. پرایمر T7 پرموتور با توالی 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3 و 5'-CAGCGGGCTAGTTAT TGCT-3 از شرکت MWG آلمان خریداری گردید. نقشه سکانس مذکور در شکل یک نشان داده شده است.



شکل ۱: وکتور کلونینگ دارای قطعه کد کننده هورمون پاراتیروئید که توسط شرکت gene script در ناحیه lac z قرار گرفت.

در ابتدا پلاسمید لیوفلیزه به صورت محلول درآمد. برای این کار ابتدا آن را به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور 6000 x g سانتریفیوژ کردیم تا همه پودر در انتهای ویال قرار گیرد. زیر هود استریل در ویال را باز کرده و ۲۰ میکرولیتر آب نوکلئاز فری (طبق دستور شرکت سازنده) به آن اضافه شد تا DNA حل شود. سپس آن را به مدت یک دقیقه ورتکس کردیم. در صورت ضرورت محلول به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد تا DNA حل شود. با توجه به میزان خلوص پلاسمید، برای هر ترانسفورماسیون به میزان ۱۰-۱۰۰ نانوگرم پلاسمید به ازای هر میکرولیتر، پلاسمید Puc57 موردنیاز بود. بدین منظور یک میکرولیتر از استوک اصلی در یک میلی‌لیتر آب نوکلئاز فری حل گردید تا نسبت موردنظر حاصل شد. بعد از حل کردن پلاسمید و تهیه استوک اصلی، برای سهولت کار و حفظ آن یک میلی‌لیتر از استوک در ۵ میکروتیوب نوکلئاز فری تقسیم شد و آن در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد استوک کردیم.

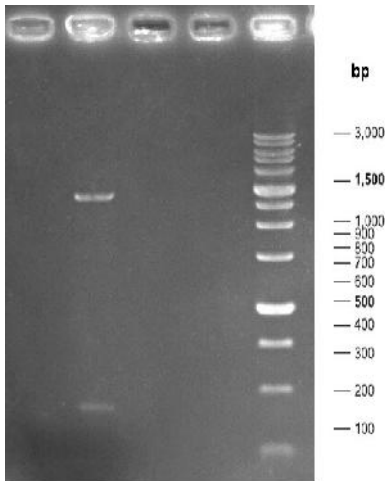
مستعد کردن باکتری: پس از کشت باکتری DH5 آلفا روی پلیت، یک کلنی از باکتری را در ۱۰ میلی‌لیتر محیط لوریال بریتانی (LB) کشت و به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم. محیط کشت فوق به یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر LB منتقل گردید و در انکوباتور شیکردار (۱۸۰rpm) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به

میمون‌های دارای پوکی استخوان شده است (۹۰۸). امروزه برای درمان پوکی استخوان از یک یا چند داروی ضد پوکی استخوان استفاده می‌شود. داروهای ضدپوکی استخوان سرعت از دست رفتن استخوان را کاهش داده و یا باعث ساخته شدن استخوان می‌گردند و بدین ترتیب با افزایش تراکم استخوان، خطر شکستگی استخوان کاهش می‌یابد. داروهای ضدپوکی استخوان دو نوع هستند. یک دسته از داروها مانند بیس فسفونات‌ها، کلسی‌تونین، استروژن، تنظیم‌کننده‌های گیرنده‌های استروژن و دنوسوماب روند تحلیل استخوان را کند و یا متوقف می‌کنند. دسته دیگر، داروهایی هستند که روند ساخته شدن استخوان را افزایش می‌دهند. از این دسته در حال حاضر نوعی از هورمون پاراتیروئید به نام تری پاراتید (هورمون پاراتیروئید نوترکیب انسانی) تولید و توسط سازمان غذا و داروی آمریکا مورد تایید قرار گرفته است (۱۱۰ و ۱۱۱). برای تولید هورمون از طریق فن آوری DNA نوترکیب تلاش‌های بسیار زیادی شده است که سیستم‌های بیانی مورد استفاده از جمله باکتری اشریشیا کلی، مخمر و سلول پستانداران نمونه‌هایی از آن است. باکتری اشریشیا کلی به‌طور گسترده‌ای برای سنتز پلی‌پپتید هترولوگ مورد استفاده قرار گرفته است که به دلیل شناخته شدن خصوصیات کامل آن، رشد سریع، بازده بالا و مقرون به‌صرفه بودن آن است. به‌طور معمول، بیان پروتئین‌های کوچک و یا پپتید به مقدار کافی به‌صورت مستقیم مشکل است. چون مولکول mRNA مربوط به آن و نیز پپتید حاصله مستعد تجزیه توسط آنزیم‌های درون باکتری است. یک روش موفق برای غلبه بر این مشکل این است که برای تولید athPTH آن را به همراه یک پروتئین دیگر به‌صورت فیوژن بیان کنیم. تگ‌های (Tag) متعددی برای استفاده وجود دارد. از جمله آن استفاده از تگ تیوردوکسین است (۱۲ و ۱۳). در این مطالعه به منظور تولید پروتئین نوترکیب انسانی از تیوردوکسین به عنوان تگ در سیستم بیانی pET و با استفاده از pET32a+ پروتئین مذکور را به صورت محلول‌تر بیان کردیم که باعث می‌شود انکلوژن بادی تولید شده در غلظت اوره پایین‌تر حل شود.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی با طراحی و اپتیمایز کردن سکوانس ژن هورمون پاراتیروئید (Parathyroid hormone: PTH) برای بیان پروتئین نوترکیب به صورت محلول انجام شد.

