



Optimized Solubilization and Purification of Recombinant Teriparatide Fusion Protein Expressed in *E. coli*

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Abbaszadeh S.* MSc

How to cite this article

Abbaszadeh S. Optimized Solubilization and Purification of Recombinant Teriparatide Fusion Protein Expressed in *E. coli*. Modares Journal of Biot-echology. 2019;10(1):1-7.

ABSTRACT

Aims There are several cell disruption methods for intracellular protein extraction. The aim of this study was to select the best approach for recombinant teriparatide fusion protein extraction from *E. coli* and achieve the best purification conditions.

Materials & Methods In this experimental research, bacterial cells were disrupted by different methods such as sonication in different cycles, grinding with liquid nitrogen in two different cell culture volumes, and homogenization at two different pressures. The supernatant and pellet samples were run on sodium dodecyl sulphate gel. All the cell lysates were cultured on LB agar medium and stained with Gram staining method. The Ni²⁺ affinity chromatography of recombinant teriparatide fusion protein was done under denaturing and non-denaturing conditions, using pH and imidazole concentration gradient, respectively. All samples were taken on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel and the amount of purified protein was calculated by Micro-Bradford assay.

One-way ANOVA and SPSS 22 software were used to analyze the data.

Findings In the 20 and 25 cycles, a large part of the fusion protein led to protein solubilization. In the method of grinding with liquid nitrogen, proteins were more likely to enter the sediment part. The cell disruption was complete in a chemical method. The cell disruption under 50bar homogenization was more than that of 15bar. In chemical degradation and sonication, a large amount of fusion protein led to protein solubilization. In non-denaturing conditions, no recombinant fusion protein was removed from the column with the isolation buffer, but in the denaturing conditions, a large amount of proteins was purified.

Conclusion The combined method of chemical degradation and sonication leads to approximately 97.7% of protein solubilization, and the purification in denaturing condition has also the suitable result in contrast to non-denaturing condition.

Keywords Cell Disruption; *E. coli*; Purification; Recombinant Teriparatide Fusion Protein

*Biotechnology Research Center, Iranian Research Organization for Technology (IROST), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biotechnology Research Center, Iranian Research Organization for Technology (IROST), Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

829abbaszadeh.se@gmail.com

Article History

Received: October 16, 2016

Accepted: September 16, 2018

ePublished: March 16, 2019

CITATION LINKS

- [1] Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products
- [2] Protein purification
- [3] Bacterial cell disruption: A crucial step in protein production
- [4] Nonclassical inclusion bodies in Escherichia coli
- [5] Affinity chromatography: Principles and applications
- [6] Metal ion affinity adsorption of a Zn (II)-transport protein present in maternal plasma during lactation: Structural characterization and identification as histidine-rich glycoprotein
- [7] Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials, serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions
- [8] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags
- [9] Overexpression of recombinant human teriparatide, rhP TH (1-34) in Escherichia coli: An innovative gene fusion approach
- [10] Soluble protein production methods
- [11] Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies
- [12] Purification of polyhistidine-tagged proteins

محلوسازی و تخلیص بهینه پروتئین نوترکیب امتزاجی تری پاراتید بیان شده در *اشریشیا کلی*

سپیده عباسزاده* MSc

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده

اهداف: روش‌های تخریب سلولی مختلفی برای استخراج پروتئین‌های داخل سیتوپلاسمی وجود دارد. هدف مطالعه حاضر انتخاب بهترین روش استخراج پروتئین امتزاجی نوترکیب تری پاراتید از میزبان باکتریایی *اشریشیا کلی* و دستیابی به بهترین شرایط تخلیص آن بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، سلول‌های باکتری با روش‌های سونیکاسیون با دوره‌های متفاوت، له کردن در نیتروژن مایع، هموژناسیون تحت دو فشار مختلف و روش شیمیایی شکسته شدند. نمونه‌های مربوط به رسوب و محلول رویی حاصل از هر روش، در ژل سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شدند. سلول‌های شکسته شده در محیط کشت لوریا برتانی جامد کشت و به روش گرم رنگ آمیزی شدند. کروماتوگرافی تمایلی نیکل برای خالص سازی پروتئین در شرایط واسرشته و غیرواسرشته به ترتیب با شیب pH و غلظت ایمیدازول به کار رفت. تمامی نمونه‌ها روی ژل سدیم دودسیل سولفات - پلی اکریل آمید برده شدند و محاسبه میزان پروتئین تخلیص شده با آزمون میکروبرادفورد صورت گرفت.

یافته‌ها: در دوره‌های ۲۰ و ۲۵ دور در دقیقه بخش زیادی از پروتئین امتزاجی وارد بخش محلول شد. در روش له کردن در نیتروژن مایع، پروتئین‌ها بیشتر وارد بخش رسوب شدند. تخریب سلول‌ها در روش شیمیایی کامل بود. شکستن سلول‌ها با هموژناسیون تحت فشار ۵۰ بار، بیشتر از ۱۵ بار بود. در تخریب شیمیایی همراه با سونیکاسیون مقدار بسیار زیادی از پروتئین امتزاجی وارد بخش محلول شد. در شرایط غیرواسرشته هیچ پروتئین امتزاجی نوترکیبی با یافر جداسازی از ستون خارج نشد، اما در شرایط واسرشته مقدار زیادی از پروتئین تخلیص شد.

نتیجه‌گیری: در تخریب شیمیایی همراه با سونیکاسیون، ۹۷٪ پروتئین کل به بخش محلول وارد می‌شود و تخلیص در شرایط واسرشته برخلاف شرایط غیرواسرشته به طور مناسب و مطلوب صورت می‌گیرد.

