

Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Beta Subunit of Human TSH Protein and Evaluating its Antigenicity

Hadi Mohammadzade¹,
Behzad Khansarinejad²,
Abdolrahim Sadeghi³,
Hamid Abtahi⁴

¹ Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ Endocrinology and Metabolism Research Center, Department of Biochemistry, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

⁴ Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received June 15, 2016; Accepted October 15, 2016)

Abstract

Background and purpose: Measurement of thyroid stimulating hormone (TSH), usually through RIA and ELISA tests, is very useful for the diagnosis of thyroid disorders. Considering the structural similarity between alpha chain of TSH and the three glycoprotein hormones of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and chorionic gonadotropin (CG), in this study, we aimed to examine the produced beta-subunit of TSH (TSH β) in terms of antigenicity.

Materials and methods: In this study, human TSH β gene was synthesized using recombinant method. The cloning, expression, and purification were performed in *Escherichia coli*. Thereafter, antigenicity of the protein against antibodies against animal monoclonal TSH was evaluated using Western Blot technique.

Results: TSH β gene was cloned and expressed correctly in the bacterial host. The purified protein reacted with the specific antibody in Western Blot.

Conclusion: Although recombinant TSH β protein is different from the natural protein in some respects such as structure and spatial shape, it had acceptable antigenicity. On the other hand, it seems that this protein, due to having more TSH epitopes, can be applied in diagnostic kits to enhance the specificity of these tests.

Keywords: ELISA, molecular cloning, recombinant protein, thyroid stimulating hormone, thyrotropin beta subunit

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب زیرواحد بتای هورمون TSH انسانی (TSH β) و ارزیابی آنتی ژنیسیته آن

هادی محمدزاده^۱
بهزاد خوانساری نژاد^۲
عبدالرحیم صادقی^۳
حمید ابطی^۴

چکیده

سابقه و هدف: اندازه گیری هورمون محرک تیروئید (TSH) برای تشخیص و بررسی اختلالات تیروئیدی، بسیار مفید بوده و معمولاً از آزمون‌های RIA و ELISA برای این منظور استفاده می‌شود. با توجه به اینکه زنجیره آلفا بین TSH و سه هورمون گلیکوپروتئینی LH، FSH و CG شباهت ساختمانی زیادی وجود دارد؛ بنابراین، در پژوهش حاضر سعی بر آن است که زیرواحد بتا TSH، تولید شده و از نظر آنتی ژنیسیته مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، ژن TSH β انسانی به روش نوترکیب سنتز و مراحل کلونینگ، بیان و تخلیص در باکتری *Escherichia coli* (E.coli) انجام شد. سپس، آنتی ژنیسیته پروتئین آن با تکنیک وسترن بلات (Western Blot) علیه آنتی‌بادی‌های ضد TSH منوکلونال حیوانی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ژن TSH β ، به‌درستی در میزبان باکتریایی، کلون و بیان گردید و پروتئین خالص شده با آنتی‌بادی اختصاصی در تکنیک وسترن بلات واکنش نشان داد.

استنتاج: پروتئین TSH β نوترکیب، با وجود داشتن تفاوت‌هایی مانند ساختار و شکل فضایی با پروتئین طبیعی، آنتی ژنیسیته قابل‌قبولی داشت. از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد این پروتئین به‌دلیل داشتن اپی‌توپ‌های TSH بیشتر، قابلیت جایگزین شدن جهت استفاده در کیت‌های تشخیصی و غیره را برای افزایش اختصاصی شدن این آزمایش‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: الایزا، پروتئین نوترکیب، زیرواحد بتای تیروتروپین، کلونینگ، هورمون محرک تیروئید

مقدمه

قسمت فعال و مسئول اثرات عملکردی هورمون است؛ اما زیرواحد بتا در TSH، منحصربه‌فرد بوده و این قسمت به گیرنده هورمون در سطح سلول متصل می‌شود. شایان ذکر است که زیرواحدهای بتا در میان هورمون‌های گوناگون از نظر توالی آمینواسید تفاوت

هورمون تیروتروپین (TSH)، گلیکوپروتئینی بوده و از بخش قدامی غده هیپوفیز، سنتز و آزاد می‌شود (۱، ۲). چهار هورمون TSH، LH، FSH و CG از دو زیرواحد α (مشترک) و β (اختصاصی هر هورمون) تشکیل شده‌اند (۳-۵). زیرواحد آلفا،

Email: abtahi@araku.ac.ir

مؤلف مسئول: حمید ابطی - اراک: دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

۱. گروه زیست‌فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲. گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳. مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۲۴

دارند (۷،۶).

