

## بیان نو ترکیب فاکتور رشد اپیدرم انسانی در باکتری *E. coli* و ارزیابی اثر آن بر دودمان سلولی NIH-3T3

مصطفی بخشی<sup>۱</sup>، فیروز ابراهیمی<sup>۲\*</sup>، حسین هنری<sup>۳</sup>، عباس حاجی زاده<sup>۴</sup>، محمدعلی عارف پور ترابی<sup>۵</sup>  
۱- کارشناس ارشد، ۲- استادیار، ۳- استادیار، ۴- دانشجوی دکتری، ۵- کارشناس ارشد، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی،  
دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)  
(دریافت: ۱۳۹۰/۰۹/۲۲، پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۱۰)

### چکیده

خانواده EGF از بیش از ۱۳ عضو تشکیل شده است و فاکتور رشد اپیدرمی عضو اصلی این خانواده می باشد که در ترمیم زخم های اپیدرمی نقش آفرینی می کند. این فاکتور، یک پلی پپتید اساسی برای ترمیم زخم و آغاز تقسیم میتوزی است. در این مطالعه، ژن فاکتور رشد اپیدرم انسانی از بانک ژنی استخراج و پس از بهینه سازی کدون های آن بر اساس ترجیح کدونی باکتری *E. coli* در وکتور pET21a(+) سنتز گردید. وکتور حامل ژن مذکور به باکتری *E. coli* به عنوان میزبان بیانی انتقال یافت و پس از بیان، فرآیند تخلیص پروتئین با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی انجام شد. نتیجه سنجش فعالیت زیستی در سه دُز مختلف نشان داد که این پلی پپتید نو ترکیب بر تکثیر سلولی در دودمان سلولی NIH-3T3 تأثیر گذار است.

کلیدواژه ها: فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب، ژن صنعتی، *E. coli*، دودمان سلولی NIH-3T3.

## Recombinant Expression of Human Epidermal Growth Factor in *E. coli* and Assessment of its Effect in NIH-3T3 Cell Line

M. Bakhshi, F. Ebrahimi\*, H. Honari, A. Hajizadeh, M. A. Arefpoor Torabi

Biology Research Center, faculty of Sciences, Imam Hossien University

(Received:12/13/2011, Accepted:03/01/2012)

### Abstract

The EGF family include 13 members and the hEGF as founding member of this family involves in epidermal wound healing. Epidermal growth factor is an essential polypeptide for wound healing and promoting mitotic division. In this study, human epidermal growth factor gene was adapted from gene bank and its codons were optimized according to codon preference of *E. coli* BL21. The gene was prepared as synthetic construct in pET21a (+). Then the recombinant construct was transferred to *E. coli* and hEGF gene in the vector was expressed under the control of inducible T7 promoter. Purification was done using affinity chromatography. The bioassay results of three different doses showed that recombinant protein has significant effects on growth of NIH-3T3 cell line.

**Keywords:** Recombinant hEGF, Synthetic Gene, *E. coli*, NIH-3T3 Cell Line.

\* Corresponding author E-mail: Febrhimi@ihu.ac.ir

## ۱. مقدمه

خود در سطح خارجی غشاء پلاسمایی سلول های هدف را داراست. تاکنون نقش های فیزیولوژیک متعددی برای این فاکتور رشد مشخص شده است که از مهم ترین آنها می توان به القاء تقسیم میتوزی و تنظیم pH اسیدی معده اشاره نمود [۲].

از همان ابتدای شناسایی چنین فاکتور ارزنده ای تلاش های فراوانی برای استخراج آن از خون و ادرار انسان انجام شد. اما به دلیل فراوانی اندک آن در مایعات بدنی، از سال ۱۹۸۸ میلادی محققین روی به تولید این پروتئین به صورت نوترکیب توسط موجودات زنده تراریخت آوردند تا بتوانند با تکیه بر این پلی پپتید داروهای جدیدی را برای ترمیم زخم و تسریع بهبودی آسیب های پوستی تولید نمایند [۱]. تلاش های ابتدایی برای بیان نوترکیب این پروتئین از سال ۱۹۸۸ میلادی توسط دیوید انگلر و همکارانش صورت پذیرفت. در این مطالعه، بیان ژن hEGF به همراه توالی نشانه<sup>۶</sup> phoA (آلکالین فسفاتاز) به صورت پری پلاسمی در باکتری *E. coli* سویه JM107 انجام شد [۱۱].

در تحقیقی دیگر در سال ۱۹۹۷ cDNA مربوط به پری پرو EGF انسانی تهیه گردید و پس از همسان سازی، بیان پروتئین در باکتری *E. coli* سویه M15 انجام شد [۱۲]. در ایران نیز ابراهیمی راد و همکاران در سال ۲۰۰۴ این پروتئین را به دو شکل سیتوپلاسمی و پری پلاسمی (با امتزاج با بتا لاکتاماز) بیان کردند و فعالیت زیستی EGF نوترکیب را مورد سنجش قرار دادند [۱۳]. محققین بر این باور بودند که با امتزاج توالی نشانه به ژن EGF و بیان آن به صورت پری پلاسمی بسیاری از دغدغه های محلول سازی و تخلیص این پپتید رفع خواهد شد. در همین راستا یک سری اقدامات انجام شده است. اما باید به این نکته توجه داشت که این توالی های نشانه، باعث کاهش فعالیت زیستی EGF نوترکیب می شوند [۱۴، ۱۵].