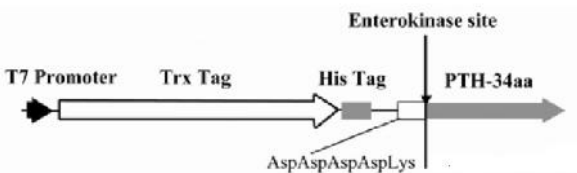
ابتدا سکانس توالی موردنظر (AC: NM_000315.2) از سایت Gene Bank انتخاب شد. برای بیان مناسب در باکتری اشریشیا کلی، تغییرات لازم در سطح سکانس داده شد. سپس توالی مذکور به همراه وکتور PUC 57 به صورت لیوفلیزه از Gene Script سفارش داده شد. وکتور بیانی pET32-a، باکتری بیانی BL21 و باکتری DH5 برای کلونینگ از مؤسسه انستیتو پاستور ایران سفارش داده شد. پس



شکل ۲: برش وکتور *puc57* توسط *BamHI* و *MscI* از میانگینهای برشی

ساخت سازه ژنی: ابتدا وکتور PET-32a توسط آنزیمهای مذکور برش داده شد و به سکانس حاصل از استخراج ژل توسط کیت DNA Ligase T4 (Cat:M0202T) از شرکت NEB، اتصال یافت. نحوه محاسبه میزان ژن مورد نظر و وکتور برای اتصال به یکدیگر به صورت زیر محاسبه شد.

required mass insert (g) = desired insert/vector molar ratio x mass of vector (g) x ratio of insert to vector lengths



ساب کلونینگ: بعد از ساخت سازه ژنی، داخل باکتری BL21 ترانسفورم شد. سپس باکتری ترانسفورم شده را روی پلیت حاوی آمپی سیلین به صورت شبانه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت دادیم.

PCR: یکی از روشهای تایید فرایند اتصال (Ligation)، روش PCR است. در این پروژه از روش کلونی PCR استفاده گردید. برای این کار از یک پلیت چندین کلونی به صورت تک انتخاب شد و در میکروتیوبهای مختلف قرار داده شد. سپس در شرایط استریل ۵۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی به میکروتیوبها اضافه شد و در ادامه عمل ورتکس انجام گردید. میکروتیوبها درون ترموبلاک با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از آن عمل رسوب گیری با ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد که ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی هر میکروتیوب برای PCR برداشته شد. مواد و برنامه داده شده برای انجام PCR

مدت ۴ ساعت قرار داده شد تا OD آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴-۰/۶ رسید. سپس عمل رسوب گیری با ۸۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد. رسوب در کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی مولار استریل سرد به صورت سوسپانسیون درآورده شد. مراحل رسوب گیری و حل کردن رسوب در کلرید کلسیم دو بار تکرار شد و در نهایت سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ انکوبه شد.