کلیدواژه‌ها: تخریب سلولی، *اشریشیا کلی*، تخلیص، پروتئین امتزاجی نوترکیب تری پاراتید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵

*نویسنده مسئول: 829abbaszadeh.se@gmail.com

مقدمه

شکستن سلول‌ها به دلایل مختلفی از جمله برای استخراج و خالص سازی پروتئین‌ها انجام می‌شود و روش‌های مختلفی برای آن وجود دارد. این روش‌ها شامل روش‌های زیستی مانند تخریب سلول‌ها توسط آنزیم‌هایی مانند لیزوزیم، روش‌های شیمیایی مانند استفاده از شوینده‌های مختلف و روش‌های مکانیکی مانند سونیکاسیون، هموژناسیون، فربز کردن و ذوب کردن، له کردن در نیتروژن مایع و تخریب با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای هستند [1]. هیچ کدام از روش‌های فوق، روش مناسب و عمومی برای تخریب سلولی در تمام شرایط نیست و هر روش در شرایط خاص بر دیگری ارجحیت دارد. عواملی مانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین و نوع میزبانی که این پروتئین را تولید می‌کند و حتی هدف پژوهش، نوع روش شکستن برای استخراج پروتئین را تعیین می‌کنند [2].

در مواردی که هدف، استخراج پروتئین‌های محلول باشد، ایجاد یک شکاف کوچک در دیواره سلولی باکتری‌ها کافی است و این کار با روش‌های مختلف تخریب سلولی امکان پذیر است، اما در استخراج اجسام توده‌ای، دیواره باید به طور گسترده شکافته شود. حتی نوع

اجسام توده‌ای در انتخاب روش مناسب برای تخریب سلولی تاثیرگذار است. انواع مختلف اجسام توده‌ای با حلالیت و شکنندگی‌های مختلفی وجود دارند [3]. در یک دسته بندی، اجسام توده‌ای به دو گروه کلاسیک و غیرکلاسیک تقسیم می‌شوند. اجسام توده‌ای غیرکلاسیک در مقایسه با انواع کلاسیک شکننده تر و حلالیت بیشتری دارند [4].

برای تخلیص پروتئین مورد نظر از عصاره استخراج شده روش‌های مختلفی وجود دارد، یکی از این روش‌ها کروماتوگرافی تمایلی است. اساس کروماتوگرافی تمایلی بر تعاملات برگشت پذیر و اختصاصی بین پروتئین مورد نظر و گروه عاملی متصل به رزین کروماتوگرافی استوار است [5].

یکی از روش‌های رایج کروماتوگرافی تمایلی، استفاده از یون‌های فلزی برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی است. این روش بر پایه برهم کنش بین دنباله هیستیدینی با یون فلزی تثبیت شده روی رزین که معمولاً مس (Cu^{2+})، نیکل (Ni^{2+})، کبالت (Co^{2+}) و روی (Zn^{2+}) هستند، استوار است [6, 7]. در نهایت برای جداسازی پروتئین متصل شده به رزین در حالت غیرواسرشته پروتئین از شیب غلظت ایمیدازول به عنوان مولکول رقیب هیستیدین و در حالت واسرشته آن از شیب pH برای از بین بردن شرایط بهینه اتصال پروتئین مورد نظر با رزین تمایلی استفاده می‌شود [8]. در فرآیند تخلیص پروتئین‌ها همواره تلاش بر آن است که بیشترین میزان پروتئین مورد نظر خالص سازی شود.

برخی از سؤالات پژوهش حاضر شامل موارد زیر بودند:

آیا پروتئین امتزاجی نوترکیب تری پاراتید به صورت اجسام توده‌ای یا محلول بیان شده است؟

با توجه به نوع پروتئین بیان شده، بهترین روش استخراج آن از میزبان باکتریایی چیست؟

پروتئین امتزاجی نوترکیب تری پاراتید در چه شرایطی (واسرشته یا غیرواسرشته) با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص می‌شود؟

پژوهش حاضر با هدف انتخاب بهترین روش استخراج پروتئین امتزاجی نوترکیب تری پاراتید از میزبان باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) و در نهایت دستیابی به بهترین شرایط تخلیص آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر برای سنجش مقدار پروتئین از روش میکروبرادفورد (۱۰۰ میلی لیتر محلول برادفورد حاوی ۱۰ میلی گرم کوماسی بلو G250، ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵٪، ۱۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ و ۸۵ میلی لیتر آب مقطر است که از کاغذ صافی Fisher brand QL120 عبور داده شده است) استفاده شد و نرمال سازی نمونه‌های بارگذاری شده در الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات - پلی اکریل آمید بر مبنای تعداد باکتری با احتساب دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر صورت گرفت.

سلول باکتری، محیط و شرایط کشت: باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) نوترکیب حاوی پلاسمید pET-28a (دارای ژن نوترکیب پروتئین امتزاجی تری پاراتید) [9] ابتدا در محیط لوریا برتانی جامد حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد.

میلی لیتر محیط کشت، ۵۰ میلی لیتر بافر شکست شیمیایی ذکر شده در بخش بالا اضافه شد. سونیکاسیون در دور ۲۰ دور در دقیقه مطابق شرایط گفته شده انجام شد. سپس نمونه به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بقیه مراحل مانند قبل تکرار شد. همچنین در حالتی دیگر، ابتدا تخریب شیمیایی و سپس سونیکاسیون صورت گرفت.