در سال ۱۹۹۳ در راستای مطالعات برای تولید EGF نوترکیب، محققین، روی به تغییر موجود زنده ای که به عنوان میزبان بیانی ایفای نقش می کرد آوردند و از مخمر ساکارومایسز سرویزیه<sup>۸</sup> استفاده نمودند [۱۶]. همچنین از باکتری های دیگری نیز برای بیان فاکتور رشد اپیدرم انسانی استفاده شده است [۱۷]. از آنجا که دستیابی به این پپتید برای استفاده های درمانی خصوصاً بهبود زخم های عمیق مورد نیاز کشور است، به تولید نوترکیب آن در این تحقیق اقدام شد.

## ۲. مواد و روش ها

## ۲-۱. مواد

تمام مواد شیمیایی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، دارای درجه خلوص بالا بودند و از شرکت های Merck و Sigma

ترمیم زخم، یکی از فرآیندهای زیستی است که در تمام موجودات به ویژه انسان از اهمیت خاصی برخوردار است. فاکتورهای پپتیدی زیادی در این فرآیند دخیل هستند که مهم ترین آنها، فاکتور رشد اپیدرمی<sup>۱</sup> (EGF) می باشد [۱]. خانواده EGF از بیش از ۱۳ عضو تشکیل شده که مهم ترین آنها عبارتند از: فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد انتقالی بتا<sup>۲</sup> و فاکتور رشد شبه EGF متصل شونده به هپارین<sup>۳</sup> [۲، ۳، ۴].

تمام اعضای این خانواده به صورت لنگرهای غشایی سنتز می شوند که در نهایت برای ایجاد فاکتورهای محلول فعال پردازش می گردند. این فاکتورها عملکردشان را از طریق گیرنده های سطح سلولی ویژه ای به انجام می رسانند [۵].

چهار دسته از گیرنده های تیروزین کینازی مرتبط با این فاکتورها شناسایی شده اند که آنها عبارتند از: EGFR/erbB1/HER1، erbB2/HER2/neu، erbB3/HER3 و erbB4/HER4. هر یک از لیگاندهای خانواده EGF با درجه ای از اختصاصیت به این گیرنده ها متصل می شود. EGF به شکل اختصاصی به گیرنده erbB1 متصل می شود [۶، ۵، ۲]. با اتصال لیگاند به گیرنده، هتروداپیریزاسیون گیرنده اتفاق می افتد که موجب ترانس اکتیواسیون گیرنده شده و متعاقب آن فرآیند انتقال پیام به واسطه EGF اتفاق می افتد. EGF توسط پلاکتها، ماکروفاژها و فیبروبلاستها ترشح می شود و به شکل پاراکرین<sup>۴</sup> بر سلول های اپیتلیالی اعمال اثر می کند [۵، ۲].

در سال ۱۹۶۰ میلادی، Stanley Cohen یک پلی پپتید پایدار در مقابل دما را از غدد بزاقی تحت فکی موش استخراج کرد که مسئول نمو ابتدایی و رشد دندان موش های تازه متولد شده بود. وزن مولکولی این پلی پپتید ۶/۱۲ کیلودالتون بود و به دلیل اثر تحریکی بالقوه آن بر تکثیر و کراتینیزاسیون اپیدرم، فاکتور رشد اپیدرمی نامیده شد [۷، ۸]. فاکتور رشد اپیدرم انسانی (اروگاسترون<sup>۵</sup>) توسط Gerigory در سال ۱۹۷۵ جداسازی و شناسایی گردید. این فاکتور نیز دارای وزن مولکولی و توالی اسید آمینه ای تقریباً مشابه فاکتور رشد اپیدرم موشی (وزن مولکولی ۶/۲ کیلودالتون و با ۱۶ اسید آمینه متفاوت) است.

EGF انسانی به صورت یک پیش ساز محلول متصل شونده به غشاء حاوی ۱۲۰۷ اسید آمینه با وزن مولکولی حدود ۱۴۰ کیلودالتون سنتز می شود. این مولکول بزرگ سوپسترای یک پروتئاز خارج سلولی است که این پپتید را به بخش های مختلف با اندازه های متنوع برش می دهد [۹]. یکی از محصولات این واکنش پروتئولیتیک EGF است که مشتمل بر ۵۳ اسید آمینه می باشد. EGF قابلیت اتصال به گیرنده

<sup>۱</sup> Epidermal Growth Factor

<sup>۲</sup> Transforming Growth Factor

<sup>۳</sup> Heparin Binding-Like Growth Factor

<sup>۴</sup> Paracrine

<sup>۵</sup> Urogastrone

<sup>۶</sup> Engler et al

<sup>۷</sup> Signal Peptide

<sup>۸</sup> *Saccharomyces Cervisiae*

در دمای اتاق هم زده شدند و سپس با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm در مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردیدند. مایع رویی و بخش نامحلول بر روی ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸٪ الکتروفورز و مورد بررسی واقع شدند [۹].

