مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره چهارم (پیاپی ۴۱) زمستان ۱۳۹۸
صفحات ۳۵۴-۳۴۳

Original Article

خالص سازی هورمون رشد انسانی تولید شده به شکل محلول از سویه نوترکیب *اشریشیاکلی* در مقیاس آزمایشگاهی

سید مرتضی رباط جزی*[۱]، سید محمد حسن‌پور متی‌کلایی [۲]، ولی ا... بابایی پور[۳]، حمیده روحانی نژاد[۴]

[۱] استادیار، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی،تهران، گروه مهندسی بیوشیمی
۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی،تهران، گروه مهندسی بیوشیمی
۳ دانشیار، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی،تهران، گروه مهندسی بیوشیمی
٤ استادیار، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی،تهران، گروه علوم زیستی

چکیده

سابقه و هدف: هورمون رشد انسانی یا سوماتوتروپین یک پلی پپتید تک زنجیره ای با وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون دارای ۱۹۱ واحد آمینو اسیدی است. هدف از این پژوهش، ارزیابی تولید و خالص سازی فرم محلول هورمون رشد انسانی نوترکیب در مقیاس آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق از باکتری *اشریشیا کلی* حاوی پلاسمید pET32a(+)-Trx-His6-hGH استفاده شد. به منظور دست یابی به میزان بالای تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در محیط سیتوپلاسم به شکل محلول از برچسب Trx و برای خالص سازی از برچسب هیستیدینی استفاده شد. باکتری در محیط LB و TB در دمای ۲۵ درجه سلسیوس رشد داده شد. فرایند خالص سازی بر اساس روش کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ژل Ni-NTA انجام گردید.

یافته ها: نتیجه آنالیز ژل الکتروفورز بیان ۵۵ ٪ هورمون رشد نوترکیب را نشان داد که تقریبا ۳۳/۷ ٪ تولید آن به شکل محلول و ۱۸/۸٪ آن به شکل نامحلول بود. میزان فیوژن پروتین هورمون رشد انسانی حاصل از تخلیص g1 رسوب سلولی ۲۲/٤ میلی گرم تعیین گردید.

نتیجه گیری: با استفاده از برچسب Trx فیوژن پروتین هورمون رشد انسانی نوترکیب محلول به خوبی بیان شد. همچنین با استفاده از روش خالص سازی بر اساس دنباله هیستیدینی، خلوص ۹۱٪ و بازده کل ۳۸ ٪ هورمون رشد انسانی به دست آمد.

واژگان کلیدی: هورمون رشد نوترکیب انسانی (rhGH)، بیان سیتوپلاسمی، کروماتوگرافی تمایلی.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۸

مقدمه

هورمون رشد (Growth Hormone) یکی از هورمون‌های غده هیپوفیز است که به عنوان یک هورمون آنابولیک اصلی در طول دوره پس از زایمان ایفای نقش می‌کند. این هورمون همچنین با نام سوماتوتروپین نیز شناخته می‌شود. گذشته از رشد بدنی، به دلیل عملکردهای متعدد نام سوماتوترومبین برای آن مناسب تر است. این هورمون، یک پلی پپتید هورمونی است که ساختمان اولیه آن از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است اماشباهت‌های فیزیکی کلی آن یکسان است. هورمون رشد انسانی بالغ در فرم مولکولی اصلی‌اش دارای وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون ست و ۱۹۱ واحد آمینو اسیدی دارد و یک پلی پپتید

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، لویزان، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی
تلفن: ۰۲۱۲۲۹۸۵۸۹۵ پست الکترونیک: s_m_robatjazi@mut.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

تک زنجیره ای دارای دو باند دی‌سولفیدی بین مولکولی است. ساختار سوم آن به صورت یک مارپیچ تاب‌خورده تشکیل شده از ٤ آلفاهلیکس یکسان است که شبیه به ساختار کلی بسیاری از سایتوکین‌ها می باشد (۱). هورمون رشد انسانی در درمان بیماری‌هایی مانند کمبود هورمون رشد در کودکان و بزرگسالان، نارسایی مزمن کلیوی، سندرم ترنر، رشد ضعیف جنین در رحم، کوتاه قدی آیدیوپاتیک، ضعف ناشی از بیماری ایدز، سندرم روده کوتاه (Short Bowel Syndrome) (۲) و شکستگی‌های استخوانی، سوختگی‌های پوستی، خونریزی زخم‌ها به کار می‌رود (۳).

همچنین به عنوان پسادرمان (Post-Treatment) برای افرادی که به منظور درمان تورمور مغزی از رادیوتراپی استفاده کرده اند کاربرد دارد (٤). تولید داروهای نوترکیب از لحاظ اقتصادی بسیار مورد توجه است. بنابراین با توجه به وجود بیماری‌های متعدد ناشی از نقص هورمون رشد و نیاز بالای روزانه به این دارو در داخل کشور و به منظور جلوگیری از خروج ارز از کشور به دلیل واردات این دارو و جلوگیری از وابستگی صنعت، تولید این دارو به شکل نوترکیب اهمیت ویژه‌ای می‌یابد. برای تولید این هورمون سیستم‌های بیانی متفاوتی مانند سیستم بیانی باکتریایی، مخمر، باکلوویروس، سلول‌های گیاهی و سلول‌های حیوانی استفاده شده است (۵).