کشت روی پلیت: ۵۰ میکرو لیتر از سلول های شکسته نشده (۱۰^۶ برابر رقیق شده در سرم فیزیولوژی) و سلول های شکسته شده با روش های مختلف، روی محیط کشت های جداگانه لوریا برتانی جامد حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین کشت گسترده داده شدند و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند.

از سلول های شکسته نشده و تمام سلول های شکسته شده به روش های مختلف، لام تهیه شد و برای آنها رنگ آمیزی گرم صورت گرفت.

تخلیص پروتئین امتزاجی تری پاراتید با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل در شرایط غیرواشرشته: به ۴ میلی لیتر محلول حاصل از تخریب سلولی به روش سونیکاسیون همراه با تخریب شیمیایی، ایمیدازول با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار افزوده شد و سپس به مدت یک ساعت در ستون حاوی یک میلی لیتر رزین Ni-NTA (نیکل-نیتروتری استنیک اسید؛ کیاژن؛ آلمان) قرار گرفت. پس از جمع آوری مایع خارج شده، ابتدا ستون به وسیله ۴ میلی لیتر و سپس ۸ میلی لیتر بافر شست و شو (ایمیدازول ۲۰ میلی مولار، فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار و pH برابر ۸) شسته و مایع حاصل از آن جمع آوری شد. به منظور کنده شدن پروتئین های امتزاجی حاوی دنباله هیستیدینی تری پاراتید از رزین، ۴ میلی لیتر بافر جداسازی (ایمیدازول ۲۵۰ میلی مولار، فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار، کلرید سدیم ۳۰۰ میلی مولار و pH برابر ۸) از ستون عبور داده شد و سپس مایع خارج شده از ستون جمع آوری شد. تمامی نمونه های خارج شده در مراحل مختلف تخلیص، روی ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید برده شدند و در نهایت میزان پروتئین امتزاجی تخلیص شده با استفاده از آزمون میکروبرادفورد محاسبه شد.

تخلیص پروتئین امتزاجی تری پاراتید با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل در شرایط واشرشته: ۴ میلی لیتر محلول حاصل از تخریب سلولی به روش سونیکاسیون همراه با تخریب شیمیایی، به مدت یک ساعت در ستون حاوی یک میلی لیتر رزین Ni-NTA قرار داده شد. پس از جمع آوری مایع خارج شده، ستون ابتدا به وسیله ۴ و سپس ۸ میلی لیتر بافر شست و شو (تریس ۱۰ میلی مولار، فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار، اوره ۸ میلی مولار و pH برابر ۸/۳) شسته و مایع حاصل از آن جمع آوری شد. سپس بافرهای جداسازی ۱ (تریس ۱۰ میلی مولار، فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار، اوره ۸ میلی مولار و pH برابر ۵/۹)، ۲ (تریس ۱۰ میلی مولار، فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار، اوره ۸ میلی مولار و pH برابر ۴/۵) و ۳ (تریس ۱۰ میلی مولار، فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار، اوره ۸ میلی مولار و pH برابر ۴) از ستون عبور داده شد تا پروتئین های امتزاجی حاوی دنباله هیستیدینی تری پاراتید از رزین کنده شوند. مایع خارج شده از ستون جمع آوری و جذب آن در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. تمامی نمونه های خارج شده در مراحل مختلف تخلیص روی ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید برده شدند و در نهایت میزان پروتئین امتزاجی تخلیص شده با استفاده از آزمون میکروبرادفورد محاسبه شد. اندازه گیری بیان بالای ۵۰% نسبت به پروتئین کل

سپس یک کلنی حاصل از کشت شبانه در محیط لوریا برتانی مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

در محیط کشت ۱۵۰ و ۱۵ میلی لیتری تازه لوریا برتانی مایع حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کانامایسین، کشت شبانه به نسبت ۱ به ۱۶۰ تلقیح شد و در شرایط ذکر شده فوق قرار گرفت تا چگالی نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۶ تا ۰/۷ برسد. سپس ۰/۲ میلی مولار القا کننده ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید به آن اضافه شد و به مدت ۱۶ ساعت با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸°C قرار گرفت.

جمع آوری سلول ها: رسوب سلولی هر نمونه با انجام سانتریفیوژ توسط دستگاه Hettich universal 320 R (آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه از محیط کشت جدا و محلول رویی دور ریخته شد.

سونیکاسیون: رسوب حاصل از چهار نمونه محیط کشت ۱۵۰ میلی لیتری جدا و هر نمونه در ۶ میلی لیتر بافر ویژه شکست (تریس ۵۰ میلی مولار، EDTA ۵ میلی مولار و pH برابر ۵.۸) به مدت یک دقیقه در حمام یخ همگن سازی شد. هر چهار قسمت با تعداد دورهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ (دور در دقیقه) و با دامنه فرکانس ۴۰% به مدت یک دقیقه و زمان استراحت یک دقیقه (یک ثانیه پالس و یک ثانیه بدون پالس)، در حمام یخ و با دستگاه سونیکاتور مدل BANDELIN SONOPULS HD 200 تحت امواج ماورای صوت قرار داده شدند. محلول رویی و رسوب پس از سانتریفیوژ نمونه ها با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C و به مدت ۲۰ دقیقه از هم جدا و مقادیر مساوی از محلول رویی و رسوب از هر نمونه در ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند.

له کردن در نیتروژن مایع: رسوب مربوط به ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت در ۶ میلی لیتر و رسوب مربوط به ۱۵ میلی لیتر محیط کشت در ۰/۶ میلی لیتر بافر ویژه شکست ذکر شده حل شدند. سپس هر نمونه ۲ بار توسط نیتروژن مایع فریز و با دسته هاون کوبیده شد. محلول رویی و رسوب نمونه ها پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C از هم جدا و مقادیر مساوی از آنها در ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند.