## ۲-۶. تخلیص EGF انسانی نو ترکیب

به علت وجود نشانه هیستیدینی در انتهای کربوکسیل پروتئین hEGF نو ترکیب، از روش کروماتوگرافی تمایلی و از ستون نیکل برای تخلیص پروتئین استفاده شد. پس از محلول سازی پروتئین های نامحلول که در بر گیرنده EGF نو ترکیب نیز بود، فاز محلول شده به منظور حذف کامل گوانیدین هیدروکلراید در یک شیب کاهشی گوانیدین (۳/۵، ۲/۵، ۱/۵، ۰/۵ و ۰ مولار) در بافر تریس با غلظت ۵۰ میلی مولار برای اینکه پروتئین تاخوردگی فضایی خود را از دست ندهد، توسط فرآیند دیالیز حذف گردید. سپس با استفاده از بافرهای تخلیص پروتئین به روش طبیعی توسط ستون نیکل که عبارت بودند از بافر شستشوی اول (محتوی  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ۵۰ میلی مولار)، کلرید سدیم (۳۰۰ میلی مولار) و ایمیدازول (۲۰ میلی مولار)، بافر شستشوی دوم (محتوی  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ۵۰ میلی مولار)، کلرید سدیم (۳۰۰ میلی مولار) و ایمیدازول (۴۰ میلی مولار)، بافر شستشوی سوم (محتوی  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ۵۰ میلی مولار)، کلرید سدیم (۳۰۰ میلی مولار) و ایمیدازول (۲۵۰ میلی مولار) و بافر پروتئین EGF نو ترکیب از سایر پروتئین های باکتری جدا گردید و تخلیص شد. بخش های مختلف به دست آمده بر روی ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸٪ الکتروفورز گردیدند [۲۰].

## ۲-۷. آنالیز وسترن بلات

پس از بارگذاری نمونه ها بر روی ژل تریسین، فرآیند الکتروبلاتینگ بر روی کاغذ نیتروسولولز در بافر انتقالی (۰/۲۵) مولار تریس، ۰/۱۹ مولار گلیسین و متانول ۲۰ درصد ((v/v)) به مدت ۹۰ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از اتمام فرآیند بلاتینگ، کاغذ نیتروسولولز توسط بافر بلاکینگ<sup>۱</sup> برای مدت ۱۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد تیمار شد. پس از مرحله شستشو، کاغذ نیتروسولولز با آنتی بادی مونوکلونال موشی ضد فاکتور رشد اپیدرم انسانی که ۱۰۰۰ برابر رقیق شده بود به مدت ۱ ساعت تیمار گردید. با شستشوی مجدد کاغذ، واکنش با آنتی بادی پلی کلونال موشی کانژوگه با HRP به مدت ۱ ساعت انجام شد. پس از شستشو و با اضافه کردن سوپسترا به محیط واکنش رنگ پذیری باند مربوط به پروتئین در حضور ماده شیمیایی دی آمینو بنزدین (DAB) انجام شد [۲۱].

خریداری گردیدند. میزبانی که برای بیان ژن hEGF مورد استفاده قرار گرفت باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) که یک سویه بیانی از این باکتری است و دارای تولید بالای سرکوب گر lac و دارای اپراتور T7 می باشد، از شرکت Novagen خریداری شد.

## ۲-۲. همسان سازی ژن hEGF در ناقل pET

در ابتدا پس از جستجو و یافتن توالی ژن کد کننده فاکتور رشد اپیدرم انسانی در بانک ژن پایگاه NCBI با عدد دسترسی [AY548762.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/AY548762.1)، این توالی برای شرکت سازنده ژن Shine Gene ارسال گردید و پس از بهینه سازی کدون ها بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی، ژن به صورت صناعی بین دو جایگاه برشی BamHI و Hind III در وکتور pET21a(+) صورت پذیرفت.

## ۲-۳. تهیه سلول های مستعد از باکتری *E. coli* BL21(DE3) به عنوان میزبان بیانی

برای تهیه سلول های مستعد به منظور انتقال پلاسמיד های نو ترکیب (حاوی ژن hEGF)، از روش شیمیایی (کلرید منیزیم ۱۰۰ میلی مولار، کلرید کلسیم ۱۰۰ و ۸۵ میلی مولار) استفاده گردید. پس از تهیه سلول های مستعد، میزان ۵ μl از ناقل نو ترکیب به این سلول ها انتقال یافت. کلنی های رشد یافته در محیط جامد انتخابی (حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین)، به محیط LB انتقال داده شد. استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی انجام شد و با توجه به در نظر گرفتن دو جایگاه برش آنزیمی BamHI و HindIII در ابتدا و انتهای ژن در وکتور، جهت تأیید حضور ژن در پلاسמיד های تخلیص شده، هضم آنزیمی اجرا شد. نتیجه هضم آنزیمی با ژل آگارز ۳ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۸].