در تولید هورمون رشد نوترکیب در *اشریشیا کلی* (*E. coli*) توجه به جایگاه بیانی پروتین حائز اهمیت است زیرا بیان به دوصورت محلول و نامحلول قابل انجام می باشد. در جایگاه پری‌پلاسمیک بیان به شکل محلول صورت می‌پذیرد و پروتئین به شکل تاخورده (Fold) طبیعی بیان می‌شود. در جایگاه سیتوپلاسمی اغلب بیان به شکل اینکلوژن بادی (Inclusion Body) صورت می‌گیرد. اما امروزه با استفاده از افزودن برچسب‌های الحاقی (Fusion tags) افزایش دهنده حلالیت پروتئین و تولید میزبان‌هایی خاص، بیان به شکل محلول نیز در سیتوپلاسم باکتری صورت می‌گیرد که این امر خود دارای مزایایی مانند تولید پروتین به شکل طبیعی و صحیح تاخورده، سهولت فرآیند خالص سازی پروتین است و از این رو نیازی به فرآیند بازتاخوردگی (Refolding) وجود ندارد. در تولید پروتین‌های نوترکیب فرآیند خالص‌سازی بزرگ‌ترین چالش و زمان‌برترین فرآیند است و حداقل ٦۰ تا ۷۰٪ هزینه‌های عملیاتی تولید را به خود اختصاص می‌دهد (۵ و ٦). از این رو یک طراحی بهینه برای دست یابی به بیشترین میزان بازیابی پروتین مورد نظر به همراه حذف تمام آلودگی‌های خطرناک از محصول نهایی لازم و ضروری است. انتخاب گونه میزبان استفاده شده در بیان پروتئین نوترکیب نقش به سزایی در بیان پروتین، حلالیت و راندمان تولید دارد. به طور معمول در تولید پروتین های نوترکیب توسط میزبان *اشریشیا کلی* از سویه BL21 و مشتقاتش استفاده می شود. این سویه ها فاقد پروتئازهای Lon و OmpT هستند که این امر موجب افزایش پایداری پروتئین نوترکیب می شود. سویه های دیگر *اشریشیا کلی* نیز وجود دارند مانند اوریگامی DE3 (Origami DE3) که دارای جهش در ژن *trxB* و ژن گلوتاسیون ردوکتاز (*gor*) است که به طور قابل توجهی تولید باند دی سولفیدی را در سیتوپلاسم افزایش می دهد (۷). سویه روزتا (Rosett) یکی از مشتقات سویه BL21 است که به منظور افزایش میزان بیان پروتئین‌های یوکاریوتی دارای کدون‌ها نایاب در *اشریشیا کلی* به کار می‌رود.

سویه روزیتا–گامی (Rosetta-gami) از مشتقات اوریگامی است که تلفیقی از سویه روزتا و اوریگامی است و سبب افزایش تشکیل باند دی‌سولفیدی و همچنین بیان پروتین‌های یوکاریوتی دارنده کدون‌های نایاب می شود. بر این اساس در این پژوهش از سویه روزیتا–گامی برای تولید محلول هورمون رشد انسانی نوترکیب واجد یک پروتئین یوکاریوتی و دارای باند دی‌سولفیدی استفاده گردید (۸).

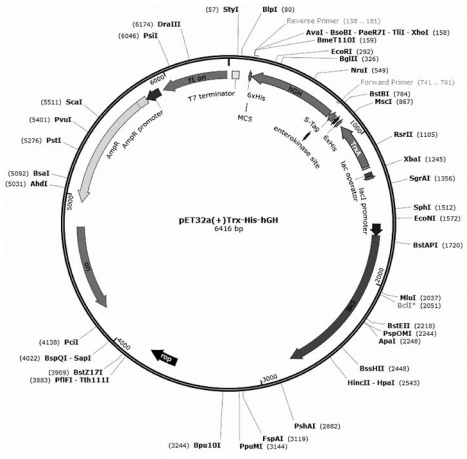
در میان روش‌های تخلیص موجود، تخلیص با استفاده از IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) دارای مزایایی است. IMAC یک روش ارزان، قدرتمند برای خالص سازی پروتئین است (۹). این روش دارای قوی‌ترین پیوند اختصاصی و شرایط ملایم الوشن (elution) شد و قابلیت کنترل انتخاب پذیری با استفاده از بافرهای کروماتوگرافی با غلظت

پایین ایمیدازول را دارد (۱۰). از میان روش‌های IMAC موجود استفاده از برچسب‌های هیستیدینی و رزین‌های Ni-NTA به عنوان اولین گام برای تخلیص بسیار معمول است. زیرا بسیار در خالص سازی کمک کرده و با یک مرحله می‌توان مقدار زیادی از پروتین را بازیابی نموده و به ندرت بر روی فعالیت‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی پروتئین اثرمنفی می‌گذارد (۱۱). با توجه به وجود بیماری‌های متعدد ناشی از نقص هورمون رشد و نیاز بالای روزانه به این دارو در داخل کشور، تولید و خالص سازی این پروتین نوترکیب نیاز می باشد.

هدف از این مطالعه بررسی تولید هورمون رشد انسانی به شکل محلول در محیط سیتوپلاسم باکتری نوترکیب *اشریشیا کلی* و خالص سازی اولیه آن بود. به منظور حفظ شکل محلول این پروتین و ممانعت از تشکیل ذرات انکلوژن بادی در سیتوپلاسم باکتری از برچسب پروتئینی Trx (Thioredoxin tag) استفاده شد. به منظور خالص سازی هورمون رشد، برچسب هیستیدینی (tag-His6) نیز به ژن هورمون رشد افزوده گردید تا مقدار بازیابی اولیه پروتین تا حد ممکن افزایش یابد. بنابراین خالص سازی بر اساس روش IMAC با استفاده از رزین‌های Ni-NTA انجام شد. میزان بیان هورمون رشد و راندمان خالص سازی با استفاده از روش ژل الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی گردید.

مواد و روش ها

الف) سویه‌ها و حامل‌های ژنی: از باکتری *اشریشیا کلی* سویه Rosetta-gami (تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیک) حاوی پلاسمید ترانسفرم شده pET32a(+)-Trx-His6-hGH (طراحی و ساخته شده در دانشگاه صنعتی مالک اشتر) استفاده شد (۱۲). نقشه ژنتیکی پلاسمید استفاده شده در شکل ۱ آمده است. همچنین از محیط های کشت LB (Luria-Bertani)، TB (Terrific Broth)، BSA (Bovine Serum Albumin)، شرکت Merck، PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) و IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactoside) مربوط به شرکت Fermentas، مارکر وزن مولکولی شرکت thermoscintific ژل کروماتوگرافی نیکل سفاروز (Ni-NTA) شرکت GE Healthcare



شکل ۱: ساختار پلاسمید بیانی pET32a(+)-Trx-His6-hGH

استفاده گردید.