تخریب شیمیایی: رسوب حاصل از ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت در ۵۰ میلی لیتر بافر شکست شیمیایی (فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار، تریس ۱۰ میلی مولار، اوره ۸ میلی مولار و pH برابر ۸) به مدت ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. از هر نمونه یک میلی لیتر برداشته و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C و به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد، سپس محلول رویی از هم جدا و مقادیر مساوی از آنها در ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی اکریل آمید الکتروفورز شدند. همچنین میزان پروتئین کل وارد شده در فاز محلول با استفاده از روش میکروبرادفورد محاسبه شد.

هموژناسیون: به رسوب حاصل از ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت، ۵۰ میلی لیتر بافر شکست شیمیایی ذکر شده در بخش بالا اضافه شد. سپس با استفاده از هموژنایزر مدل GEA Niro Soavi, Panda PLUS 2000، تخریب سلولی تحت فشار ۱۵ و ۵۰ بار صورت گرفت. از هر نمونه یک میلی لیتر برداشته و مراحل ذکر شده در روش های قبل، در هموژناسیون نیز تکرار شد.

سونیکاسیون همراه با تخریب شیمیایی: به رسوب حاصل از ۱۵۰

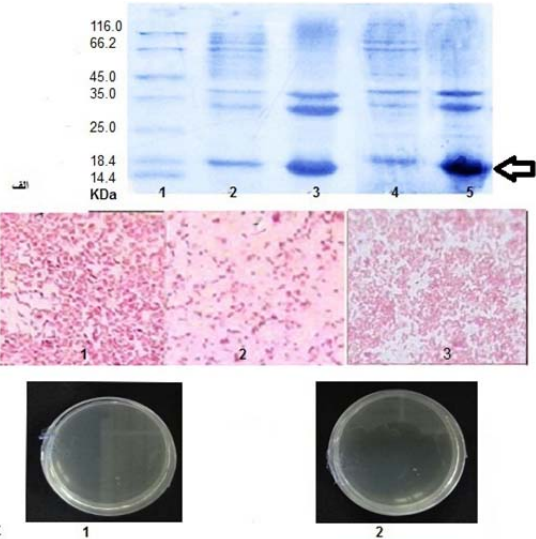
یافته‌ها

باکتری /شریشیا کلی BL21(DE3) حاوی ژن پروتئین امتزاجی نو ترکیب دارویی تری پاراتید بود که توسط ماده القاکننده ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید بیان شد.

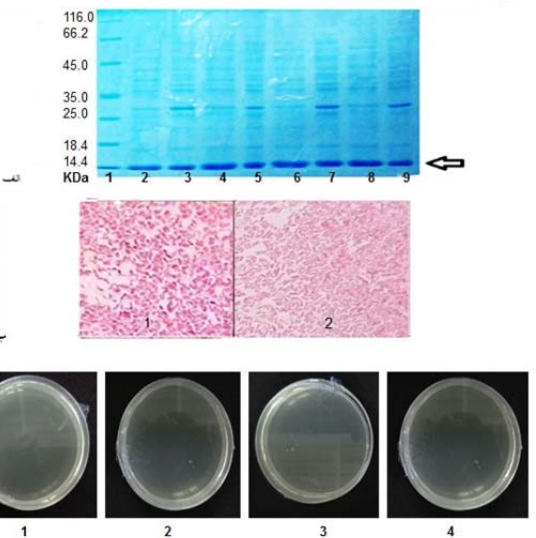
در روش سونیکاسیون در دوره‌های ۲۰ و ۲۵، بخش قابل توجهی از پروتئین امتزاجی مورد نظر وارد بخش محلول شد، اما همچنان در حدود نیمی از پروتئین‌های امتزاجی تری پاراتید در بخش رسوب بودند. در بررسی لام و محیط کشت، تخریب سلولی در دوره‌های ۲۰ و ۲۵ به طور کامل انجام شد (شکل ۱). پروتئین امتزاجی مورد نظر به شکل اجسام توده‌ای غیرکلاسیک بود.

در روش له کردن در نیتروژن مایع پروتئین‌ها بیشتر وارد بخش رسوب شدند. به علاوه، تفاوت چندانی بین شکست سلول‌ها در دو حجم متفاوت مشاهده نشد و در هر دو حالت تخریب سلولی به طور کامل صورت گرفت (شکل ۲).

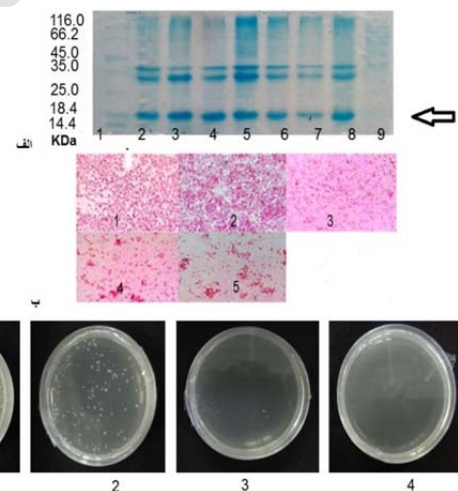
تمام نمونه‌های باکتریایی که در زمان‌های مختلف با بافر تخریب شیمیایی تیمار شده بودند، روی محیط کشت لوریا برتانی جامد رشد نکردند؛ اما در مشاهده لام مربوط به این روش تخریب، سلول‌ها شکل ظاهری خود را حفظ کردند. بنابراین تخریب سلول‌ها در این روش کامل بود، اما با ایجاد منافذ کوچک در غشای سلولی تنها بخشی از پروتئین‌هایی که محلول بودند به بیرون سلول تراوش کردند (شکل ۳)، علاوه بر این بیشترین میزان پروتئین وارد شده در فاز محلول در اثر تیمار شیمیایی به مدت ۴۵ و ۶۰ دقیقه و به میزان ۲۳/۵% بود (جدول ۱).