TRH بر TSH و برعکس می شود؛ به عبارت دیگر، T3 و T4 سبب بازخورد منفی مهاری به ترتیب بر ترشح TSH هیپوفیزی و TRH هیپوتالاموسی می گردد (۱). شایع ترین اختلال غده تیروئید، تولید غیرطبیعی هورمون های تیروئید است. اندازه گیری سطح خونی هورمون TSH در بررسی اختلالات تیروئیدی مانند کم کاری، پرکاری و غیره بسیار مفید می باشد (۱۶،۱۵). همچنین، TSH انسانی نو ترکیب می تواند جایگزین TSH انسانی هیپوفیزی شود؛ از این رو، می تواند به عنوان استاندارد و ردیاب در آزمایش های تشخیصی از جمله (RIA) (Radio Immunoassay) و IRMA (Immunoradiometric assay) به کار رود (۱۷). در پژوهش های مختلف، کارایی کلینیکی TSH نو ترکیب در تشخیص بیماری های تیروئیدی مشخص شده است و هدف اصلی استفاده از آن، پیشگیری از هیپوتیروئیدسم می باشد (۱۹،۱۸).

از آن جا که زنجیره آلفا در بین هورمون های TSH، LH، FSH و CG مترادف مشابهی دارد، ممکن است باعث ایجاد اختلال در آزمایش های تشخیصی این هورمون ها شود؛ بنابراین، در پژوهش حاضر سعی بر آن است که برای اولین بار، شکل نو ترکیب زنجیره بتا TSH، تولید شده و تخلیص گردد و در نهایت، پروتئین تولید شده از نظر آنتی ژنیسیته با شکل طبیعی آن مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

ژن، پلاسمید و سویه های باکتریایی

توالی ژن TSH β انسانی با شماره دسترسی NM_000549 از بانک ژنی NCBI به دست آمد و پس از بهینه سازی کدونی با برنامه Vector NTI (به دلیل استفاده از میزبان باکتریایی) توسط شرکت biomatic کشور کانادا در ناقل پلاسمیدی pBSK

علاوه بر این، زیرواحد آلفا در گونه های حیوانی تقریباً مترادف یکسانی دارند. این زیرواحد، ۹۲ اسید آمینه داشته و طول ژن آن در انسان ۹/۴ kb می باشد (۶). ژن hTSH β یک نسخه ژنی منحصربه فرد می باشد. این زیرواحد شامل ۱۱۸ اسید آمینه است و فرم پیش ساز آن نیز، ۱۳۸ اسید آمینه دارد که ۲۰ مورد اول آن مربوط به پپتید نشانه می باشد (۸-۱۰). سازماندهی ژن TSH β تاحدودی در میان گونه های مختلف، متفاوت است. طول ژن TSH β انسانی، ۴/۳ kb بوده و از سه اگزون و دو اینترون تشکیل شده است (۱۱،۹)؛ در حالی که وزن مولکولی توالی اسید آمینه ای زیرواحد α به همراه β در حدود ۲۸,۰۰۰ Da است و کربوهیدرات های اضافی (۱۵ درصد وزن TSH) منجر به وزن مولکولی بالاتری از آن می شود (۷،۲).

تشکیل TSH بالغ شامل چندین مرحله تغییرات پس از ترجمه می باشد که این مراحل دربرگیرنده ی خروج اسید آمینه های نشانه از هر دو زیرواحد و گلیکوزیله شدن است که به زیرواحدهای α و β اجازه باز آرای صحیح را می دهد؛ به طوری که باعث هترودايمر شدن زیرواحدها گشته و مانع از تجزیه درون سلولی می شود (۱۳،۱۲). مطالعات نشان داده اند که TSH نقش بسیار مهمی را در تحریک سنتز و آزاد سازی هورمون های تیروئیدی تیروکسین (T4) و تری یدو تیرونین (T3) ایفا کرده و به عنوان فاکتور رشد و بقای غدد تیروئید عمل می کند (۳،۱). هورمون های تیروئیدی وظیفه تنظیم مصرف انرژی، تولید گرما و تسهیل رشد در بدن را بر عهده دارند (۱۴). علاوه بر این، TRH (-Thyrotropin-releasing hormone) عمده ترین محرک سنتز و ترشح TSH می باشد و کاهش سطح هورمون های تیروئید سبب افزایش تولید پایه ای TSH و تشدید اثر تحریکی