ب) بیان هورمون رشد در باکتری اشریشیا کلی سویه Rosetta-gami: پس از تائید حضور پلاسمید (pET32a(+)-Trx-His6-Hgh) در کلنی‌ها ظاهر شده برروی محیط کشت جامد حاوی آمپی سیلین، تعدادی از کلنی‌های مورد تائید در محیط کشت LB تکثیر داده شدند و به منظور تهیه بانک سلولی، سوسپانسیون سلولی در لوله های اپندروف توزیع و محتوای سلولی با سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه جداسازی شد. سلول ها با یک میلی لیتر محلول با نسبت ۵۰ به ۵۰ گلیسرول و محیط کشت تازه مخلوط و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس در فریزر نگه داری شد.

به منظور تهیه مایه تلقیح، باکتری ابتدا به صورت کشت شبانه در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۰ µg/ml در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور همزن ۲۰۰ rpm تکثیر کشت داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر باکتری کشت یافته به فالکون ۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت LB مایع استریل حاوی آمپی سیلین در زیر هود میکروبی و درکنار شعله انتقال داده شد و تا رسیدن به OD مورد نظر حدود ۵-٤ ساعت در داخل شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. به منظور القا، مقدار یک میکرولیتر از IPTG یک مولار به محیط کشت اضافه گردید. سپس گرماگذاری به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

ادامه یافت. به منظور نمونه‌گیری ٤ ساعت بعد از القا برای آنالیز ژل الکتروفورز، مقدار یک میلی لیتر کشت برداشته شد. پس از نرمال سازی (یکسان سازی غلظت سلولی) بر مبنای نمونه قبل از القا، در شرایط ٦۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع روماند جداسازی شد و به رسوب حاصل مقدار ۱۵۰ میکرولیتر بافر نمونه (Tris با pH ٦/۸ و ۸۰ میلی مولار، SDS ۲ درصد، گلیسرول ۱۰ درصد ، بروموفنل بلو ۰/۰۰۰٦ درصد، مرکاپتواتانل ۵ درصد) اضافه شد و تا زمان راه اندازی ژل الکتروفورز در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (۱۳).

ج) مقایسه بیان Trx-His6-hGHدر دو محیط کشت LB و TB : بیان فیوژن پروتین در سویه نوترکیب *E. coli* Rosetta-gami در محیط کشت‌های TBو LB در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. تر کیب محیط کشت TB در جدول ۱ آمده است. مقدار ۱۰۰ سی سی از این دو محیط کشت در ارلن ۲۵۰ سی سی تهیه شد. برای هر دو محیط کشت مقدار ۵ سی سی کشت شبانه حاوی ۱۰ میکرولیتر سویه نوترکیب به عنوان مایه تلقیح در نظر گرفته شد. القا، با استفاده از IPTG 1M انجام شد. سپس گرماگذاری به مدت ٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ادامه یافت. به منظور جداسازی سلول، محیط کشت در دور ٦۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. آنالیز ژل الکتروفورز بر روی نمونه‌ها انجام شد (۱۳). به منظور بررسی بیان در ژل الکتروفورز کل ژل اسکن شد و با استفاده از برنامه CLIQS میزان در صد هر باند ژل ارزیابی گردید.

جدول ۱: ترکیب محیط کشت های استفاده شده

ماده	TB	LB
Pepton	۱۲g/L	۱۰
Yeast Extract	۲٤g/L	۵
NaCl	-	۵
Glucose	۸g/L	-
KH_2PO_4(or NaH_2PO_4)	۱۷mM	-
K_2HPO_4(or Na_2HPO_4)	۷۲mM	-
$MgSO_4$	۲/٤g/L	-

د) تخلیص فیوژن پروتین هورمون رشد محلول: پس از تولید سویه نوترکیب *E. coli* Rosetta-gami و بررسی بیان آن در محیط های TB و LB در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، فرآیند تخلیص هورمون رشد انسانی از باکتری با استفاده از ژل نیکل سفاروز انجام شد. مقدار ۱ گرم رسوب سلولی در بافر LEW شامل ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 50 mM ،Na_2HPO_4 50 mM ،NaCl 50 mM ،lmidazole 50 mM) با pH ۷/٤ حاوی PMSF با غلظت نهایی یک میلی مولار حل شد. سپس سوسپانسیون حاصل با برنامه ۷ سیکل یک دقیقه ای بر روی یخ سونیکه شد. غلظت پروتئین آن با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد. سوسپانسیون حاصل در شرایط ۱۸۰۰۰ g و دمای ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع روماند (لیز سلولی شفاف) حاصل از سانتریفیوژ (حاوی هورمون رشد) نگه‌داری شد و غلظت پروتئین آن اندازه گیری شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ به منظور شستشو در بافر NBB شامل ($NaH_2PO_4.2H_2O$ 50 mM ،Na_2HPO_4 50 mM ،NaCl 50 mM ،Native Binding Buffer) با pH ۷/٤ دمای ٤ درجه سلسیوس توسط هموژنایزر مکانیکی حل شد و مجددا در شرایط g18000 دمای ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاوی ذرات انکلوژن بادی در بافر حل کننده اوره M6 حل شد و توسط کیسه دیالیز به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس تعویض بافر شد (۱٤).