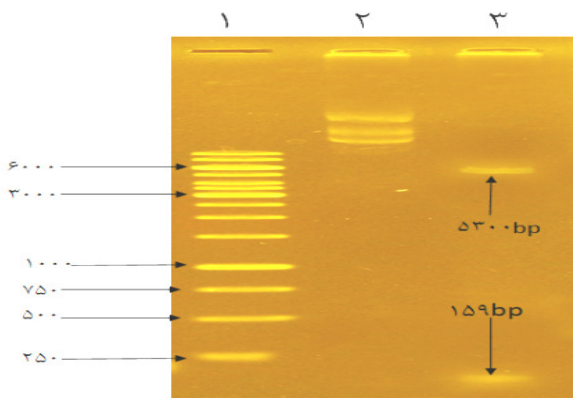
## ۲-۴. بیان hEGF در باکتری *E. coli* BL21(DE3)

پس از ترسیب (۵ دقیقه سانتیفریوژ با سرعت ۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد) سلول های میزبان القاء شده، رسوب سلولی در محلول بافر لیز کننده ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  NaCl) حل شد و سپس سلول ها با قدرت ۷۵ درصد طی ۵ سیکل (۱۵ ثانیه سونیکاسیون و ۳۰ ثانیه در یخ) توسط فرآیند سونیکاسیون شکسته شدند. سلول ها مجدداً برای مدت زمان ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm سانتیفریوژ شدند. فاز محلول و غیر محلول بر روی ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸٪ الکتروفورز گردیدند [۱۹].

## ۲-۵. محلول سازی کنجاله های نامحلول

برای محلول سازی بخش نامحلول سلولی از اوره با غلظت های ۶ و ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار به عنوان عوامل احیا کننده استفاده گردید. هر یک از این مواد به صورت مجزا به نسبت ۱/۵ حجم اولیه رسوب سلولی به آن اضافه گردیدند. نمونه ها به مدت ۱ ساعت

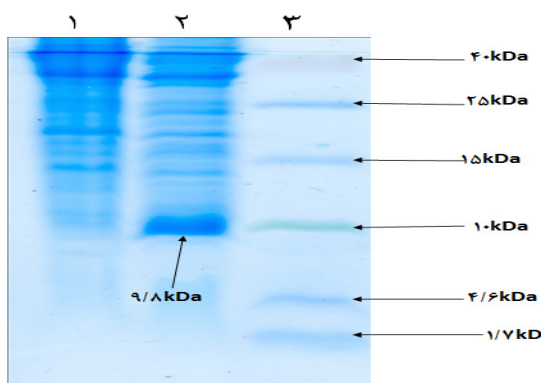
<sup>۱</sup> PBS, 0.1% (v/v) Tween 20, 1% (w/v) skim milk



**تصویر ۱.** الگوی الکتروفورز ژل آگاروز ۳ درصد، تأیید حضور ژن EGF بهینه شده در وکتور بیانی pET21a-EGF. ردیف ۱: نشان گر اندازه مولکولی DNA. ردیف ۲: پلاسمید pET21a-EGF برش نخورده. ردیف ۳: پلاسمید pET21a-EGF برش خورده با آنزیم های BamHI و Hind III.

### ۳-۳. بیان EGF و بررسی بیان آن

پس از اطمینان از وجود ژن در پلاسمید مورد نظر، فرآیند بیان در شرایط ۱ میلی مولار IPTG و القاء ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس محلول رویی به همراه رسوب در ژل تریسین ۱۸ درصد الکتروفورز شد و ژل توسط رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شد (تصویر ۲). افزایش وزن ایجاد شده در پروتئین نوترکیب به علت وجود T7-Tag پیش از توالی اصلی hEGF و وجود his<sub>6</sub>-Tag در انتهای کربوکسیل توالی آن می باشد که موجب افزایش وزن پروتئین از ۶/۲ کیلودالتون به ۹/۸ کیلودالتون شده است.



**تصویر ۲.** الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸ درصد. ردیف ۱: نمونه القاء نشده. ردیف ۲: نمونه القاء شده با IPTG.

با بررسی بیان مشخص گردید که این پروتئین به صورت کنجاله های نامحلول تولید شده است. به دلیل اینکه این پروتئین پس از تاخوردگی در ساختار فضایی خود دارای ۳ پیوند دی سولفیدی

### ۲-۸. سنجش فعالیت EGF نوترکیب

دودمان سلولی فیروبلاستی موش سوئیسی (NIH-3T3) از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. جهت آماده سازی سلول ها برای انجام تست، ابتدا سلول ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS در دمای ۳۷ درجه در غلظت ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند و برای رسیدن به شرایطی رشد مطلوب چندین مرتبه پاساژ داده شدند. پاساژ سلولی با استفاده از PBS محتوی تریسین ۰/۰۱۲۵٪ و EDTA ۰/۱٪ انجام شد. تعداد ۱×۱۰<sup>۵</sup> سلول در حالی که در محیط پایه آماده شده بودند به چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانهای کشت سلول اضافه گردید. EGF نوترکیب و استاندارد در سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم به میکروپلیت های مجزا اضافه گردید.

همچنین به یکی از میکروپلیت ها هیچ گونه EGFی اضافه نگردید تا به عنوان شاهد ایفای نقش کند. سلول ها در دمای ۳۷ درجه در محیط حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس ماده متیل تیازولیل دی فنیل تترازولیم بروماید (MTT) محلول در PBS به هر یک از چاهک ها اضافه گردید. میکروپلیت ها برای مدت ۴ ساعت تحت شرایط قبلی تیمار شدند.