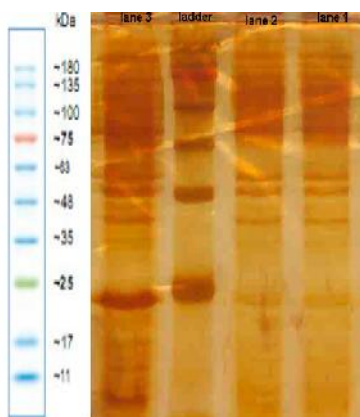
ترانسفورماسیون: برای ترانسفورم کردن ۴۰۰ میکرولیتر از باکتری DH5 آلفا مستعد و ۳ میکرولیتر از وکتور مورد نظر را به آرامی ترکیب نمودیم و به مدت ۳۰ دقیقه آن را روی یخ انکوبه کردیم. سپس مخلوط فوق به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد شوک حرارتی داده شد و بلافاصله به مدت ۲-۳ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. به این ترتیب پلاسمید نو ترکیب وارد باکتری گردید. ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از محصول فوق (سلولهای ترانسفورم شده) به پلیت های حاوی آنتی بیوتیک حاوی آمپی سیلین با غلظت ۵۰ میلی گرم در هر میلی لیتر انتقال داده شد. پلیت ها به طور شبانه (۱۸-۱۶ ساعت) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کلنی های حاوی پلاسمید نو ترکیب ظاهر شود. البته چون ژن مورد نظر توسط شرکت سازنده در قسمت Lac Z قرار داده شده بود؛ لذا طبق انتظار هر باکتری که وکتور را دریافت کرد؛ به صورت کلنی سفید نمایان شد و باکتری فاقد وکتور، به دلیل وجود آنتی بیوتیک رشد نمود.

استخراج پلاسمید: مقدار ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین درون یک لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتری ریخته شد. سپس از پلیت حاوی کشت باکتری های ترانسفورم شده تک کلنی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. از کشت شبانه (۱۸-۱۶ ساعت) باکتری های ترانسفورم شده عمل رسوب گیری با ۵۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. سپس استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی به صورت دستی انجام گردید.

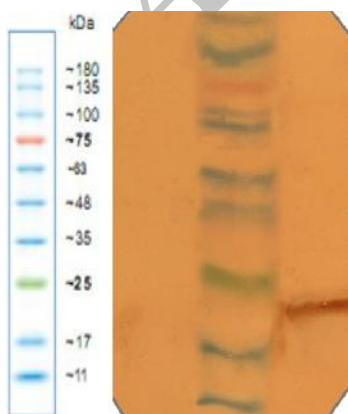
هضم آنزیمی: برش وکتور PUC 57 حاوی ژن مورد نظر توسط آنزیمهای *BmH1* و *McsI* با پروتکل ارائه شده توسط شرکت NEB انجام شد. به همین منظور برش آنزیمی به صورت double digestion با استفاده همزمان از دو آنزیم انجام شد و محصول (ladder cat no : pr911653) بر روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد run گردید (شکل ۲). پس از مشاهده باند مربوطه، سکانس مورد نظر با کیت استخراج شرکت کیاژن (cat no: 28604) از ژل استخراج شد.

انتقال یافت. پس از ۵ ساعت با رسیدن OD به ۰/۸ عمل القا با IPTG یک میلی مولار (غلظت نهایی) انجام گردید.

SDS-PAGE: بعد از نمونه گیری ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه و ۱۰۰ میکرولیتر از Sample Buffer به همراه ۵ میکرولیتر ۲ME درون یک میکروتیوب ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار گرفت. سپس عمل رسوب گیری به مدت ۱۵ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ rpm انجام شد. با توجه به این که وزن پروتئین مورد نظر ما حدود ۲۳ کیلو دالتون بود؛ لذا از ژل ۵ درصد در قسمت متراکم کننده و ۱۳ درصد در قسمت جداکننده استفاده شد. برای هر نمونه ۳۰ میکرولیتر run کردیم. پس از انجام فرایند ژل مربوطه را با نیترات نقره رنگ آمیزی کردیم که نتایج مربوط به آن در شکل ۴ آمده است. چاهک شماره یک مربوط به نمونه باکتری بدون وکتور و چاهک شماره ۲ باکتری دارای وکتور بود؛ ولی عمل القا صورت نگرفت و چاهک شماره ۳ باکتری دارای وکتور است که انجام عمل القا، پروتئین مورد نظر ما را بیان نمود.



شکل ۴: رنگ آمیزی نیترات نقره را نشان می دهد. چاهک های اول دوم: کنترل منفی بیان پروتئین، چاهک سوم: بیان پروتئین نو ترکیب است که باند آن در ناحیه ۲۴ کیلودالتون قابل مشاهده است.



شکل ۵: تصویر مربوط به وسترن بلات وجود باند در ناحیه ۲۴ کیلودالتون و تایید بیان هورمون پاراتیروئید

در زیر آمده است.