شکل ۱ شکستن سلول‌ها با روش له کردن در نیتروژن مایع؛ الف) ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به: (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، (۲) محلول رویی پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۶ میلی لیتر)، (۳) رسوب حاصل پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۰/۶ میلی لیتر)، (۴) رسوب حاصل پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۰/۶ میلی لیتر)؛ ب) لام تهیه شده مربوط به: (۱) باکتری شکسته نشده، (۲) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۶ میلی لیتر)، (۳) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: (۱) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۶ میلی لیتر)، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)



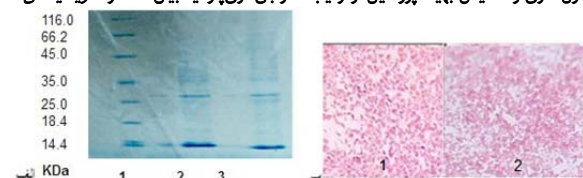
شکل ۲ شکستن سلول‌های باکتری به روش تخریب شیمیایی؛ الف) ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به: (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، (۲) محلول تخریب شیمیایی در ۱۵ دقیقه، (۳) رسوب تخریب شیمیایی در ۱۵ دقیقه، (۴) محلول تخریب شیمیایی در ۳۰ دقیقه، (۵) رسوب تخریب شیمیایی در ۳۰ دقیقه، (۶) محلول تخریب شیمیایی در ۴۵ دقیقه، (۷) رسوب تخریب شیمیایی در ۴۵ دقیقه، (۸) محلول تخریب شیمیایی در ۶۰ دقیقه، (۹) رسوب تخریب شیمیایی در ۶۰ دقیقه؛ ب) لام تهیه شده مربوط به: (۱) باکتری شکسته نشده، (۲) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)، (۳) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ میلی لیتر)، (۴) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ میلی لیتر)، (۵) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ میلی لیتر)؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: (۱) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ میلی لیتر)، (۳) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ میلی لیتر)، (۴) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ میلی لیتر)؛ د) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ میلی لیتر)، (۳) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ میلی لیتر)، (۴) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ میلی لیتر)؛ ه) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ میلی لیتر)، (۳) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ میلی لیتر)، (۴) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ میلی لیتر)؛ و) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۰/۶ میلی لیتر)، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ میلی لیتر)، (۳) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ میلی لیتر)، (۴) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ میلی لیتر)



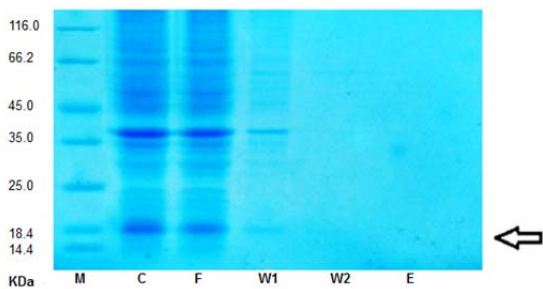
شکل ۳ شکستن سلول‌ها با روش سونیکاسیون؛ الف) ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به: (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، (۲) رسوب حاصل پس از ۲۵ دور سونیکاسیون، (۳) محلول رویی پس از ۲۵ دور سونیکاسیون، (۴) رسوب حاصل پس از ۲۰ دور سونیکاسیون، (۵) محلول رویی پس از ۲۰ دور سونیکاسیون، (۶) رسوب حاصل پس از ۱۵ دور سونیکاسیون، (۷) محلول رویی پس از ۱۵ دور سونیکاسیون، (۸) رسوب حاصل پس از ۱۰ دور سونیکاسیون، (۹) محلول رویی پس از ۱۰ دور سونیکاسیون؛ ب) لام تهیه شده مربوط به: (۱) باکتری شکسته نشده، (۲) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۱۰ دور سونیکاسیون)، (۳) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ دور سونیکاسیون)، (۴) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ دور سونیکاسیون)، (۵) نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ دور سونیکاسیون)؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: (۱) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۱۰ دور سونیکاسیون)، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۱۵ دور سونیکاسیون)، (۳) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۰ دور سونیکاسیون)، (۴) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۲۵ دور سونیکاسیون)، (۵) کشت گسترده از نمونه شکسته شده (با حجم نمونه ۳۰ دور سونیکاسیون)

| نمونه‌ها | حلالیت پروتئین (%) |
|--|--------------------|
| نمونه باکتری شکسته شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ۱۵ دقیقه | ۱۱ |
| نمونه باکتری شکسته شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ۳۰ دقیقه | ۲۷/۴ |
| نمونه باکتری شکسته شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ۴۵ دقیقه | ۳۲/۵ |
| نمونه باکتری شکسته شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ۶۰ دقیقه | ۳۲/۵ |

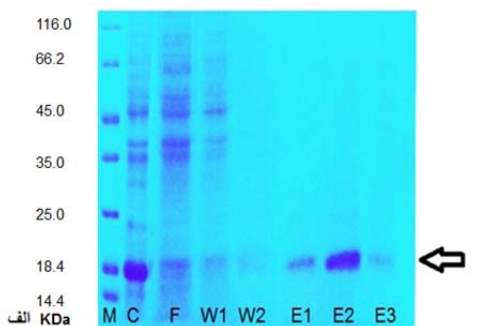
محاسبات براساس نتایج آزمایش میکروبرادفورد حاصل شده است