پس از پایان انکوباسیون، محیط کشت حذف گردید و کریستال های فورمازان ایجاد شده در ۱۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل گردیدند. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر طی سه روز متوالی انجام شد. منحنی فعالیت زیستی پروتئین به صورت محور افقی نمایان گر میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر و محور عمودی نمایان گر غلظتی از فاکتور رشد بود که مورد استفاده قرار گرفت.

### ۳. نتایج و بحث

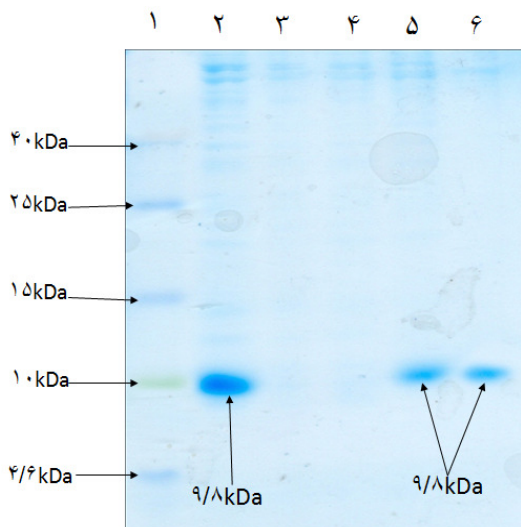
#### ۳-۱. آنالیزهای بیوانفورماتیکی بر روی ژن کدکننده پروتئین

##### EGF انسانی

ابتدا توالی دقیق نوع وحشی ژن کدکننده hEGF از پایگاه بیوانفورماتیکی NCBI اقتباس گردید. پس از بررسی توالی، تغییر کدون ها بر اساس ترجیح کدونی میزان مورد نظر توسط شرکت سازنده ژن انجام شد و ژن به صورت صنعتی در وکتور (+) pET21a تهیه گردید.

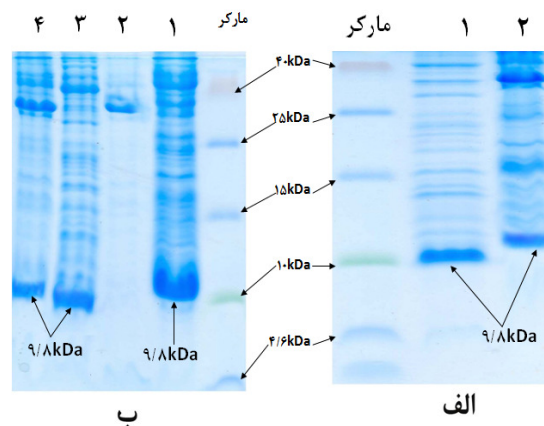
#### ۳-۲. تراریخت نمودن باکتری E. coli BL21-DE3

پس از تراریخت نمودن سلول های *E. Coli* با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن صنعتی، به منظور تأیید حضور ژن در وکتور (+) pET21a، پلاسمید مذکور تخلیص و با آنزیم های BamHI و HindIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و قطعه ۱۵۹ جفت بازی در ژل آگارز پدیدار شد که بیان گر حضور ژن مذکور بود (تصویر ۱).



**تصویر ۴.** الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸ درصد. تخلیص EGF نو ترکیب توسط ستون نیکل. ردیف ۱: نمونه محتوی پروتئین قبل از عبور از ستون. ردیف ۲: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر شماره ۲ (ایمیدازول ۴۰). ردیف ۳: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر شماره ۳ (ایمیدازول ۱۷۰). ردیف ۴: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر شماره ۴ (ایمیدازول ۲۵۰). ردیف ۵: نمونه حاصل از شستشوی ستون توسط بافر MES.

می‌باشد، احتمال بیان آن به صورت محلول بسیار پائین است. لذا فرآیند محلول سازی پروتئین از فاز نامحلول سلول با به کارگیری روش‌های مختلف صورت پذیرفت. به همین منظور از عوامل احیا کننده اوره ۶ مولار (تصویر ۳-الف) و اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار (تصویر ۳-ب) برای محلول سازی استفاده شد. در نهایت بیشترین محلول سازی با به کارگیری عامل احیاء کننده گوانیدین هیدروکلراید در غلظت ۶ مولار به دست آمد.



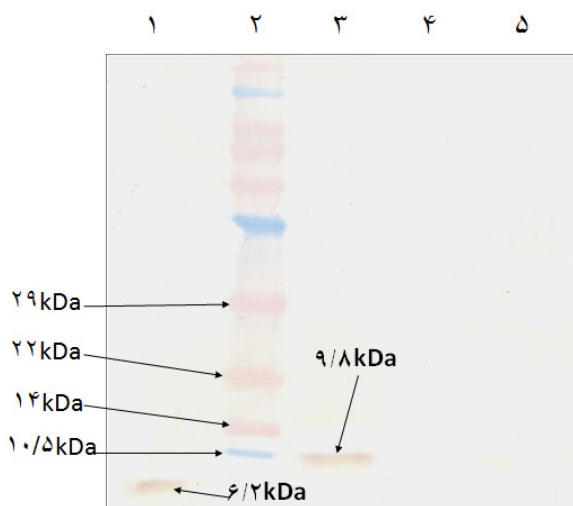
**تصویر ۳.** الف) الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸٪، بررسی محلول سازی با اوره ۶ مولار. ردیف ۱: فاز محلول. اوره ۶ مولار. ردیف ۲: فاز غیر محلول اوره ۶ مولار. ب) الگوی الکتروفورز ژل تریسین پلی آکریل آمید ۱۸٪، بررسی محلول سازی EGF نو ترکیب توسط اوره ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار. ردیف ۱: فاز محلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار. ردیف ۲: فاز غیر محلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار. ردیف ۳: فاز محلول اوره ۸ مولار. ردیف ۴: فاز غیر محلول اوره ۸ مولار.