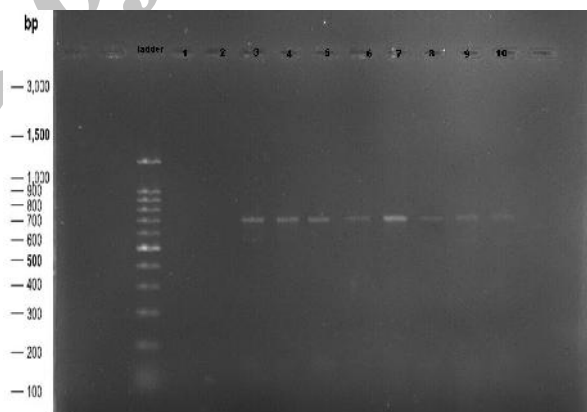
2.5 µl	10X PCR buffer
0.5 µl	dNTP (10 mM)
0.75 µl	Mgcl2 (50 Mm)
0.5 µl	Taq DNA polymerase
0.5 µl	Primer forward
0.5 µl	Primer reverse
5 µl	Template DNA(30ng/µl)
15µl	ddH2o

برنامه داده شده به دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن در زیر آمده است.

۹۴ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	Initial Denaturation
۹۴ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	Denaturation
۶۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	Annealing
۷۲ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	Extension
۷۲ درجه سانتی گراد	۸ دقیقه	Final Extension

یافته ها

تصویر حاصل از PCR که در شکل ۳ آمده است. در این تصویر چاهک شماره یک و دو به عنوان کنترل منفی PCR و باکتری بدون وکتور هستند که طبق انتظار ما فاقد باند در ناحیه مورد نظر هستند. مابقی آن باند مربوط به قطعه متصل شده به وکتور است که طول آن در مجموع به ۷۰۰ bp رسید.



شکل ۳: تصویر PCR که نشان دهنده اتصال صحیح قطعه کد کننده است.

چاهک شماره یک به عنوان کنترل منفی PCR، چاهک شماره دو مربوط به باکتری بدون وکتور، سایر چاهک ها مربوط به باکتری هایی است که دارای وکتور نو ترکیب هستند که بر طبق انتظار ما باند در ناحیه ۷۰۰ bp نشان دهنده اتصال صحیح قطعه مورد نظر است.

بیان پروتئین: پس از تایید حضور سکانس مورد نظر در درون وکتور، از پلیت حاوی باکتری ترانسفورم تک کلونی انتخاب شد و به ۵ میلی لیتر محیط LB حاوی آمپی سیلین انتقال یافت. کشت شبانه در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱۸۰ rpm انجام شد. سپس محیط مذکور به ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط SOC (Super Optimal broth with Catabolic represso)

اشاره می‌گردد. کاهش دمای محیط کشت باکتری یکی از این روش‌ها است (۲۱ و ۲۲). روش دیگر استفاده از میزبان‌های مخصوص مانند C41 (DE3) و C43 (DE3) است که به‌طور اختصاصی از آنها برای تولید پروتئین نوترکیب به‌صورت محلول استفاده می‌شود (۱۸). با تغییر در ترکیب محیط کشت می‌توان پروتئین نوترکیب را به‌صورت محلول تولید کرد (۲۳ و ۲۴). استفاده از چاپرون‌های مولکولی یکی دیگر از روش‌هایی است که می‌توان از آنها برای تولید پروتئین نوترکیب به شکل محلول استفاده کرد (۲۵ و ۲۶). یکی از بهترین روش‌ها برای رسیدن به هدف مذکور، تولید پروتئین نوترکیب به‌صورت فیوژن به همراه تگ است. سه تا از تگ‌هایی که در این روش استفاده می‌شود شامل NusA، MBP و trx است. تگ‌های مذکور علاوه بر محلول کردن پروتئین، باعث پایداری پروتئین در فضای سیتوپلاسمیک باکتری می‌شوند (۲۷ و ۲۸). ما در این پروژه از تگ trx استفاده کردیم. تگ مذکور به‌صورت فیوژن روی وکتور PET-32a قرار دارد. علاوه بر این دمای محیط کشت را در شیکر انکوباتور پس از القا روی ۲۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم کردیم و در پایان نیز پروتئین پاراتیروئید به‌صورت محلول بیان شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بیان پروتئین در باکتری به دلیل رشد سریع آن و نیاز به محیط کشت ارزان مقرون به‌صرفه است. بیان پروتئین به‌صورت محلول باعث کوتاه شدن فرایند پالین دستی تولید پروتئین نوترکیب می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه آقای محمدحسین آقاجانی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی از دانشکده فن‌آوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود. بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر تامین هزینه این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