در نهایت غلظت پروتئین آن اندازه گیری شد. سپس ستون حاوی رزین Ni-NTA توسط بافر LEW به تعادل رسانده شد لیز سلولی شفاف شده حاصل از سانتریفیوژ پس از عبور از فیلتر ۰/٤۵ میکرومتری با دبی بسیار پایین به درون ستون Ni-NTA تزریق شد. از ورودی و خروجی در این مرحله نیز برای آنالیز ژل الکتروفورز نمونه گرفته شد. سپس ستون با بافر LEW شستشو داده شد. این مرحله از شستشو تا زمانی‌که خروجی ستون هیچ پروتینی توسط روش غلظت سنجی برادفورد نشان ندهد، ادامه یافت. از تمام خروجی‌های این مرحله که دارای جذب معنی داری بودند نیز نمونه برداری برای

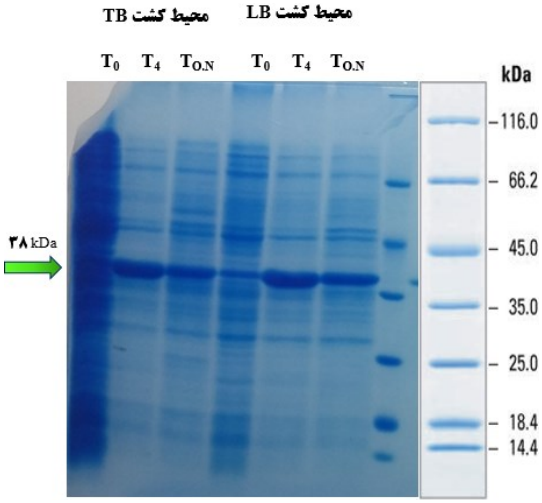
ژل الکتروفورز انجام شد. در مرحله الوشن با افزایش شیب غلظت ایمیدازول در بافر ورودی از ۵۰ تا ۵۰۰ میلی مولار نمونه ها از ستون خارج گردید. خروجی ستون در ویال‌های یک سی سی جمع آوری شد. غلظت سنجی بروش برادفورد برای تمام فراکشن‌ها صورت گرفت تا پیک پروتینی مشخص گردد. سپس تمام فرکشن‌های دارای جذب برادفورد به منظور آنالیز خلوص بر روی ژل الکتروفورز ۱۲٪ SDS-PAGE بررسی شدند. در ادامه پس از دست یابی به فیوژن پروتئین هورمون رشد خالص شده، به منظور تائید حضور فیوژن پروتئین هورمون رشد در نمونه خالص شده از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل حاصله به مدت ۶۰ دقیقه در بافر ترانسفر قرار گرفت. سپس ساندویچ ترانسفر به مدت ۱۶ ساعت (در طول شب) در جریان ثابت ۲۲۰ میلی آمپر قرار گرفت تا نمونه ها از ژل به کاغذ منتقل شود. سپس کاغذ PVDF را از ژل جدا کرده و پس از قرار دادن در ۱۰ میلی لیتر محلول ۳ درصد سرم آلبومین گاوی (BSA : bovine serum albumin)، یک ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با خارج کردن کاغذ و وارد کردن آن در درون محلول TBS-T به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر به منظور شستشو قرار داده شد (۳ مرتبه تکرار شد). کاغذ در محلول آنتی بادی اول (Anti His, Roche) قرار داده شد و به مدت یک ساعت بر روی شیکر گذاشته شد. سپس کاغذ در درون محلول TBS-T به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد (۳ مرتبه تکرار شد). در مرحله بعد، کاغذ در محلول آنتی بادی دوم (Anti Rabbit, Roche) گذاشته شد و به مدت یک ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. سپس کاغذ ۳ مرتبه در درون محلول TBS-T به مدت ۵ دقیقه بر روی شیکر و ۱ مرتبه به مدت ۵ دقیقه در TBS شستشو داده شد (۳ مرتبه TBS-T و ۱ مرتبه TBS). در ادامه کاغذ درون محلول سوبسترا شامل DAB) به مدت ۲ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شد و به محض مشاهده باند رنگی، کاغذ از محلول خارج و با آب شستشو داده شد و سپس در تاریکی نگه‌داری گردید. پس از ظهور باندها، کاغذ با آب مقطر شستشو شد و در دمای اتاق خشک گردید (۱۲).

ه) تعویض بافر نمونه‌های تخلیص شده: پس از اتمام فرآیند الوشن و تخلیص و پس از مشاهده نتایج حاصل از آنالیز ژل الکتروفورز، فرکشن‌های خالص با یکدیگر ادغام شدند. فرکشن‌هایی که دارای خلوص بالاتر بوده باهم و فرکشن‌هایی که دارای خلوص پائین‌تر بوده با هم ادغام شدند. سپس به منظور حذف ایمیدازول از محیط پروتین تخلیص شده، فرکشن‌های ادغام شده در کیسه دیالیز ریخته شدند و به مدت ۱۶ ساعت در معرض ۳ لیتر بافر مخصوص در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از اتمام فرآیند دیالیز، فرکشن‌ها توسط محلول برادفورد تعیین غلظت شده و از هر دو محلول برای ژل الکتروفورز نمونه برداری شد (١٤).

و) روش های اندازه گیری: غلظت سلولی توسط روش اسپکتروفتومتری با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ٦٠٠ اندازه گیری شد. غلظت پروتین بر اساس روش برادفورد اندازه گیری شد. منحنی استاندارد معرف برادفورد با خواندن جذب محلول‌های استاندارد تهیه شده از BSA با غلظت‌های مختلف در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم شد. آنالیز الکتروفورز SDS-PAGE 12% به منظور بررسی میزان خلوص نمونه‌های تخلیص شده استفاده گردید (۱۵ و ۱۶).

یافته‌ها

الف) کشت باکتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در محیط‌های TB و LB : میزان بیان Trx-His6-hGH در دو محیط کشت TB و LB در دمای ۲۵ درجه مورد بررسی قرار گرفت نتایج در شکل ۲ آمده است. درصد بیان پروتئین نیز توسط برنامه CLIQS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل در جدول ۲ آمده است. پروتئین بیان شده در محدوده وزن مولکولی ۳۸ کیلودالتون مربوط به هورمون رشد انسانی می باشد. این اضافه وزن پروتین به دلیل ترکیب شدن پروتین هدف با دنباله Trx و His-tag می باشد. تفاوت چندانی بین بیان در محیط TB و LB مشاهده نشد. اما غلظت سلولی به دست آمده در محیط کشت TB به طور معنی داری از محیط کشت LB بیشتر بود. از این رو برای دست یابی به توده مناسب