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش

توالی پرایمر	توضیحات
5'-AGC AAG CTT TTT TGC ATT CCG-3'	پرایمر رفت حاوی جایگاه برشی آنزیم Hind III
5'-TTA CTC GAG CAC GCT AAA GCC CAC-3'	پرایمر برگشت حاوی جایگاه برشی آنزیم Xho I

تکثیر داده شد تا از ناقل قبلی (pBSK) خارج شده و آماده ورود به ناقل جدید (پلاسمید pET32a) گردد و همچنین، میزان آن افزایش یابد. پرایمرهای رفت و برگشت برای ناحیه کدکننده قطعه ژنی TSH β (۳۵۴ bp) نیز، به کمک نرم‌افزار AlleleID 6 طراحی گردیدند (جدول شماره ۱). شایان ذکر است که پرایمر جلو دارای ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم HindIII می‌باشد و پرایمر عقب نیز از ترادف لازم برای شناسایی و برش توسط آنزیم XhoI برخوردار می‌باشد.

علاوه بر این، برای انجام PCR از تخلیص پلاسمید به‌عنوان الگو استفاده شد و دمای واسرشتگی معادل ۹۴°C، دمای اتصال معادل ۵۲°C و دمای تکثیر ژن معادل ۷۲°C تنظیم گردید. مدت زمان لحاظ شده برای هر مرحله PCR نیز برابر با یک دقیقه در نظر گرفته شد. همچنین، برای تعیین مناسب‌ترین غلظت منیزیم، واکنش PCR در سه غلظت ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ mM صورت گرفت. ذکر این نکته ضرورت دارد که حجم کلی واکنش معادل ۲۵ μ l بود و محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

کلون کردن ژن در میزبان تکثیری

برای تخلیص قطعات ژنی، کل محصول PCR در یک چاهک بزرگ قرار داده شد و تخلیص توسط کیت شرکت Roch ساخت کشور آلمان صورت گرفت. به‌منظور هضم آنزیمی قطعات ژنی و ناقل

سنتر گردید.

در این پژوهش، میزبان باکتریایی *E. coli* بود که برای کلونینگ اولیه و تکثیر پلاسمید از سویه DH5 α و بیان از سویه BL21(DE3)pLysS استفاده گردید که هر دو سویه از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شدند. همچنین، از پلاسمید pET32a (شرکت Novagen ساخت کشور آمریکا) به‌عنوان ناقل کلونینگ و بیانی استفاده گردید.

شایان ذکر است که کلیه مواد شیمیایی به کار رفته در ساخت بافرها، محلول‌ها و سایر مراحل از شرکت‌های Merck و Roch ساخت کشور آلمان و آنزیم‌ها نیز، از شرکت‌های Fermentas ساخت کشور لیتوانی و سیناژن ساخت کشور ایران فراهم شدند.

کلون کردن اولیه

سلول‌های مستعد *E. coli* DH5 α به روش کلرید کلسیم- کلرید منیزیم ساخته شدند. کشت باکتری‌ها در محیط Luria-Bertani (LB) صورت گرفت و در طول موج ۶۰۰ nm با OD=۰/۴، انکوباسیون پایان یافت و باکتری‌ها وارد فرآیند مستعدسازی شدند. همچنین، ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدی pBSK حاوی TSH به سلول‌های DH5 α مستعد صورت گرفت و باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار حاوی Amp (پلاسمید pBSK به آمپی‌سیلین مقاوم است) کشت داده شدند و تخلیص پلاسمید از این باکتری‌ها به شیوه mini-preparation انجام گرفت و در ادامه، پلاسمیدهای تخلیص شده از نظر کیفی و کمی بررسی گردیدند. بدین‌منظور، از روش الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروسکوپی استفاده شد (۲۰).

تکثیر ژن TSH β با واکنش PCR

برای ادامه کار، قطعه TSH β با واکنش PCR

تخلیص پروتئین نوترکیب

در این پژوهش به دلیل وجود دنباله هیستیدینی (6His.tag) در پروتئین بیان شده که توسط وکتور بیانی pET-32a اضافه شده است، تخلیص آن توسط کیت (Ni-NTA agarose resin) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen)، ساخت کشور آمریکا) براساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت. میزان پروتئین خالص شده نیز با استفاده از روش بردفورد (Bradford) اندازه گیری گردید و کیفیت آن از طریق ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید ۱۲ درصد (SDS-PAGE) بررسی شد.