- DiMatteo MR. Variations in patients' adherence to medical recommendations: a quantitative review of 50 years of research. *Med Care*. 2004 Mar; 42(3):200-9.
- Jin L, Briggs SL, Chandrasekhar S, Chirgadze NY, Clawson DK, Schevitz RW, et al. Crystal structure of human parathyroid hormone 1-34 at 0.9-A resolution. *J Biol Chem*. 2000 Sep; 275(35):27238-44.
- Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringhurst FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev*. 2005 Feb;26(1):78-113.
- Schlüter KD, Weber M, Piper HM. Parathyroid hormone induces protein kinase C but not adenylate cyclase in adult cardiomyocytes and regulates cyclic AMP levels via protein kinase C-dependent phosphodiesterase activity. *Biochem J*. 1995 Sep; 310 (Pt 2):439-44.

وسترن بلات: در این روش باندهای پروتئینی الکتروفورز شده روی ژل آکریل، به یک غشاء با قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین (مانند نیتروسولوز) منتقل شدند. در این روش ملکول‌های پروتئین از ژل خارج شدند و در سطح غشاء در همان موقعیت قرار گرفتند. برای تشخیص پروتئین‌های منتقل شده به غشاء، از آنتی‌بادی اختصاصی مربوطه (cat no:ab 53040) استفاده شد (شکل ۵).

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه با برش آنزیمی، قطعه کدکننده پروتئین پاراتیروئید به درستی در محل موردنظر قرار گرفت. فرایند مذکور به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تأیید گردید. بعد انجام عمل ترانسفورم، فرایند القا صورت گرفت که در نهایت پروتئین پاراتیروئید به‌صورت محلول در باکتری بیان گردید.

برای تولید پروتئین نوترکیب از میزبان‌های مختلفی استفاده می‌شود که رایج‌ترین آن باکتری اشریشیا کلی است (۱۴). باکتری دارای رشد سریع و محیط کشت ارزان است؛ لذا به‌عنوان میزبان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب در نظر گرفته می‌شود (۱۵). تولید پروتئین نوترکیب می‌تواند به‌صورت محلول و یا به‌صورت اینکلوزن بادی باشد (۱۶). زمانی که پروتئین نوترکیب به‌صورت اینکلوزن بادی در باکتری تولید می‌شود؛ در ابتدا بایستی به‌صورت محلول درآید و به دنبال آن فرایند ری‌فولدینگ انجام گردد. گاهی این فرایند بسیار ناکارآمد است. در بسیاری از موارد به دست آوردن یک پروتئین عملکردی پس از انجام عملیات پالین دستی بسیار مشکل و پرهزینه است (۱۶ و ۱۷). از طرفی پیش‌بینی شکل صحیح تاخوردگی اینکلوزن بادی تولید شده در فرایند رناتوراسیون غیرممکن است (۱۸ و ۱۹). این در حالی است که بازده فرایند ری‌فولدینگ معمولاً زیر ۱۰ درصد است (۲۰). بنابراین تولید پروتئین نوترکیب محلول دارای عملکرد، اهمیت بسیار زیادی در بیوتکنولوژی مدرن دارد. روش‌های متعددی برای تولید پروتئین نوترکیب به‌صورت محلول وجود دارد که به‌صورت مختصر به آن

- Oshika Y, Yamada T, Nakagawa S, Fujishima A, Kawase M, Ishibashi Y, et al. Human parathyroid hormone: efficient synthesis in *Escherichia coli* using a synthetic gene, purification and characterization. *Int J Pept Protein Res*. 1994 May;43(5):441-7.
- Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*. 2001 May; 344(19):1434-41.
- 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 Expr Purif*. 2007 Aug;54(2):212-9.
- Hirano T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res*. 1999 Apr; 14(4):536-45.