شکل ۲: بررسی میزان بیان در دو محیط کشت TB و LB در دمای ۲۵ درجه سلسیوس. T0: نمونه قبل از القا. T4: نمونه ٤ ساعت پس از القا. TO.N: نمونه کشت شبانه

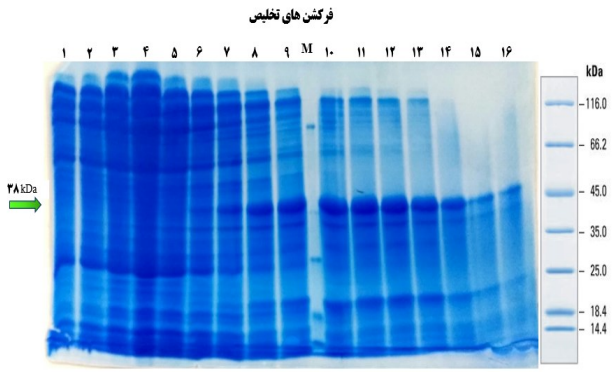
سلولی، کشت در محیط TB در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد.

ب) استخراج و تخلیص فیوژن پروتین هورمون رشد محلول توسط ستون Ni-NTA: نتایج فرایند خالص سازی در شکل ۳ آمده است. همان طور که مشخص است پروتئین هدف به خوبی با استفاده از دنباله هیستیدنی به ژل Ni-NTA متصل شده و در مرحله الوشن در غلظت بالای ایمیدازول از ستون خارج شده است. اما مقدار زیادی آلودگی نیز به همراه پروتین هدف در مرحله الوشن خارج شده است.

به منظور بهبود فرآیند تخلیص غلظت ایمیدازول در بافر LEW به مقدار ۵۰ میلی مولار افزایش داده شد. الوشن گرادیانی از غلظت ایمیدازول ۵۰ تا ۵۰۰ میلی مولار انجام شد. نتایج

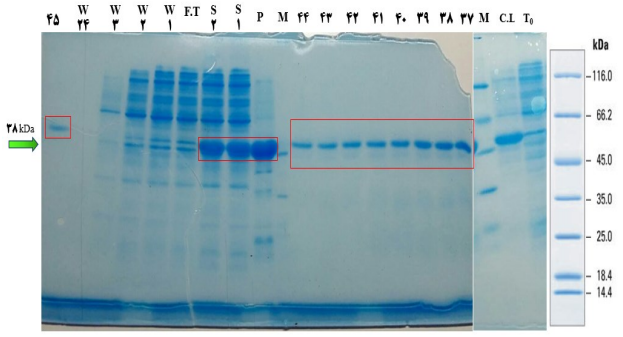
جدول ۲: مقایسه میزان بیان در کشت‌های TB و LB در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

محیط کشت	میزان بیان فیوژن پروتئین هورمون رشد انسانی(٪)		وزن مرطوب سلولی(g/l)
	T_4	$T_{Over\ Night}$	
TB	۵۵/۵	٤٤	۱۰/٦
LB	۵۸	٤۸/۱	۵



شکل ۳: ژل حاصل از فرآیند تخلیص با بایندینگ بافر LEW با ایمیدازول ۵ میلی مولار. ستون های ۱ تا ۱٦: فرکشن‌های تخلیص حاصل از الوشن گرادیانی، M : مارکر وزن مولکولی.

حاصل از این مرحله از تخلیص، در شکل ٤ آمده است. همان طور که مشاهده می شود میزان خلوص بهبود چشمگیری یافته است. با بررسی خلوص فراکشن‌های تخلیص شده از روی ژل الکتروفورز میزان خلوص در محدوده متفاوتی از ۸۵٪ تا ۹۸٪ تعیین گردید. مقدار فیوژن پروتین هورمون رشد انسانی محلول خالص پس از این مرحله ۲۲/٤ میلی گرم اندازه گیری شد. این



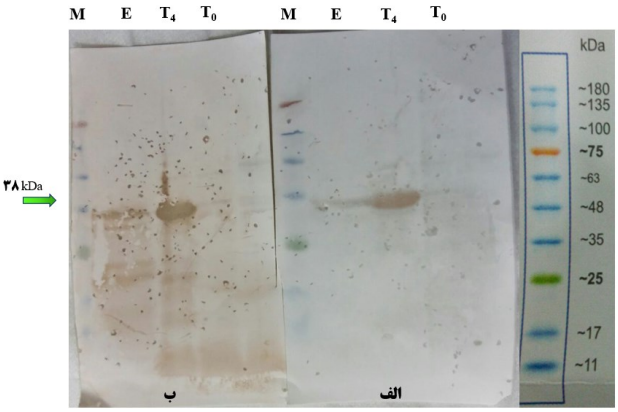
شکل ٤: ژل الکتروفورز فرآیند تخلیص فیوژن پروتین هورمون رشد با بایندینگ بافر LEW با ایمیدازول ۵۰ میلی مولار. T0: نمونه قبل از القا.C.L: عصاره اولیه سلولی. M: مارکر وزن مولکولی. P: رسوب پس از لیز حل شده در بافر دناتوره کننده. S-۱: روماند حاصل از سانتریفیوژ عصاره شفاف سلولی، قبل از فیلتراسیون. S-۲ : روماند حاصل از سانتریفیوژ عصاره شفاف سلولی، پس از فیلتراسیون. F.T: خروجی ستون پس از اتصال فیوژن پروتین‌ها. W ۱تا ۲٤: نمونه های حاصل از شستشوی ستون پس از اتصال. ۳۷ تا ٤۵ : فرکشن‌های تخلیص حاصل از الوشن گرادیانی.

