تحقیقی

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 به‌صورت محلول انجام شد. بعد از ترانسفورم کردن سازه ژنی داخل باکتری و کشت باکتری اشریشیاکلی، استخراج پلاسمید انجام شد. قطعه کدکننده 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.*

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

نتیجه‌گیری : *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 پایین دستی تولید پروتئین نوترکیب گردید.*

کلید واژه‌ها : *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 ۳۲۳۵۱۷۳۵-۰۱۷

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

مقدمه

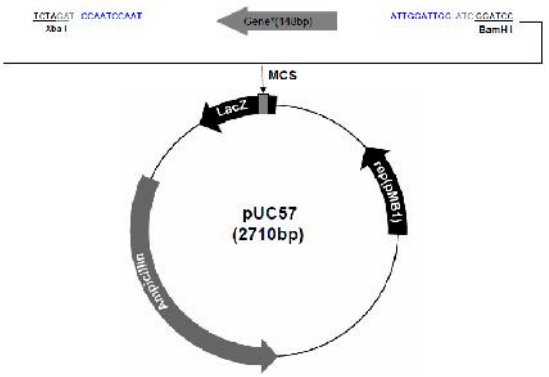
سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۱ بیماری پوکی استخوان را به عنوان چهارمین عامل تهدیدکننده زندگی انسان، پس از سرطان، سکته قلبی و سکته مغزی اعلام کرد (۱). پوکی استخوان یک بیماری بدون علامت همراه با کاهش تراکم بافت استخوانی است که با افزایش خطر شکستگی همراه بوده و به‌عنوان یک بیماری وابسته به سن در نظر گرفته می‌شود. این بیماری نه‌تنها 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 و۶ اسیدآمینه دیگر آن نیز در دستگاه گلژی از این پروتئین جدا شده و در نهایت با ۸۴ اسیدآمینه از سلول‌های پاراتیروئید ترشح می‌شود (۲و۳). ۳۴ اسیدآمینه اول در 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 کینازC 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

میمون‌های دارای پوکی استخوان شده است (۸و۹). 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 بیس‌فسفونات‌ها، کلسی‌تونین، استروژن، تنظیم کننده‌های گیرنده‌های استروژن و دنوسوماب روند تحلیل استخوان را کند و یا متوقف می‌کنند. دسته دیگر، داروهایی هستندکه روند ساخته شدن استخوان را افزایش می‌دهند. از این دسته در حال حاضر نوعی از هورمون پاراتیروئید به‌نام تری پاراتید (هورمون پاراتیروئید نوترکیب انسانی) تولید و توسط سازمان غذا و داروی امریکا مورد تایید قرار گرفته است (۱۰و۱۱). برای تولید هورمون از طریق فن‌آوری DNA نوترکیب تلاش‌های بسیار زیادی شده است که سیستم‌های بیانی مورد استفاده از جمله باکتری *اشریشیاکلی*، مخمر و سلول پستانداران نمونه‌هایی از آن است. باکتری *اشریشیاکلی* به‌طور گسترده‌ای برای سنتز پلی پپتید 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 rhPTH، 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 (۱۲و۱۳). 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 به‌صورت محلول انجام شد.

ابتدا سکانس توالی موردنظر (AC: NM_000315.2) از سایت Gene Bank انتخاب شد. برای بیان مناسب در باکتری *اشریشیاکلی*، تغییرات لازم در سطح سکانس داه شد. سپس توالی مذکور به همراه وکتور PUC 57 به‌صورت لئوفیلیزه 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 از بررسی سکانس توسط سایت Web cuter 2.0 و تعیین آنزیم‌های برشی، آنزیم‌های MCS1 و BamH1 از شرکت New England Biolabs (R3136s # R0534s) خریداری شد. پرایمر T7 پروموتور با توالی 5 F:-TAATACGACTCACTATAGGG-3 و R :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 لیوفیلیزه به صورت محلول درآمد. برای این کار ابتدا آن را به مدت یک دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد حرارت داده شد تا DNA حل شود. با توجه به میزان خلوص پلاسمید، برای هر ترانسفورماسیون به میزان ۱۰۰-۱۰ 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 سانتی‌گراد استوک کردیم.

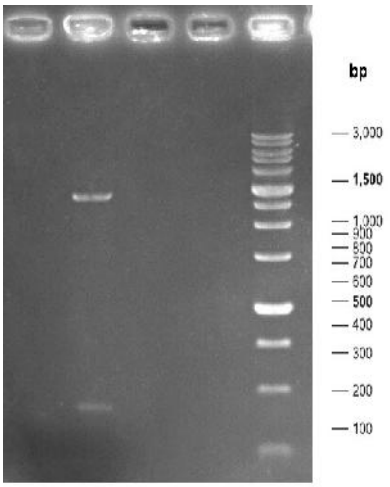
مستعد کردن باکتری: پس از کشت باکتری DH5آلفا روی پلیت، یک کلنی از باکتری را در ۱۰ میلی‌لیتر محیط لوریال بریتانی (LB) کشت و به صورت شبانه در انکوباتور شیکردار با ۱۸۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. محیط کشت فوق به یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر LB منتقل گردید و در انکوباتور شیکردار (۱۸۰rpm) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