9. Brommage R, Hotchkiss CE, Lees CJ, Stancill MW, Hock JM, Jerome CP. Daily treatment with human recombinant parathyroid hormone-(1-34), LY333334, for 1 year increases bone mass in ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct; 84(10):3757-63.
10. MacDonald BR, Gowen M. Emerging therapies in osteoporosis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001 Jul; 15(3):483-96.
11. Chakraborty C, Doss CG. Crucial protein based drug targets and potential inhibitors for osteoporosis: new hope and possibilities. *Curr Drug Targets.* 2013 Dec;14(14):1707-13.
12. Suzuki Y, Yabuta M, Ohsuye K. High-level production of recombinant human parathyroid hormone 1-34. *Appl Environ Microbiol.* 1998 Feb;64(2):526-9.
13. Chunxiao W, Jingjing L, Yire X, Min D, Zhaohui W, Gaofu Q, et al. Study on preparation and activity of a novel recombinant human parathyroid hormone(1-34) analog with N-terminal Pro-Pro extension. *Regul Pept.* 2007 Jun; 141(1-3):35-43.
14. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 1999 Oct;10(5):411-21.
15. Merlin M, Gecchele E, Capaldi S, Pezzotti M, Avesani L. Comparative evaluation of recombinant protein production in different biofactories: the green perspective. *Bio Med Research International.* 2014; 2014: Article ID 136419, 14 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/136419>
16. Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OT. Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. In: Balbás P, Lorence A. *Recombinant Gene Expression : Reviews and Protocols.* Vol no 267. New York: Springer. 2004; pp: 15-51. doi: 10.1385/1-59259-774-2:015
17. Weikert C, Sauer U, Bailey JE. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of secreted recombinant protein. *Biotechnol Bioeng.* 1998 Aug; 59(3):386-91.
18. Clark ED. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Apr; 12(2):202-7.
19. Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 2001 Apr;12(2):195-201.
20. Carrió MM, Villaverde A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol.* 2002 Jun; 96(1):3-12.
21. Sørensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2005;4:1. doi: 10.1186/1475-2859-4-1
22. Vasina JA, Baneyx F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. *Protein Expr Purif.* 1997 Mar;9(2):211-8.
23. Weickert MJ, Pagratis M, Glascock CB, Blackmore R. A mutation that improves soluble recombinant hemoglobin accumulation in *Escherichia coli* in heme excess. *Appl Environ Microbiol.* 1999 Feb;65(2):640-7.
24. Yang Q, Xu J, Li M, Lei X, An L. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, gloshebin, in *E. coli* in the presence of metal ions. *Biotechnol Lett.* 2003 Apr;25(8):607-10.
25. Schwarz E, Lilie H, Rudolph R. The effect of molecular chaperones on in vivo and in vitro folding processes. *Biol Chem.* 1996 Jul-Aug;377(7-8):411-6.
26. Mogk A, Mayer MP, Deuring E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *ChemBiochem.* 2002 Sep; 3(9):807-14.
27. Kapust RB, Waugh DS. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 1999 Aug; 8(8): 1668-74. doi: 10.1110/ps.8.8.1668
28. Harrison RG. Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. *Innovations.* 2000; 11: 4-7.

Original Paper

Cloning and expression soluble recombinant parathyroid hormone in *E. coli*

Aghajani MH (B.Sc)¹, Tahzibi A (Ph.D)², Shahbazi M (Ph.D)^{*3}

¹M.Sc Student in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences Technologies, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran. ²Assistant Professor, Food and Drug Organization, Tehran, Iran. ³Associate Professor, Head of Cellular and Molecular Research, Center of Taleghani Hospital, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Parathyroid proteins involved in calcium homeostasis. With increasing age and other relevant factors, this hormone is not able to perform its role. Using recombinant parathyroid hormone prevent disease progression and effective in improvement of disease. This study was done to design and build the desired construct genes, cloning process and synthesis of soluble parathyroid hormone in *E. coli*.

Methods: In this laboratory study, design and optimization sequence of the gene parathyroid hormone (PTH) was carried out for expression of soluble proteins in bacteria. The construct containing PTH gene (puc 57) transformed into bacteria and cultivation was done in SOB medium then Plasmid extraction was performed. Fragment encoding the PTH was isolated by digestion of the cloning vector and ligate to expression vector (PET-32a). Subcloning process followed by induction with IPTG 1mM. The recombinant parathyroid hormone was expressed in bacteria, subsequently.

Results: After enzymatic digestion, the fragment encoding the protein of interest was properly localized. The process was confirmed by polymerase chain reaction (PCR). Following performing a transformation, induction process performed by IPTG with final concentration 1mM that caused the soluble parathyroid proteins to be expressed in bacteria and the process was confirmed by Western blot technique.

Conclusion: Protein expression in bacteria due to its rapid growth and the need to inexpensive medium is cost-effective. Soluble recombinant protein expression reduces downstream of recombinant protein production.

Keywords: Recombinant parathyroid hormone, Expression vector, Enzymatic digestion, PCR

* Corresponding Author: Shahbazi M (Ph.D), E-mail: shahbazimajid@yahoo.co.uk

Received 6 Jan 2015

Accepted 13 Apr 2015