جدول ۳: مقادیر ورودی و خروجی و میزان اتصال فیوژن پروتین هورمون رشد در ستون Ni-NTA

نمونه	حجم (ml)	مقدار کل پروتین (mg)	مقدار فیوژن پروتین (mg)	درصد خلوص (%)
عصاره سلولی اولیه	۳۰	۱۱۰/٦	۵۹/۷	٥٤
روماند عصاره سلولی شفاف پس از سانتریفیوژ (S_1)	۳۰	۸٤	۳۷/۳	٤٤/٤
روماند عصاره سلولی شفاف پس از سانتریفیوژ و فیلتر (S_2)	۳۰	٦۸/۲	۳۲	٤٦/۹
پروتین به شکل انکلوژن بادی پس از انحلال و دیالیز (P)	۳۰	۲٤/٦	۲۰/۸	۸٤/٦
خروجی از ستون در مرحله بارگذاری (اتصال نیافته به ستون)	۳۰	۳٦	۳	۸/۳
کل پروتین تخلیص شده	۸	۲٤/٥	۲۲/٤	۹۱/٤

مقدار با مقدار به دست آمده از آنالیز ژل الکتروفورز توسط نرم افزار CLIQS در زمان ٤ ساعت پس از القا تقریبا هم خوانی دارد. بازده کل تخلیص فیوژن پروتین حاصل نیز مقدار ۳۸٪ به دست آمد. داده‌های کمّی حاصل بطور خلاصه در جدول ۳ آمده است.

در نهایت وسترن بلات نمونه تخلیص شده به منظور تائید حضور فیوژن پروتئین هدف در نمونه تخلیص شده با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدین و سرم پلی کلونال



شکل ۵: وسترن بلات نمونه تخلیص شده به منظور تائید حضور فیوژن پروتین هدف در نمونه تخلیص شده. الف) توسط آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدین و ب) توسط سرم پلی کلونال هورمون رشد آنالیز شدند. T0: نمونه قبل از القا. T4: نمونه ٤ ساعت پس از القا. E : نمونه تخلیص شده فیوژن پروتئین هورمون رشد. M: مارکر وزنی پروتئینی رنگی.

هورمون رشد مورد ارزیابی قرار گرفت. همان گونه که در شکل ۵ مشخص می باشد هر دو آزمون پاسخ مثبت داده و باند پروتئین تخلیص شده در ژل وسترن بلات با آنتی بادی مونوکلونال ضد هیستیدین و وسترن بلات سرم پلی کلونال هورمون رشد واکنش ایمنولوژیک داده و باند آن به وضوح قابل مشاهده است. همچنین برای نمونه های قبل از القا و پس از القا این آزمون انجام شد. نتایج نشان دادند که برای نمونه های قبل از القا باندی قابل مشاهده نمی باشد، اما نمونه های القا شده واکنش ایمنولوژیک داده و باند آنها قابل مشاهده می باشد.

بحث

سیستم بیانی pET از قدرتمندترین سیستم‌هایی است که برای کلون و بیان پروتئین‌های نوترکیب در *اشریشیا کلی* کاربرد دارد. ژن هدف در داخل (multiple Cloning Site) حامل کلون می‌شود که در کنترل پروموتر قوی باکتریوفاژ T7 برای رونویسی عمل می‌کند. رونویسی با استفاده از RNA پلی مراز باکتریوفاژ T7 که در داخل ژنوم باکتری قرار دارد انجام می‌گیرد. آنزیم RNA پلی مراز باکتریوفاژ T7 به صورت اختصاصی پروموتر خود را شناسایی می کند و زمانی که توسط القاگر IPTG، القا می‌شود تقریباً تمامی منابع سلولی برای ژن هدف تغییر جهت می‌دهند. بنابراین پروتئین هدف می‌تواند بیش از ۵۰ درصد از کل پروتین سلول را تنها چند ساعت پس

از القا شامل شود. بنابراین در این پژوهش از این سیستم بیانی قدرتمند استفاده شد و همان طور که ملاحظه شد بیان پروتئین نوترکیب بیش از ۵۰٪ کل محتوای پروتینی سلول بدست آمد. لذا بر این اساس سویه نوترکیب Rosetta-gami با پلاسمید pET32a(+) به منظور تولید هورمون رشد انسانی در این تحقیق استفاده گردید. در این مطالعه با توجه به طراحی سیستم بیانی، برای افزایش میزان حلالیت پروتئین هورمون رشد انسانی نوترکیب از برچسب Trx استفاده شده بود. این برچسب میزان تاخوردگی پروتین هدف راافزایش داده و همچنین مانع از ایجاد پیوندهای دی سولفیدی در میان پروتین ها با یکدیگر شده و از تولید اینکلوژن بادی جلوگیری به عمل می آورد. در مطالعه حاضر، میزان بیان پروتئین هورمون رشد نوترکیب انسانی به شکل محلول در سیتوپلاسم مقدار ۳۳/۷ ٪ ارزیابی گردید که حاکی از عملکرد مناسب این برچسب افزایش دهنده حلالیت است.

کشت بیانی در دو محیط کشت پیچیده LB و TB انجام شد. دلیل این انتخاب آن بود که محیط پیچیده در مقایسه با محیط کشت معین ارزان است و ساده‌تر تهیه می‌شود (۱۷). علاوه بر آن چون پروتین در درون سلول تولید می‌شود، از این رو وجود ترکیبات مختلف محیط کشت پیچیده بر روی فرآیند خالص سازی اثری ندارد. ضمن آن که محیط کشت پیچیده دارای فاکتورهای رشد است و به همین دلیل سرعت رشد و تولید درآن معمولا بیشتر است. با وجود این که LB یک محیط غنی است اما رشد سلول در دانسیته های پایین متوقف می‌شود. دلیل این امر، مقادیر بسیار کم کربوهیدرات (و سایر منابع کربنی قابل مصرف) و کاتیون های دو ظرفیتی در این محیط است. بدون شک، افزایش مقدار پپتون و عصاره مخمر، به دلیل دارابودن محتوای بالاتر ترکیبات نیتروژن منجر به افزایش دانسیته سلولی می شود (۱۸). همچنین افزودن ذخایر کاتیون-های دوظرفیتی مانند MgSO4 در غلظت های میلی مولار سبب رشد بالای سلولی می شود. همچنین افزودن گلوکز به محیط LB، به دلیل اسید ناشی از متابولیسم آن و ظرفیت محدود بافری آن تاثیر ناچیزی دارد (۱۹). بنابراین باید بایستی شرایط مناسب بافری برای این محیط در نظر گرفته شود. بر همین اساس در این مطالعه رشد بالای سلولی در محیط TB نسبت به محیط LB حاصل گردید که می تواند به دلیل بالا بودن مقدار پپتون و عصاره مخمر در محیط TB و همچنین وجود سیستم بافری و ذخایر کاتیون دوظرفیتی MgSO4 باشد. از آنجایی که برچسب Trx خاصیت تمایلی ندارد، از این رو به منظور افزایش سهولت در فرآیند خالص سازی هورمون رشد محلول، از برچسب تمایلی His در کنار برچسب Trx استفاده شد. در اغلب پژوهش های انجام شده در داخل کشور اشاره شده که مهمترین مشکلات تولید هورمون رشد انسانی، تولید ذرات انکلوژن بادی در بیان پروتین های نوترکیب در سیتوپلاسم، آلودگی های ناشی از پروتئین های میزبان، بازیافت پایین پروتئین ، ترشح کم پروتئین به فضای پریپلاسمی، هزینه بالای تولید می باشد (۲۲). بنابراین در پژوهش حاضر،دست یابی به این میزان تولید پروتین هورمون رشد از سویه *اشریشیا کلی* قابل توجه می باشد. در همین راستا در تحقیقی مقدار هورمون رشد بیان شده در سویه اشریشیاکلی نوترکیب در حدود ۳۳٪ کل محتوی پروتئینی گزارش شده است (۲۳).