بررسی آنتی ژنیسیته با تکنیک وسترن بلات

در این قسمت، پروتئین تخلیص شده به همراه مارکر پروتئینی در ژل عمودی الکتروفورز گردید و انتقال باندهای پروتئینی از ژل پلی اکریل آمید به غشای PVDF، طی ۲ ساعت صورت گرفت. سپس، غشای PVDF با رنگ پانسو اس، رنگ آمیزی گشت و توسط بافر شستشو داده شد. پس از بلوکه کردن غشا، PVDF به مدت ۲ ساعت با آنتی بادی Anti-TSH کونژوگه با آنزیم HRP و رقت ۱:۱۰۰ انکوبه گشت و در روتاتور قرار گرفت. قابل ذکر است که این آنتی بادی ها، منوکلونال موشی و اهدایی شرکت پادتن گستر ساوه بودند. در مرحله آخر نیز، غشاهای PVDF در سوبسترای DAB تازه منتقل شد و با اعمال تاریکی محیط، به لحاظ وجود باندهای پروتئینی مورد نظر بررسی گردید.

یافته ها

تکثیر ژن TSHβ

در واکنش PCR در هر سه غلظت منیزیم، باند قطعه با اندازه ۳۵۴ bp دیده شد که در غلظت منیزیم ۰/۷۵ mM، باند بهتری در ژل وجود داشت (تصویر شماره ۱).

pET32a نیز، از روش هضم آنزیمی استفاده گردید. در ادامه، قطعه TSHβ و پلاسمید pET32a با آنزیم های Hind III و Xho I برش خورد و اتصال ژن TSHβ به pET32a با استفاده از آنزیم لیگاز T4 انجام شد. سپس، پلاسمیدهای متصل شده به قطعات ژنی، به باکتری DH5α ترانسفورم گردید.

کلون کردن ژن در میزبان بیانی

برای بیان پروتئین، ابتدا پلاسمید pET32a حاوی ژن TSHβ به درون باکتری *E.coli BL21 (DE3) pLysS* مستعد، ترانسفورم گردید و باکتری های ترانسفورم شده در محیط نوترینت آگار حاوی آمپی سیلین و کلرامفنیکل کشت داده شدند.

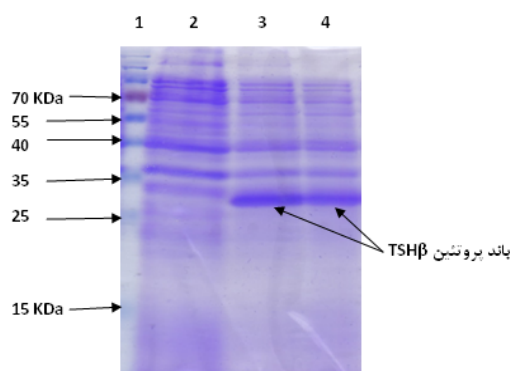
القای بیان پروتئین

جهت القا نیز، از محیط القا با ترکیب yeast extract ۱۴ g، Bactotryptone ۱۲ g، NaCl ۱۰ g، KCl ۱ g، MgCl₂ ۰/۵ g و CaCl₂ ۰/۵ g استفاده شد. پس از افزودن دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۳۵ μg/ml) و کلرامفنیکل (۳۴ μg/ml)، میزان ۵۰۰ μl از باکتری کشت یافته به ۱۰۰ ml محیط القا افزوده گشت و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ °C و ۲۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از این که تعداد باکتری ها به حد مناسب رسید (OD₆₀₀= ۰/۶) از محلول ۱ M IPTG (Isopropyl-β-Dthiogalactopyranoside) جهت القای بیان پروتئین به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به ۱ mM برسد.