### ۴-۳. تخلیص پروتئین بیان شده

پس از محلول سازی پروتئین، تخلیص از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی و با استفاده از ستون Ni-NTA agarose resin صورت گرفت. با بررسی نمونه و بافرهای عبور داده شده از ستون بر روی ژل تریسین مشخص گردید که بافرهای شستشوی چهارم (محتوی ایمیدازول با غلظت ۲۵۰ میلی مولار) و بافر MES قادر به جدا نمودن پروتئین از ستون نیکل هستند (تصویر ۴).

### ۵-۳. تأیید پروتئین با استفاده از لکه گذاری وسترن

پس از تخلیص، صحت پروتئین بیانی با استفاده از روش لکه گذاری وسترن مورد تأیید قرار گرفت که نتایج در شکل (۵) نمایش داده شده است.



**تصویر ۵.** الگوی لکه گذاری وسترن پروتئین hEGF. ردیف ۱: hEGF استاندارد. ردیف ۲: نشانگر مولکولی پروتئین. ردیف ۳: بند مربوط به تأیید پروتئین hEGF نو ترکیب ۹/۸ کیلوالتونی. ردیف ۴: نمونه القاء نشده. ردیف ۵: BSA به عنوان کنترل استاندارد وسترن بلات.

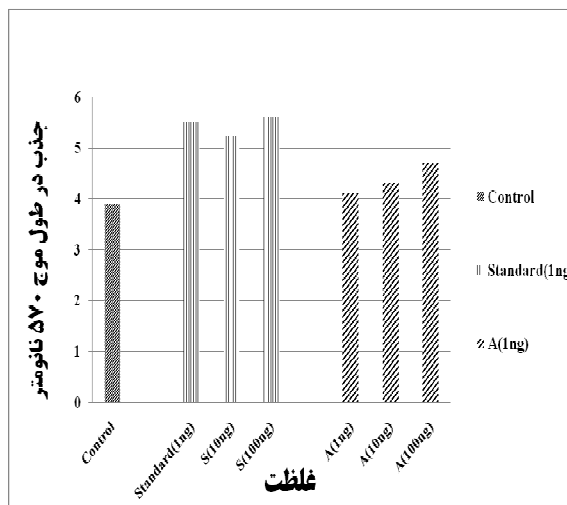
### ۳-۶. سنجش فعالیت فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب

به منظور اطمینان از تاخوردگی صحیح hEGF در محیط مائی، میزان توانایی آن بر تکثیر دودمان سلولی NIH-3T3 مورد ارزیابی قرار گرفت. در این سنجش از تست استاندارد MTT استفاده گردید. سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند که به ترتیب عبارت بودند از: نمونه شاهد، نمونه EGF استاندارد و نمونه EGF نو ترکیب ۹/۸ کیلودالتونی که طی این پژوهش تولید شده بود. به میکروپلیت شاهد هیچ فاکتور رشدی اضافه نگردید.

به یکی از میکروپلیت‌های نمونه، hEGF استاندارد نو ترکیب تولیدی شرکت Peptrotech آمریکا در سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم اضافه گردید و به میکروپلیت دیگر فاکتور رشد اپیدرمی نو ترکیب که طی این پژوهش تولید شده بود در سه غلظت ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم اضافه گردید.

OD سلول‌ها طی جدول زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار با hEGF توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید. در نهایت پس از ثبت داده‌ها و تهیه نمودار مربوط به این تست (نمودار ۱)) مشخص گردید که hEGF نو ترکیب تولید شده طی این پژوهش (نمونه A) دارای فعالیت مناسبی در حدود نوع نو ترکیب تجاری این پلی پپتید می باشد.

یک آنالیز آماری برای محاسبه فعالیت ویژه hEGF با استفاده از ODهای حاصل از تست MTT در مورد دُزهای ۱۰۰ ng از نمونه hEGF نو ترکیب تولید شده در این پژوهش در مقایسه با hEGF استاندارد انجام شد که نشان داد hEGF نو ترکیب دارای فعالیت ویژه‌ای برابر ۸۳/۹٪ از ۱۰۰٪ فعالیت hEGF استاندارد می باشد.



نمودار ۱. نمودار نتایج حاصل از تست استاندارد MTT در روز سوم از کشت سلول‌های تیمار شده با EGF استاندارد و EGF نو ترکیب حاصل از این پژوهش (A).

فراوانی کم hEGF در منابع طبیعی موجب شده که استفاده از آن عملاً در کاربردهای پزشکی امکان پذیر نباشد. لذا محققین از سال ۱۹۸۸ روی به تولید نوع نو ترکیب این پروتئین در موجودات تراریخت آوردند.