شکل ۵) شکستن سلول‌های باکتری به روش تخریب شیمیایی همراه با ۲۰ دور سونیکاسیون؛ الف) ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به: (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، (۲) رسوب حاصل از تخریب شیمیایی و سپس سونیکاسیون، (۳) محلول حاصل از تخریب شیمیایی و سپس سونیکاسیون، (۴) رسوب حاصل از سونیکاسیون و سپس تخریب شیمیایی، (۵) محلول حاصل از سونیکاسیون و سپس تخریب شیمیایی؛ ب) لام تهیه شده مربوط به: (۱) باکتری شکسته نشده، (۲) نمونه شکسته شده



شکل ۶) ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به تخلیص پروتئین امتزاجی تری پاراتید توسط کروماتوگرافی تمایلی در شرایط غیرواسرشته؛ M) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، C) نمونه عبور داده نشده از ستون، F) محلول عبوری، W1) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر شست و شو در مرحله اول، W2) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر شست و شو در مرحله دوم، E) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر جداکننده



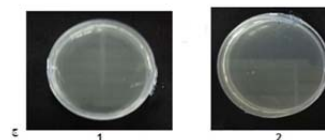
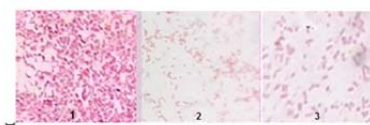
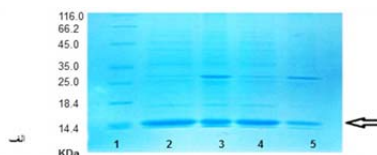
شکل ۷) الف) تخلیص پروتئین امتزاجی تری پاراتید توسط کروماتوگرافی تمایلی در شرایط واسرشته ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به: M) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، C) نمونه عبور داده نشده از ستون، F) محلول عبوری، W1) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر شست و شو در مرحله اول، W2) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر شست و شو در مرحله دوم، E1) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر جداکننده ۱، E2) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر جداکننده ۲، E3) نمونه حاصل از شست و شوی ستون با بافر جداکننده ۳؛ ب) نمودار مربوط به تخلیص پروتئین امتزاجی تری پاراتید توسط کروماتوگرافی تمایلی در شرایط واسرشته؛ ۱ تا ۴) محلول عبوری، ۵ تا ۸) شست و شو با بافر شست و شو در مرحله اول، ۹ تا ۱۳) شست و شو با بافر شست و شو در مرحله دوم، ۱۴ تا ۱۷) نمونه جمع شده حاصل از عبور بافر جداکننده ۱، ۱۸ تا ۲۴) نمونه جمع شده حاصل از عبور بافر جداکننده ۲، ۲۵ تا ۲۷) نمونه جمع شده حاصل از عبور بافر جداکننده ۳

شکستن سلول‌ها با هموژناسیون تحت فشار ۵۰ بار، بیشتر از ۱۵ بار بود اما با این حال در این روش تخریب سلولی نیز پروتئین امتزاجی مورد نظر به طور قابل توجهی در هر دو بخش محلول و رسوب وجود داشت (شکل ۴).

در تخریب سلولی با تخریب شیمیایی به همراه سونیکاسیون مقدار بسیار زیادی از پروتئین امتزاجی مورد نظر وارد بخش محلول شد، سلول‌ها شکل میله‌ای خود را از دست دادند و دیواره سلولی کاملاً تخریب و شکسته شد (شکل ۵). در نهایت در شرایطی که ابتدا سونیکاسیون و سپس تخریب شیمیایی صورت گرفت، ۹۷/۷٪ پروتئین کل سلول وارد بخش محلول شد.

در شرایط غیرواسرشته هیچ پروتئین امتزاجی نوترکیبی با بافر جداسازی از ستون خارج نشد و همه آنها در باندهای مربوط به بافر شست و شو و محلول عبوری مشاهده شدند (شکل ۶).

در شرایط واسرشته، اتصال دنباله پلی هیستیدینی به رزین به شکل فضایی خاصی نیاز نداشت و به دلیل واسرشته شدن پروتئین‌ها به راحتی با نیکل برهم کنش داد. در شرایط واسرشته، مقدار بسیار کمی از پروتئین نوترکیب امتزاجی هنگام شست و شو از دست رفت اما مقدار قابل توجهی از آن با استفاده از بافرهای جداکننده با pH ۴/۵، ۵/۹ و ۴ تخلیص شد (شکل ۷). طبق روش میکروبرادفورد میزان پروتئین امتزاجی نوترکیب تری پاراتید تخلیص شده، ۳۵۰ میلی گرم به ازای هر لیتر محیط کشت بود.