در تحقیقی دیگر گزارش شده است که هورمون رشد انسانی در فضای پری پلاسمی بر اساس آنالیز ژل الکتروفورز در حدود ۲۰ درصد بیان شده است (۲٤). اما نتایج حاصل از این تحقیق بر اساس آنالیز ژل الکتروفورز نشان داد که مقدار ۳۳/۷ ٪ از کل فیوژن پروتئین به صورت محلول و مقدار ۱۸/۸٪ آن به صورت انکلوژن بادی تولید شده است که در کل مقدار بیان فیوژن پروتئین هورمون رشد انسانی ۵۲/۵ ٪ بوده است. گذشته از این، با آنالیزهای ژل الکتروفورز مشخص شد که تعدادی از آلودگی‌های پروتئینی به همراه فیوژن پروتین هورمون رشد انسانی در هنگام الوشن خارج می‌شوند. این آلودگی‌ها پروتین‌هایی هستند که در درون میزبان اشریشیاکلی به صورت طبیعی تولید می‌شوند. اغلب این آلودگی‌ها پروتین‌های متصل شونده به فلزات (Metal binding proteins) هستند و تمایل بالایی به کاتیون‌های دو ظرفیتی دارند. این پروتین‌ها در سویه‌های مختلف اشریشیاکلی که دارای ژنتیک متفاوتی

هستند مانند BL21، BL21(DE3)، BL21(DE3)pLysS، C41، C43، Rosetta(DE3)، Rosetta(DE3)pLysS و Origami (DE3) و Origami(DE3)pLysS وجود دارند. میزان نسبی بیان این پروتین‌های خاص در *اشریشیا کلی* کاملا متغیر است و به نظر می‌رسد که به عوامل بسیاری مانند شرایط کشت، ترکیب محیط کشت و زمینه ژنتیکی (Genetic background) سویه بیانی وابسته باشد (۲۰).

بیان هورمون رشد بصورت ترشحی می تواند فرایند خالص سازی را بسیار تحت تاثیر قرار دهد و مشکلات ناخالصی های پروتینی را رفع نماید. در تحقیقی بیان ترشحی هورمون رشد انسانی در مخمر پیکیا پاستوریس مورد ارزیابی قرا گرفته است از مجموع ۱۶۲ گرم بیومس تولید شده ۰/۹۸۳ گرم هورمون رشد به محیط کشت ترشح شده است. بار آلودگی پروتینی نسبت به سیستم های بیانی درون سلولی کم می باشد، اما میزان بیان بازای توده زیستی در حدود ٦ mg/g_{cell} گزارش شده است (۲۵). که در مقایسه با بیان در سویه اشریشیاکلی بسیار پایین است. در مطالعه حاضر آلودگی‌های پروتینی موجود در آنالیز ژل الکتروفورز دارای وزن‌های مولکولی تقریبی ۱٦/۵، ۱۹، ۲٤، ۲٦ و ۳٤ کیلودالتون هستند. بنابراین با توجه به پایین بودن وزن مولکولی این پروتئین‌ها، می‌توان انتظار داشت با حذف عصاره سلولی از پری پلاسم، میزان آلودگی‌ها نیز کاهش یابد. اما به دلیل زمان بر بودن فرآیند در این تحقیق از آن صرفه نظر شد. ضمن اینکه استخراج پروتین فضای پری پلاسمی نیازمند روش های اختصاصی است. اما به منظور کاهش اتصال آلودگی‌ها در فرآیند تخلیص به ژل Ni-NTA بافرهای لیز اضافه شد. همچنین شستشو و متعادل سازی با تنظیم مقدار ایمیدازول (۵۰ میلی مولار) انجام شد. بدین ترتیب مقدار اتصال پروتئین های غیر هدف به ستون کاهش محسوس یافت و در نتیجه در مرحله الوشن کیفیت محصول خالص شده افزایش قابل توجه ای پیدا کرد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که پروتین فیوژن هورمون رشدانسانی نوترکیب محلول توسط برچسب Trx به مقدار مناسبی می تواند بیان شود. به طوری که از هر یک گرم سلول مرطوب با استفاده از برچسب هیستیدینی مقدار ۲۲/٤ میلی گرم پروتئین فیوژن هورمون رشد جداسازی و خالص سازی شد. میزان راندمان کل ۳۸٪ تعیین گردید که این مقدار بیان و راندمان تخلیص با توجه به سایر تحقیقات انجام شده در کشور قابل توجه می باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی همکاران پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر به دلیل همکاری صمیمانه در این پژوهش کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Møller N, Jørgensen JO. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. Endocr Re. 2009; 30(2): 152–177.