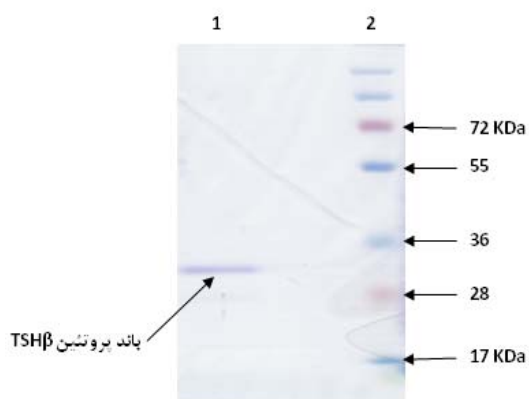
سپس ۲، ۴ و ۶ ساعت بعد از القا، نمونه ها برداشته شد و رسوب باکتری ها تهیه گردید. در ادامه، نمونه های قبل و بعد از القا به همراه مارکر پروتئینی و با استفاده از الکتروفورز عمودی بر روی ژل ۱۲ درصد پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) بررسی شدند.

تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب

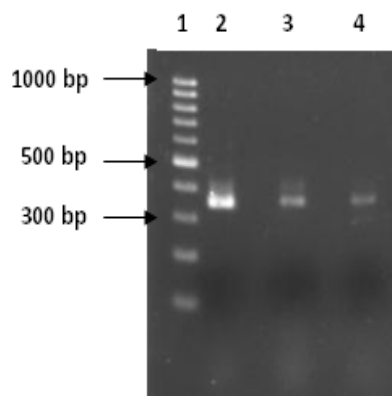
پروتئین نوترکیب TSH β پس از گذشت ۴ ساعت از القا با IPTG تولید گردید که وزن پروتئین تولیدشده در حدود ۳۰ KDa بود. نتیجه القای پروتئین TSH β در تصویر شماره ۳ آمده است. خالص‌سازی پروتئین TSH β نیز با استفاده از کیت Ni-NTA و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (تصویر شماره ۴) ذکر این نکته ضرورت دارد که غلظت پروتئین تخلیص شده در محلول برابر با ۲۰۰ mg/ml بود.



تصویر شماره ۳: نتیجه القای بیان پروتئین TSH β روی ژل عمودی چاهک شماره ۱: مارکر پروتئینی؛ چاهک شماره ۲: نمونه قبل از القا؛ چاهک شماره ۳: نمونه بعد از ۲ ساعت القا؛ چاهک شماره ۴: نمونه بعد از ۴ ساعت القا



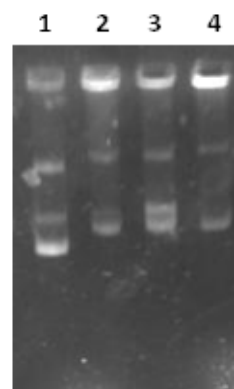
تصویر شماره ۴: نتیجه تخلیص پروتئین TSH β روی ژل عمودی چاهک شماره ۱: نمونه تخلیص پروتئین؛ چاهک شماره ۲: مارکر پروتئینی



تصویر شماره ۱: نتیجه PCR قطعه TSH β روی ژل افقی چاهک شماره ۱: نشانگر DNA؛ چاهک‌های شماره ۲، ۳ و ۴: محصول PCR به ترتیب با غلظت‌های منیزیم ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ mM

کلون کردن ژن در ناقل بیانی

کلون کردن ژن در ناقل بیانی pET32a صورت گرفت. ترانسفورماسیون pET32a + TSH β به باکتری‌های مستعد DH5 α موفقیت‌آمیز بود و جهت تأیید، تخلیص پلاسمید انجام شد. شایان ذکر است که پلاسمیدهای حاوی قطعه ژنی به علت سنگین‌تر شدن، حرکت کندتری داشته و بالاتر از پلاسمید pET32a کنترل بر روی ژل قرار می‌گیرند (تصویر شماره ۲).



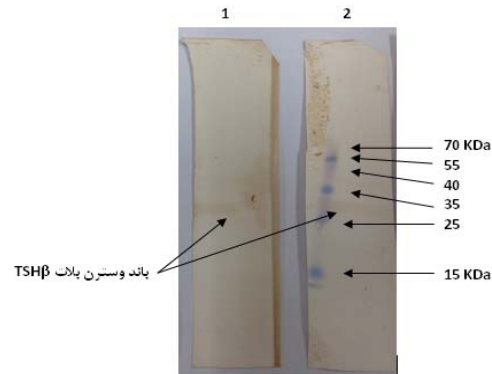
تصویر شماره ۲: نتیجه تخلیص پلاسمید pET32a حاوی قطعه روی ژل افقی

چاهک شماره ۱: pET32a دست‌نخورده؛ چاهک‌های شماره ۲، ۳ و ۴: تخلیص پلاسمید pET32a + TSH β