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

ترانسفورماسیون: برای ترانسفورم کردن ۴۰۰ میکرولیتر از باکتری DH5 آلفا مستعد و ۳ میکرولیتر از وکتور موردنظر را به آرامی ترکیب نمودیم و به‌مدت ۳۰ دقیقه آن را روی یخ انکوبه کردیم. سپس مخلوط فوق به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی داده شد و بلافاصله به مدت ۳-۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. به این ترتیب پلاسمید نوترکیب وارد باکتری گردید. ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از محصول فوق (سلول‌های ترانسفورم شده) به پلیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک حاوی آمپی‌سیلین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر انتقال داده شد. پلیت‌ها به طور شبانه (۱۸-۱۶ ساعت) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب 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، به‌دلیل وجود آنتی‌بیوتیک رشد ننمود.

استخراج پلاسمید: مقدار ۱۰میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین درون یک لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس از پلیت حاوی کشت باکتری‌های ترانسفورم شده تک کلنی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از کشت شبانه (۱۸-۱۶ساعت) باکتری‌های ترانسفورم شده عمل رسوب‌گیری با ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. سپس استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی به‌صورت دستی انجام گردید.

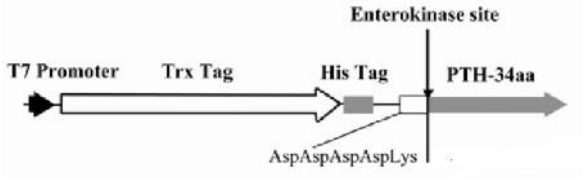
هضم آنزیمی: برش وکتور PUC 57 حاوی ژن موردنظر توسط آنزیم‌های BmH1 و Mcs1 با پروتکل ارایه شده توسط شرکت NEB انجام شد. به همین منظور برش آنزیمی به صورت double digestion با استفاده همزمان از دو آنزیم انجام شد و محصول (ladder cat no : pr911653) بر روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد run گردید (شکل ۲). پس از مشاهده باند مربوطه، سکانس موردنظر با کیت استخراج شرکت کیاژن (cat no: 28604) از ژل استخراج شد.



شکل ۲ : برش وکتور puc57 توسط آنزیم‌های برشی Msc1 و BamH1

ساخت سازه ژنی: ابتدا وکتور PET-32a توسط آنزیم‌های مذکور برش داده شد و به سکانس حاصل از استخراج ژل توسط کیت T4 DNA Ligase (Cat:M0202T) از شرکت NEB، اتصال یافت. نحوه محاسبه میزان ژن موردنظر و وکتور برای اتصال به یکدیگر به‌صورت 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 آمپی‌سیلین به‌صورت شبانه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 به‌صورت 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 سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از آن عمل رسوب‌گیری با ۱۰۰۰۰rpm به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد که ۱۰ میکرولیتر از محلول رویی هر میکروتیوب برای PCR برداشته شد. مواد و برنامه داده شده برای انجام PCR

در زیر آمده است.

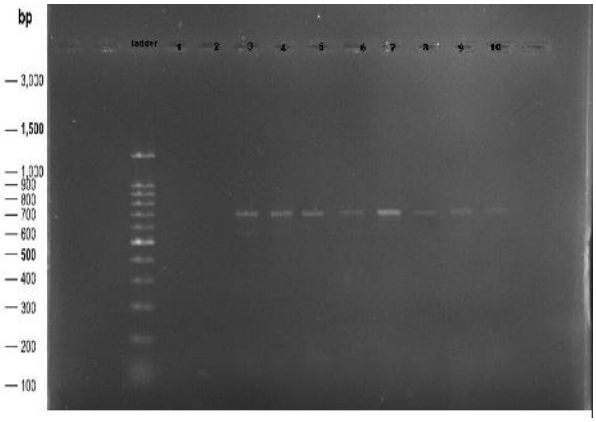
10X PCR buffer	2.5 µl
dNTP (10 mM)	0.5 µl
Mgcl2 (50 Mm)	0.75 µl
Taq DNA polymerase	0.5 µl
Primer forward	0.5 µl
Primer reverse	0.5 µl
Template DNA(30ng/µl)	5 µl
ddH2o	15µl

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

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

یافته‌ها

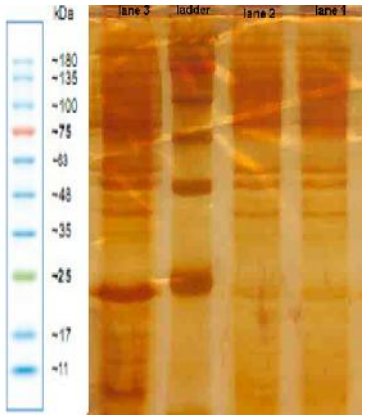
تصویر حاصل از PCR که در شکل ۳ آمده است. در این تصویر چاهک شماره یک و دو به عنوان کنترل منفی PCR و باکتری بدون وکتور هستند که طبق انتظار ما فاقد باند در ناحیه مورد نظر هستند. مابقی آن باند مربوط به قطعه متصل شده به وکتور است که طول آن در مجموع به ۷۰۰bp رسید.