شکل ۴) شکستن سلول‌های باکتری به روش هموژناسیون؛ الف) ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید مربوط به: (۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، (۲) محلول حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۱۵ بار، (۳) رسوب حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۱۵ بار، (۴) محلول حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۵۰ بار، (۵) رسوب حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۵۰ بار؛ ب) لام تهیه شده مربوط به: (۱) باکتری شکسته نشده، (۲) نمونه شکسته شده تحت فشار ۱۵ بار، (۳) نمونه شکسته شده تحت فشار ۵۰ بار؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: (۱) کشت گسترده از نمونه شکسته شده تحت فشار ۱۵ بار، (۲) کشت گسترده از نمونه شکسته شده تحت فشار ۵۰ بار

می‌شود^[10]، اگر گروه‌های عاملی واکنش‌دهنده در سطح ساختار نباشند یا نیروی دافعه بین مولکول‌های بیان‌شده وجود داشته باشد، می‌توان به اجسام توده‌ای دست یافت که با ترکیب روش شیمیایی و سونیکاسیون بتوانند کاملاً به حالت محلول درآیند. این یافته‌ها زمانی که روش شیمیایی به ساختار و عملکرد پروتئین صدمه‌ای نرزد یا هنگامی که این موارد در زمان استخراج و تخلیص اهمیت نداشته باشند (مانند پروتئین امتزاجی مورد نظر پژوهش حاضر) می‌توانند بسیار ارزشمند باشند^[11]، زیرا در عین اینکه پروتئین‌ها در ساختار اجسام توده‌ای قرار گرفته‌اند و از دسترس آزمون‌های پروتئاز میزبان خارج می‌شوند، به‌راحتی قابل جداسازی بوده^[9] و در نهایت به علت شل بودن ساختار به آسانی محلول‌سازی می‌شوند و سایر فرآیندهای پایین‌دستی با سهولت بیشتری انجام خواهد شد. این مساله در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیله باکتری اهمیت چندین برابر دارد و سبب کاهش پیچیدگی‌های فرآیندهای پایین‌دستی و مقرون‌به‌صرفه بودن آنها خواهد شد.

اما در تخلیص پروتئین، زمانی که پروتئین نوترکیب دنباله هیستیدینی دارد، می‌توان پروتئین نوترکیب را با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی فلزی با خلوص بالایی از سایر پروتئین‌ها جدا کرد^[8]. بسته به هدف تحقیق، محلول بودن یا نبودن پروتئین نوترکیب یا این که دنباله هیستیدینی پس از شکل‌گیری فضایی پروتئین در کدام بخش از ساختار آن قرار بگیرد، تخلیص در یکی از شرایط غیرواسرشته یا واسرشته انجام خواهد شد. در مرحله اول موقعیت دنباله هیستیدینی تعیین‌کننده شرایط آمایش است. اگر دنباله هیستیدینی در ساختار پروتئین به‌گونه‌ای قرار گیرد که در معرض یون‌های نیکل تثبیت‌شده روی رزین کروماتوگرافی باشد، شرایط واسرشته‌نشده بر شرایط واسرشته ارجحیت خواهد داشت. طبق نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد با حذف عامل واسرشته‌کننده در طول تخلیص، پروتئین شکل فضایی خاصی یافت و احتمالاً دنباله هیستیدینی در داخل آن پنهان شد و نتوانست با یون‌های نیکل اتصال برقرار کند، پس طی شست‌وشو از ستون خارج شد.

در پروتئین‌های نوترکیب نامحلول نیز اگر جای‌گیری دنباله هیستیدینی به‌صورتی باشد که بتواند در معرض یون‌های فلزی قرار گیرد، عمل تخلیص و تاخوردگی مجدد می‌تواند به‌صورت همزمان انجام شود. اما اگر این دنباله‌ها در ساختار درونی پروتئین پنهان شوند و نتوانند اتصال مناسبی با یون‌های فلزی تثبیت‌شده برقرار کنند، برای تخلیص به واسرشته‌شدن پروتئین و کروماتوگرافی تمایلی در شرایط واسرشته نیاز است^[12].

در پژوهش حاضر تخلیص پروتئین نوترکیب امتزاجی تری‌پاراتید در دو شرایط غیرواسرشته و واسرشته با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد که در شرایط غیرواسرشته، تخلیص پروتئین‌های امتزاجی ناموفق بود، اما در شرایط واسرشته، پروتئین مورد نظر به شکل کاملاً مطلوب تخلیص شد. این مشاهدات گواه آن است که احتمالاً با حذف عامل واسرشته‌کننده، پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید ساختار فضایی پیدا می‌کند که در آن دنباله هیستیدینی در بخش درونی ساختار قرار گرفته و نمی‌تواند به یون‌های فلزی متصل شود.

اگر چه در پژوهش حاضر فعالیت پروتئین امتزاجی اهمیت نداشت، اما باید توجه داشت که تخلیص پروتئین‌ها در شرایط غیرواسرشته به‌ویژه در مواردی که فعالیت زیستی محصول کروماتوگرافی تمایلی اهمیت دارد، بازده فعالیت بالا می‌رود، زیرا

پژوهش حاضر با هدف انتخاب بهترین روش استخراج پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید از میزبان باکتری /شیریشیا کلی و دستیابی به بهترین شرایط تخلیص آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد.

طبق نتایج پژوهش حاضر پروتئین امتزاجی به شکل اجسام توده‌ای غیرکلاسیک بود. بنابراین، برای ازدست‌ن دادن پروتئین یا باید پروتئین امتزاجی مورد نظر موجود در بخش رسوب و محلول به‌طور جداگانه تخلیص می‌شد که این کار از نظر اقتصادی به‌ویژه در مرحله انبوه‌سازی به‌صرفه نبود یا روشی برای استخراج انتخاب می‌شد که در آن بیشترین میزان پروتئین امتزاجی در بخش محلول قرار بگیرد.