هدف از این پژوهش، تولید نوترکیب زنجیره بتا و بررسی آنتی ژنیسته آن بود. به همین منظور، TSH نوترکیب انسانی برای تهیه استاندارد ثانویه در RIA و IRMA جهت بررسی کلینیکی، آزمایش گردید و مشخص شد که hTSH نوترکیب با تمام اتصالات و معیارهای کروماتوگرافی که در hTSH هیپوفیزی وجود دارد، مطابقت داشته و هیچ نوع خطای چشمگیری را حین استفاده در اندازه گیری نمونه های سرمی نامعلوم ایجاد نمی کند؛ بنابراین، hTSH نوترکیب می تواند به طور کامل جایگزین hTSH هیپوفیزی شود و به عنوان استاندارد و همچنین ردیاب در تشخیص *In vitro* مانند RIA، ELISA و IRMA مورد استفاده قرار گیرد (این امر پیشنهاد می کند که سایر هورمون های نوترکیب نیز می توانند برای تهیه معرف جهت ایمنواسی به کار روند) (۱۷).

ذکر این نکته ضرورت دارد که بیان ژن های انسانی در *E. coli* به دلیل تفاوت زیاد میان ترکیب کدون های غالب انسان و *E. coli* و نیز تشکیل انکلوژن بادی در پروتئین نوترکیب به دلیل وجود پیوندهای دی سولفیدی داخلی، به میزان پایینی بوده است (۲۱، ۲۲). در پژوهش حاضر جهت غلبه بر این مشکل، بهینه سازی کدونی و طراحی ژن TSH β توسط نرم افزار Vector NTI انجام شد. همچنین، به دلیل وجود دنباله هیسیتیدینی (6His.tag) در انتهای آمینی پروتئین بیان شده که توسط ناقل بیانی pET32a اضافه گردید، تخلیص آن توسط رزین نیکل (Ni-NTA) و براساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت (۲۳).

علاوه بر این، تولید پروتئین TSH β در میزبان باکتریایی بهینه گردید و برای کلونینگ و بیان، تنها از میزبان باکتریایی استفاده گردید؛ بنابراین، گلیکوزیلاسیون و تشکیل باندهای دی سولفیدی در پروتئین نوترکیب، انجام نشد و شکل فضایی آن متفاوت خواهد بود؛ به گونه ای که می توان گفت تنها در داشتن ساختار اسید آمینه ای و برخی ای پی توپ های خطی با پروتئین های طبیعی یا نوترکیب



تصویر شماره ۵: نتیجه وسترن بلات پروتئین TSH β روی کاغذ PVDF
ستون ۱: نمونه پروتئینی TSH β ؛ ستون ۲: مارکر پروتئینی به همراه نمونه پروتئینی

بررسی آنتی ژنیسته

براساس نتایج به دست آمده، نمونه پروتئینی خالص شده با آنتی بادی اختصاصی در کاغذ نیتروسولولز واکنش نشان داد و باند مربوط به آن در محدوده مورد نظر روی غشای PVDF تشکیل شد (تصویر شماره ۵).

بحث

اندازه گیری سطح خونی هورمون TSH در بررسی اختلالات تیروئیدی مانند کم کاری، پرکاری و غیره، بسیار مفید می باشد. قابل توجه است که بیماری های تیروئیدی، شیوع متوسط تا نسبتاً زیادی در جامعه دارند و تعداد اندکی از آن ها بیماری نادر محسوب می شوند.

TSH به وسیله آزمون های بسیار حساس (ایمنو-رادایومتریک و الایزا) اندازه گیری می شود و به طور معمول برای سنجش آن از TSH انسانی استفاده می گردد و با توجه به تولید اندک این هورمون در غده هیپوفیز، بیشترین تمرکز بر تولید نوترکیب آن با استفاده از میزبان های باکتری می باشد. شایان ذکر است که در آزمایش های اندازه گیری TSH از کل پروتئین آن استفاده می شود. با توجه به شباهت ترادف آلفا در هورمون های TSH، LH، FSH و CG، امکان کسب نتایج کاذب وجود دارد.