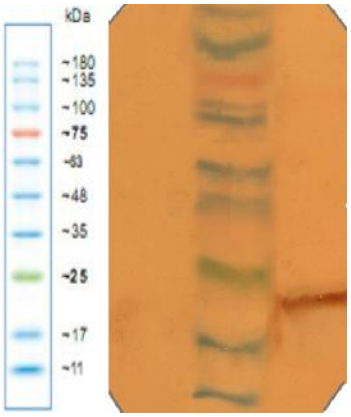
شکل ۳ : تصویر PCR که نشان دهنده اتصال صحیح قطعه کدکننده است.
چاهک شماره یک به عنوان کنترل منفی PCR، چاهک شماره دو مربوط به باکتری بدون وکتور، سایر چاهک‌ها مربوط به باکتری‌هایی است که دارای وکتور نوترکیب هستند که بر طبق انتظار ما باند در ناحیه ۷۰۰ bp نشان دهنده اتصال صحیح قطعه مورد نظر است.

بیان پروتئین: پس از تایید حضور سکانس موردنظر در درون وکتور، از پلیت حاوی باکتری ترانسفورم تک کلونی انتخاب شد و به ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آمپی‌سیلین انتقال یافت. کشت شبانه در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱۸۰ rpm انجام شد. سپس محیط مذکور به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط SOC (Super Optimal broth with Catabolic represso) انتقال یافت. پس از ۵ ساعت با رسیدن OD به ۰/۸ عمل القا با IPTG یک میلی‌مولار (غلظت نهایی) انجام گردید.

SDS-PAGE : بعد از نمونه‌گیری 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 سانتی‌گراد در بن ماری قرار گرفت. سپس عمل رسوب‌گیری به‌مدت ۱۵ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ rpm انجام شد. با توجه به این که وزن پروتئین موردنظر ما حدود ۲۳ کیلو دالتون بود؛ لذا از ژل ۵درصد 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 رنگ‌آمیزی 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 ٤ : رنگ‌آمیزی نیترات نقره را نشان می‌دهد.
چاهک های اول دوم: کنترل منفی بیان پروتئین، چاهک سوم: بیان پروتئین نوترکیب است که باند آن در ناحیه ۲٤ کیلودالتون قابل مشاهده است.



شکل ٥ : تصویر مربوط به وسترن بلات
وجود باند در ناحیه ۲٤ کیلودالتون و تایید بیان هورمون پاراتیروئید

وسترن بلات: در این روش باندهای پروتئینی الکتروفورز شده روی ژل آکریل، به یک غشاء با قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین (مانند نیتروسلولز) 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، ازآنتی‌بادی 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) تائید 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 *اشریشیاکلی* است (۱۴). باکتری دارای رشد سریع و محیط کشت ارزان است؛ لذا به عنوان میزبان مناسب برای تولید پروتئین نوترکیب در نظر گرفته می‌شود (۱۵). تولید پروتئین نوترکیب می‌تواند به‌صورت محلول و یا به‌صورت اینکلوژن بادی باشد (۱۶). زمانی که پروتئین نوترکیب به‌صورت انکلوژن بادی در باکتری تولید می‌شود؛ در ابتدا بایستی به صورت 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 پایین دستی بسیار مشکل و پرهزینه است (۱۶و۱۷). از طرفی پیش‌بینی شکل صحیح تاخوردگی انکلوژن بادی تولید شده در فرایند رناتوراسیون غیرممکن است (۱۸و۱۹). 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 اشاره می‌گردد. کاهش دمای محیط کشت باکتری یکی از این روش‌ها است (۲۱و۲۲). 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 (۲۳و۲۴). استفاده از چاپرون‌های مولکولی یکی دیگر از روش‌هایی است که می‌توان از آنها برای تولید پروتئین نوترکیب به شکل محلول استفاده کرد (۲۵و۲۶). یکی از بهترین روش‌ها بری رسیدن به هدف مذکور، تولید پروتئین نوترکیب به‌صورت فیوژن به همراه تگ است. سه تا از تگ‌هایی که در این روش استفاده می‌شود شامل MBP، NusA و trx است. تگ‌های مذکور علاوه بر محلول کردن پروتئین، باعث پایداری پروتئین در فضای سیتوپلاسمیک باکتری می‌شوند (۲۷و۲۸). 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 پایین 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 وفناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر تامین هزینه این پروژه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

8. 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, gloshedobin, 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, Deuerling 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]

[1]M.Sc Student in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical SciencesTechnologies, Golestan University of Medical Sience, Gorgan, Iran. [2]Assistant Professor, Food and Drug Organization, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Head of Cellular and Molecular Research, Center of Taleghani Hospital, Golesatn 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 contining 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 hormon 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

Cite this article as: Aghajani MH, Tahzibi A, Shahbazi M. [Cloning and expression soluble recombinant parathyroid hormone in *E. coli*]. J Gorgan Uni Med Sci. 2016; 17(4): 112-118. [Article in Persian]