وقتی پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم باکتری بیان می‌شود، برای استخراج آن از روش‌های مختلفی می‌توان بهره برد. بسته به مقیاس عمل، نوع اجسام توده‌ای تشکیل‌شده و میزان محلول بودن یا تاخوردگی صحیح پروتئین‌های بیان‌شده، می‌توان این روش‌ها را اولویت‌بندی کرد^[3]. علاوه بر احتساب موضوعات نظری، انتخاب بهترین روش بدون آزمایش کردن روش‌های مختلف عملاً امکان‌پذیر نیست، زیرا پروتئین‌های مختلف بسته به ماهیت، رفتارهای متفاوتی را در این روش‌ها نشان می‌دهند. در پژوهش حاضر برای استخراج پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید که در باکتری /شیریشیا کلی به‌صورت اجسام توده‌ای غیرکلاسیک بیان شده بود^[9]، روش‌های مختلفی مورد آزمایش قرار گرفت.

طبق نتایج پژوهش حاضر با توجه به این که بیش از نصف پروتئین مورد نظر پس از سونیکاسیون وارد بخش محلول شد و بقیه آن که غلظت قابل توجهی هم داشت در بخش رسوب باقی ماند، انجام دو روش مجزا برای بازیافت و خالص‌سازی پروتئین‌های محلول و نامحلول مقرون به صرفه نبود. بنابراین روش‌های مختلف به‌صورت جداگانه یا ترکیبی برای وارد کردن بیشترین مقدار پروتئین بیان‌شده در بخش محلول مورد استفاده قرار گرفت.

وقتی از روش له کردن در نیتروژن مایع استفاده شد، بخش کمتری از پروتئین‌ها نسبت به روش سونیکاسیون وارد بخش محلول شدند که این هدف مورد نظر پژوهش را تامین نمی‌کرد. بنابراین روش‌های دیگر مورد آزمایش قرار گرفت. یکی از این روش‌ها هموژناسیون بود که تحت دو فشار مختلف روی باکتری آزمایش شد ولی نتایج همچنان مانند نتایج قبل بود.

با توجه به این که روش شیمیایی تنها می‌توانست پروتئین‌های محلول را از باکتری استخراج کند^[3]، استفاده از آن به‌تنهایی قاعدتاً منجر به استخراج ۱۰۰٪ پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید که به‌صورت اجسام توده‌ای بیان شده بود، نمی‌شد و فقط بخشی از آنها که دارای ساختار درهم‌تنیده شل‌تری بودند می‌توانستند از باکتری خارج شوند. بنابراین این روش با سونیکاسیون ترکیب شد تا بقایای به‌جامانده از اجسام توده‌ای که قادر به خروج از منافذ ریز ایجادشده با بافر شیمیایی نبودند، بتوانند از باکتری خارج شوند. با توجه به این موضوع، تیمار با بافر شیمیایی همراه با سونیکاسیون انجام شد. پس از سانتریفیوژ و جداسازی بخش محلول از رسوب، تقریباً ۱۰۰٪ پروتئین‌های مورد نظر (۹۷/۷٪) وارد فاز محلول شده بودند که نتیجه بسیار مطلوب و قابل توجهی بود.

از مقایسه نتایج آزمایشات انجام‌شده و با توجه به طراحی صورت‌گرفته در مورد ژن پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید که دارای ساختار سخت و بار منفی زیاد بود^[9]، می‌توان گفت علی‌رغم بیان بالای باکتری که موجب ادغام و توده‌ای شدن مولکول‌های پروتئین

5- Magdeldin S, Moser A. Affinity chromatography: Principles and applications. In: Magdeldin S, editor. Affinity chromatography. London: IntechOpen; 2012. p. 368.

6- Yip TT, William Hutchens T. Metal ion affinity adsorption of a Zn (II)-transport protein present in maternal plasma during lactation: Structural characterization and identification as histidine-rich glycoprotein. *Protein Expr Purif.* 1991;2(5-6):355-62.

7- Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials, serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry.* 1983;22(7):1621-30.

8- Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 2000;326:245-54.

9- Bakhtiari N, Amini Bayat Z, Sagharidouz S, Vaez M. Overexpression of recombinant human teriparatide, rhPTH (1-34) in *Escherichia coli*: An innovative gene fusion approach. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2017;9(1):19-22.

10- Amini Bayat Z, Shame Riz Sh. Soluble protein production methods. 1st Volume. Tehran: Iideh Negar; 2015. [Persian]

11- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2003;28(1):1-8.

12- Loughran ST, Bree RT, Walls D. Purification of polyhistidine-tagged proteins. In: Walls D, Loughran S, editors. Protein chromatography, methods in molecular biology. 1485th Volume. New York: Humana Press; 2017. pp. 275-303.

تا خوردگی مجدد فرآیندی پیچیده است و همیشه موجب برگشت ساختار صحیح به طور کامل نخواهد شد^[10]. بنابراین، در این موارد بهتر است با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در صورت امکان ژن پروتئین نوترکیب را به شکلی طراحی کرد که این دنباله‌ها در بخش بیرونی ساختار قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در تخریب شیمیایی همراه با سونیکاسیون، ۹۷/۷٪ پروتئین کل در بخش محلول وارد می‌شود و تخلیص در شرایط واسرشته برخلاف شرایط غیرواسرشته به طور مناسب و مطلوب صورت می‌گیرد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.

منابع مالی: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.

منابع

1- Harrison ST. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol Adv.* 1991;9(2):217-40.

2- Sattayasai N. Protein purification. In: Ekinci D, editor. Chemical biology. London: IntechOpen; 2012. p. 444.

3- Peternel Š. Bacterial cell disruption: A crucial step in protein production. *N Biotechnol.* 2013;30(2):250-4.

4- Peternel Š, Bele M, Gaberc-Porekar V, Menart V. Nonclassical inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microb Cell Factories.* 2006;5(Suppl 1):P23.