یوکاریوتی مشابهت دارد. مطالعات مختلف نشان می‌دهند که زنجیره‌های اولیگوساکاریدی که پس از تولید این هورمون در انسان به زنجیره پروتئینی افزوده می‌شود، برای فعالیت هورمون لازم می‌باشد؛ اما TSH دگلیکوزیله، هیچ تفاوتی در فعالیت اتصال به گیرنده نشان نمی‌دهد (۲۴،۴). به طور کلی، قسمت کربوهیدراتی TSH β در شناسایی اپی‌توپ با آنتی‌بادی‌های منوکلونال نقشی نداشته و یا نقش کمی دارد؛ در حالی که تمامیت باندهای دی‌سولفیدی حیاتی هستند. همچنین، نتایج مطالعات ELISA نشان داده‌اند که عدم کاهش یا کاهش اندک در اتصال این آنتی‌بادی‌های منوکلونال به هورمون دگلیکوزیله نسبت به هورمون TSH طبیعی دیده می‌شود و تأثیر کربوهیدرات، تنها زمانی رخ می‌دهد که دایمر این زیرواحدها تشکیل شود (۲۶،۲۵،۵).

با این وجود، در پژوهش حاضر ژن TSH β ، کلونینگ، بیان و تخلیص موفقیت‌آمیزی در میزان باکتریایی داشت. همچنین، به لحاظ اندازه ژنی و پروتئینی با نمونه‌های طبیعی مطابقت داشت و در بررسی آنتی‌ژنیسیته نیز، واکنش خوبی را با آنتی‌بادی‌های ضد TSH منوکلونال موشی نشان داد؛ بنابراین، این موضوع با یافته‌های مطالعات قبلی مبنی بر دخیل‌نبودن اسید سیالیک و دیگر ساختارهای کربوهیدراتی در آنتی‌ژنیسیته این پروتئین هماهنگ می‌باشد. از سوی دیگر، به نظر می‌رسد که پروتئین TSH β می‌تواند آنتی‌ژنیسیته‌ای در حد TSH را از خودش نشان دهد و این طور استنباط می‌شود که بیشتر اپی‌توپ‌های مورد نیاز برای واکنشی قابل قبول با آنتی‌بادی‌های ضد TSH، در زیرواحد بتای TSH قرار گرفته‌اند؛ بدین معنا که احتمالاً می‌توان به جای استفاده از TSH در کیت‌های تشخیصی، از

TSH β استفاده کرد که در این صورت، احتمال واکنش متقاطع با هورمون‌های LH، FSH و CG در این کیت‌ها به کمترین حد ممکن می‌رسد؛ بدین معنا که اختصاصی بودن آزمایش بالاتر می‌رود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین TSH β به روش نو ترکیب تولید می‌گردد و از نظر آنتی‌ژنیسیته، مشابه با فرم طبیعی آن می‌باشد. در مجموع، می‌توان گفت با اینکه کلون‌سازی و بیان پروتئین TSH β در *E. coli* موفقیت‌آمیز بود و در بررسی آنتی‌ژنیسیته این پروتئین، آزمایش وسترن بلات با آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی نیز نتیجه مطلوبی داشت؛ اما استفاده از این پروتئین‌های نو ترکیب در کیت‌های تشخیصی الایزا به‌عنوان استاندارد یا کنترل و یا حتی تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه TSH و نیز استفاده از این آنتی‌بادی‌ها در کیت، نیازمند تحقیقات دیگری جهت همسان‌سازی حداکثری این پروتئین با نوع طبیعی آن در بدن جاندار به‌لحاظ ساختار، حضور باندهای دی‌سولفیدی، شکل فضایی، شاخص‌های آنتی‌ژنیک و غیره می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه هادی محمدزاده، دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی می‌باشد که با کد ۱۰۹۶ در معاونت تحقیقات دانشگاه اراک تصویب و با پشتیبانی مالی آن معاونت انجام شده است؛ بنابراین، بدین وسیله از معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی مالی و نیز کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری رسانده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

- Shupnik M A, Ridgway E C, Chin W W. Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev.* 1989; 10(4): 459-475.
- Hall R, Smith B R, Mukhtar E D. Thyroid stimulators in health and disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1975; 4(2): 213-230.