تا کنون اکثر کارهای پژوهشی که در آنها اقدام به تولید فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب شده، از سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* استفاده گردیده است [۱۵-۱۱]. از آنجائی که در مطالعات قبلی مانند مطالعه ابراهیمی راد و همکاران از ژن وحشی hEGF به منظور بیان نو ترکیب پروتئین hEGF استفاده گردید و با توجه به اینکه بیان پروتئین hEGF (با در نظر گرفتن اینکه یک پروتئین یوکاریوتی است) به شکل سیتوپلاسمی در باکتری *E. coli* از ژن وحشی بسیار پائین بود (۰/۹ μg/l) [۱۳]، لذا ما را بر آن داشت تا در این پژوهش، ژن فاکتور رشد اپیدرم انسانی را پس از بهینه‌سازی توالی آن بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی (باکتری *E. coli*) به صورت صنعتی تهیه کنیم.

پس از بهینه‌سازی کدون‌ها، در مجموع ۲۸ نوکلئوتید از مجموع ۱۵۹ نوکلئوتید و ۲۷ کدون از بین ۵۳ کدون تغییر یافت. با توجه به اینکه ژن hEGF بین جایگاه‌های برشی BamH I و Hind III موجود در MCS وکتور pET21a(+) و بدون در نظر گرفتن کدون پایان در انتهای توالی ژن سنتز و همسان‌سازی شده بود، اضافه شدن نوکلئوتیدهای توالی T7-Tag به انتهای آمین توالی hEGF و اضافه شدن نوکلئوتیدهای His<sub>6</sub>-Tag به انتهای کربوکسیل آن، موجب افزایش وزن پروتئین hEGF از ۶/۲ کیلودالتون به ۹/۸ کیلودالتون شد. در مطالعات متعددی توالی‌های اضافی به ژن hEGF به منظور تخلیص بر اساس اصول کروماتوگرافی تمایلی یا بیان پروتئین به شکل پری پلاسمی فیوژ شده است که این امر باعث افزایش وزن پروتئین به بیش از اندازه طبیعی آن و حتی در بیشتر موارد، بیش از اندازه مشاهده شده در پروتئین حاصل از این پژوهش شده است [۲۳، ۱۵-۱۳ و ۱۱].

بیان نو ترکیب پروتئین در باکتری *E. coli* تحت شرایط استاندارد صورت پذیرفت. با توجه به حضور یون تریسین در بافر کاتد فن الکتروفورز تریسین که باعث حرکت منظم بندهای پروتئین جهت تفکیک بهتر پروتئین‌ها و همچنین درصد بالاتر آکریل آمید و بیس آکریل آمید در تهیه این نوع ژل، برای اولین بار از این فن برای الکتروفورز hEGF استفاده گردید [۲۴]. در همه مطالعات قبلی از ژل SDS-PAGE با درصد‌های بالا (۲۲-۲۵ درصد) به منظور الکتروفورز EGF استفاده شده بود که این موجب کاهش کیفیت بندها روی ژل می شد. همان طور که در تصویر (۳) دیده می شود، بند hEGF در نمونه رسوب آورده ۶ و ۸ مولار نسبت به بند hEGF در نمونه محلول آورده اندکی بالاتر ظاهر شده است که به دلیل نامعلوم این اتفاق می افتد. همچنین در بند EGF محلول شده توسط گوانیدین نیز این

#### ۴. نتیجه گیری

در این تحقیق، به منظور بیان و تولید آزمایشگاهی فاکتور رشد اپیدرم انسانی به شکل نو ترکیب در باکتری *E. coli* از ژن کدکننده این پروتئین که پس از بهینه سازی کدون های آن بر اساس ترجیح کدونی میزبان بیانی به شکل صناعی تهیه گردیده بود، استفاده شد که بیان بالای این ژن در مقایسه با نتایج دیگران که در آنها از ژن وحشی کدکننده hEGF استفاده شده است، به اثبات رسید. دنباله هیستیدینی اضافه شده به انتهای کربوکسیل توالی hEGF شرایط را برای تخلیص ساده و کم هزینه آن نیز فراهم نمود. آزمایش استاندارد MTT مشخص کرد که پروتئین hEGF از فعالیت مناسب جهت القاء تقسیم سلولی برخوردار است و می توان از آن در آزمایش های مکمل بهره گرفت.