2. Mulinacci F, Capelle MA, Gurny R, Drake AF, Arvinte T. Stability of human growth hormone: influence of methionine oxidation on thermal folding. J Pharm Sci. 2011; 100(2): 451-463.

3. Lu M, Flanagan JU, Langley RJ, Hay MP, Perry JK. Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications. Signal Transduct Target Ther. 2019; 4: 3.

4. Laron Z. Growth hormone and insulin-like growth factor-I: effects on the brain, hormones, brain and behavior. Exp Gerontol. 2015; 68: 76–81.

5. Ribela MT, Gout PW. Bartolini P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003; 790 (1–2): 285-316.

6. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotech. 2002; 13(2): 117-123.

7. Jia B, Jeon CO. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. Open Biol. 2016; 6(8): 160-196.

8. Novagen, Competent cells. User Protocol TB009 Rev. 0104, EMD Biosciences, Inc., 2004; 1-23.

9. Kinna A, Tolner B, Rota EM, Titchener-Hooker N, Nesbeth D, Chester K. IMAC capture of recombinant protein from unclarified mammalian cell feed streams. Biotechnol Bioeng. 2016; 113(1): 130-140.

10. Magnusdottir A, Johansson I, Dahlgren LG, Nordlund P, Berglund H. Enabling IMAC purification of low abundance recombinant proteins from E.coli lysates. Nat Methods. 2009; 6 (7): 477-478.

11. Susanne Graslund PN et al. Protein production and purification. Nat Methods. 2008; 5(2): 135-146.

12. Rouhani Nejad H, Yari S, Deldar AA. Hamidi AA. Cloning and expression of human growth hormone gene by thioredoxin tag. J Cell Tissue, 2017; 7(4): 339-406. [In Persian]

13. Kim MJ, Park HS, Seo KH, Yang HJ, Kim SK, Choi JH. Complete solubilization and purification of recombinant human growth hormone produced in Escherichia coli. PLoS One. 2013; 8(2): e56168-10.1371/journal.pone.0056168.

14. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology, New York. John Wiley & Sons, Inc; 2004 .

15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-685.

16. Ku HK, Lim HM, Oh KH, Yang HJ, Jeong JS, Kim SK. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: comparison with two calculation models. Anal Biochem. 2013; 434

(1): 178-180.

17. Palmer I, Wingfield P T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from Escherichia coli. Curr Protoc Protein Sci. 2004; 6: Unit 6(3).

18. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov Today. 2014; 19(5): 590-601.

19. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenge. Front Microbiol. 2014; 17(5): 172.

20. Zamani M, Berenjian A, Hemmati S, Nezafat N, Ghoshoon MB, Dabbagh F, Mohkam M, Ghasemi Y. Cloning, expression, and purification of a synthetic human growth hormone in *Escherichia coli* using response surface methodology. Mol Biotechnol. 2015; 57(3): 241-250.

21. Bolanos-Garcia VM, Davies OR. Structural analysis and classification of native proteins from *E.coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. Biochim Biophys Acta. 2006; 1760(9): 1304-1313.

22. Ghasemi R, Hashemzadeh H, Razavi H, Yakhchali B. Production of recombinant human growth hormone and future challenges. Modares J Biotechnol. 2018; 9(1): 79-92. [In Persian]

23. Ghavim M, Abnous K, Arasteh F, Taghavi S, Nabavinia M S, Alibolandi M, Ramezani M. High level expression of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: crucial role of translation initiation region. Res Pharm Sci. 2017; 12(2): 168–175.

24. Ghasemi F, Zomorodipour A, Shojai S, Ataei F, Khodabandeh M, Sanati MH. Using L-arabinose for production of human growth hormone in *Escherichia coli*, studying the processing of gIII: hGH precursor. Iran J Biotechnol, 2004; 2(4): 250-260.

25. Azadi S, Sadjady S K, Mortazavi S A, Naghdi N, Mahboubi A, Solaimanian R. Bioprocess and downstream optimization of recombinant human growth hormone in Pichia pastoris. Res Pharm Sci. 2018; 13(3): 222-238.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 4, January 2020

Original Article

Purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli* in lab-scale.

Seyed Mortaza Robatjazi[1], Seyed Mohammad Hasanpour Matikolaee[2], Valiolah Babaeipour[3], Hamideh Rouhani Nejad[4]

[1]Assistant Professor, Malek Ashtar University of Technology, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Bioscience and Biotechnology. [2] M.Sc., student, Malek Ashtar University of Technology, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Bioscience and Biotechnology, [3] Associate Professor, Malek Ashtar University of Technology, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Bioscience and Biotechnology, [4] Assistant Professor, Malek Ashtar University of Technology, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Department of Bioscience and Biotechnology.

Abstract

Background & Objectives: Human growth hormone (hGH) or somatotropin is a single chain polypeptide that consisting of 191 amino acid residues and a molecular weight of 22kDa. The purpose of this study was to evaluate the production and purification of the soluble form of recombinant human growth hormone in the lab-scale.

Material & Methods: In this study, the recombinant *E. coli* containing the plasmid pET32a(+)-hGH was used. To obtain high-level production of soluble hGH in the cytoplasm was used from Trx tag and for the purification process of hGH was used from His tag. The bacteria were grown in LB and TB culture media at 25 ^{0}C. The purification process carried out based on affinity chromatography using Ni-NTA resin.

Results: The SDS-PAGE analysis showed 55% hGH expression that 33.7% expressed as soluble and 18.8% expressed as IBs. The amount of hGH fusion protein purified through a Ni-NTA column was 22. 4 mg per gram of wet cells.

Conclusion: The results of this study indicate that hGH-Trx fusion protein was properly expressed. The purity of hGH fusion protein purified by the histidine-tagged protein purification method was determined by 91% with a total yield of 38%.

Keywords: Recombinant human growth hormone (rhGH), Cytoplasmic expression, Affinity chromatography.

Correspondence to: Seyed Mortaza Robatjazi

Tel: +982122985895

E-mail: s_m_robatjazi@mut.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 12(4): 328-339.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.