3. Ryan R J, Charlesworth M C, McCormick D J, Milius R P, Keutmann H T. The glycoprotein hormones: Recent studies of structure-function relationships. *FASEB J*. 1988; 2(11): 2661-2669.
4. Emerson CH, Torres M S. Recombinant human thyroid-stimulating hormone: Pharmacology, clinical applications and potential uses. *Bio Drugs*. 2003; 17(1): 19-38.
5. Fairlie W D, Stanton P G, Hearn M T. Immunochemical characterization of two thyroid-stimulating hormone beta-subunit epitopes. *Biochem J*. 1995; 308(Pt 1): 203-210.
6. Fiddes J C, Goodman H M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet*. 1981; 1(1): 3-18.
7. Magner J A. Thyroid-stimulating hormone: Biosynthesis, cell biology, and bioactivity. *Endocr Rev*. 1990; 11(2): 354-5.
8. Hayashizaki Y, Miyai K, Kato K, Matsubara K. Molecular cloning of the human thyrotropin-beta subunit gene. *FEBS letters*. 1985; 188(2): 394-400.
9. Guidon P T Jr, Whitfield G K, Porti D, Kourides I A. The human thyrotropin beta-subunit gene differs in 5' structure from murine TSH-beta genes. *DNA*. 1988; 7(10): 691-9.
10. Gordon D F, Wood W M, Ridgway E C. Organization and nucleotide sequence of the gene encoding the beta-subunit of murine thyrotropin. *DNA*. 1988; 7(1): 17-26.
11. Wondisford F E, Radovick S, Moates J M, Usala S J, Weintraub B D. Isolation and characterization of the human thyrotropin beta-subunit gene. Differences in gene structure and promoter function from murine species. *J Biol Chem*. 1988; 263(25): 12538-12542.
12. Weintraub B D, Wondisford F E, Farr E A, Steinfeld H J, Radovick S, Gesundheit N, et al. Pre-translational and post-translational regulation of TSH: Relationship to bioactivity. *Horm Metab Res Suppl*. 1990; 23: 9-11.
13. Stockell Hartree A, Renwick A G. Molecular structures of glycoprotein hormones and functions of their carbohydrate components. *Biochem J*. 1992; 287(Pt 3): 665-679.
14. Zhang J, Lazar M A. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62: 439-466.
15. Bayer M F. Effective laboratory evaluation of thyroid status. *Med Clin North Am*. 1991; 75(1): 1-26.
16. Surks M I, Chopra I J, Mariash C N, Nicoloff J T, Solomon D H. American thyroid association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders. *JAMA*. 1990; 263(11): 1529-1532.
17. Ribela M, Bianco A C, Bartolini P. The use of recombinant human thyrotropin produced by Chinese hamster ovary cells for the preparation of immunoassay reagents. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81(1): 249-56.
18. Schlumberger M, Ricard M, Pacini F. Clinical use of recombinant human TSH in thyroid cancer patients. *Eur J Endocrinol*. 2000; 143(5): 557-563.
19. Baluja Conde I B, Brito Moreno A I, Amores Sánchez I, Acosta Bas C. Production and characterization of specific monoclonal antibodies of the human thyroid stimulating hormone. *Hybridoma*. 2000; 19(4): 335-338.

20. Hasanzadeh L, Ghaznavi-Rad E, Soufian S, Farjadi V, Abtahi H. Expression and antigenic evaluation of VacA antigenic fragment of helicobacter pylori. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(7): 835-840.
21. Sahdev S, Khattar S K, Saini K S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem.* 2008; 307(1-2): 249-264.
22. Molaee N, Abtahi H, Mosayebi G. Expression of recombinant streptokinase from streptococcus pyogenes and its reaction with infected human and murine sera. *Iran J Basic Med Sci.* 2013; 16(9): 985-989.
23. Farjadi V, Abtahi H, Zolfaghari M R, Soufian S, Hasanzadeh L. Expression, purification and evaluation of antigenicity of CagA antigenic fragment of helicobacter pylori. *Jundishapur Journal of Microbiology.* 2013; 6(9): e7367.
24. Thotakura N R, Desai R K, Szkudlinski M W, Weintraub B D. The role of the oligosaccharide chains of thyrotropin alpha- and beta-subunits in hormone action. *Endocrinology.* 1992; 131(1): 82-88.
25. Thotakura N R, LiCalzi L, Weintraub B D. The role of carbohydrate in thyrotropin action assessed by a novel approach using enzymatic deglycosylation. *J Biol Chem.* 1990; 265(20): 11527-11534.
26. Benkirane M M, Bon D, Costagliola S, Paolucci F, Darbouret B, Prince P, et al. Monoclonal antibody mapping of the antigenic surface of human thyrotropin and its subunits. *Endocrinology.* 1987; 121(3): 1171-1177.