#### ۵. مراجع

- [1] Boateng, J. S.; Matthews, K. H.; Stevens, H. N.; Eccleston, G. M. "Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems."; J. Pharm. Sci. 2008, 97, 2892-923.
- [2] Vachkova, G.; Bivolarski, B. L. "Origin, Structure and Physiological Role of the Epidermal Growth Factor."; Bulgarian Journal of Veterinary Medicine 2007, 10, 223-233.
- [3] Mercola, M.; Stiles, C. D. "Growth Factor Superfamilies and Mammalian Embryogenesis."; Development 1988, 102, 451-460.
- [4] Kane, M. T.; Morgan, P. M.; Coonan, C. "Peptide Growth Factors and Preimplantation Development."; Hum. Reprod. Update. 1997, 3, 137-157.
- [5] Yu, F. S.; Yin, J.; Xu, K.; Huang, J. "Growth Factors and Corneal Epithelial Wound Healing."; Brain Res. Bull. 2010, 81, 229-235.
- [6] Xian, C. J. "Roles of Epidermal Growth Factor Family in the Regulation of Postnatal Somatic Growth."; Endocr. Rev. 2007, 28, 284-296.
- [7] Cohen, S. "Epidermal Growth Factor."; Bioscience report 1986, 8, 1017-1028.
- [8] Carpenter, G.; Cohen, S. "Epidermal Growth Factor."; Rev. Biochem. 1979, 48, 193-216.
- [9] Gregory, H. "Isolation and Structure of Urogastrone and its Relationship to Epidermal Growth Factor."; Nature 1975, 257, 325-327.
- [10] Konturek, J. W.; Bielanski, W.; Konturek, S. J.; Bogdal, J.; Oleksy, J. "Distribution and Release of Epidermal Growth Factor in Man."; Gut. 1989, 30, 1194-1200.
- [11] Engler, D. A.; Matsunami, R. K.; Campion, S. R.; Stringer, C. D.; Stevens, A.; Niyogi, S. K. "Cloning of Authentic Human Epidermal Growth Factor as a Bacterial Secretory Protein and Its Initial Structure-Function Analysis by Site-directed Mutagenesis."; J. Biol. Chem. 1988, 263, 12384-12390.
- [12] Yoon, C. S.; Lee, E. G.; Lee, Y. S.; Chung, Y. "Expression of Recombinant Epidermal Growth Factorin *E. coli*."; Biotechnol. Bioprocess Eng. 1997, 2, 86-89.
- [13] Ebrahimi-Rad, M.; Azarnoosh, M.; Bashir, A.; Bakayev, V. V. "A Novel Vector for Expression/Secretion of Properly Folded Eukaryotic Proteins: a Comparative Study on Cytoplasmic and Periplasmic Expression of Human Epidermal Growth Factor in *E. coli*."; Iranian Biomedical Journal 2004, 8, 51-61.

اتفاق افتاده است اما آنچه مهم است این است که بند EGF در اوره و گوانیدین محلول می باشد که قابلیت کاربرد آن را در مطالعات بعدی ممکن می سازد.

به علت اینکه پروتئین hEGF نو ترکیب تولید شده در این تحقیق در انتهای توالی دارای دنباله هیستیدینی بود، از روش کروماتوگرافی تمایلی و ستون نیکل برای تخلیص آن استفاده شد. این روش تخلیص دارای یک سری از مزیتها نسبت به سایر روش هایی که تاکنون جهت دستیابی به hEGF نو ترکیب خالص توسط سایر محققین از قبیل تخلیص با HPLC، امتزاج ژن به یک توالی نشانه مانند phoA، اینتئین،  $\beta$ -لاکتاماز و گلو تاتیون S-ترانسفراز می باشد، که از آن جمله می توان به دستیابی مقادیر بالای پروتئین با یک فرآیند کوتاه مدت و کم هزینه با تعداد محدودی مرحله اشاره نمود [۲۴].

در نهایت پس از تخلیص پروتئین با ستون نیکل میزان ۱/۷ میلی گرم بر میلی لیتر hEGF نو ترکیب از ۵۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی میزبان القاء شده حاصل گردید. در مطالعات مشابه که از ژن وحشی hEGF به منظور تولید نو ترکیب این پروتئین استفاده گردید، میزان بیان بسیار اندکی از پروتئین به وقوع پیوست که ارزش ادامه کار به منظور تولید آن را در مقیاس های بالا را نداشت و مقایسه این چنین مطالعاتی با مطالعه حاضر، ارزش کار با ژن hEGF را که توالی آن بر اساس ترجیح کدونی باکتری *E. coli* بهینه شده است را آشکار می سازد [۱۳]. جهت بررسی و سنجش فعالیت زیستی hEGF نو ترکیب از تست استاندارد MTT استفاده شد. در این آزمایش میزان توانایی پروتئین بر تکثیر سلول هایی که بر سطح خود دارای گیرنده EGF بودند در مقایسه با نمونه استاندارد hEGF و نمونه شاهد بررسی گردید و مشخص شد که این پروتئین علی رغم تغییر طول توالی، با توجه به کسب تاخوردگی فضایی مناسب خود قادر به اتصال به گیرنده اش بر سطح سلول های هدف و القاء دیمیرزاسیون آن و در نهایت موجب انجام چرخه سلولی می شود.

اختلاف فعالیت hEGF تولید شده در این تحقیق با توجه به وجود قطعه اضافی در مقایسه با نوع استاندارد آن خیلی قابل ملاحظه نبود که این مسئله جالب توجه می باشد، در صورتی که در مورد پروتئین EGF ای که ابراهیمی راد و همکاران به صورت سیتوپلاسمی تولید نمودند، تنها میزان ۱۷ درصد فعالیت پروتئین در قیاس با فعالیت نمونه استاندارد گزارش شده است [۱۳]. چنانچه آزمایشات مکمل عدم وجود اثرات جانبی این محصول را تأیید کنند، می توان از همین محصول برای انجام مطالعات بالینی استفاده نمود. با مشخص شدن فعالیت زیستی مناسب hEGF نو ترکیب، می توان بسیاری از داروها بر پایه آن برای ترمیم زخم های ناشی از صدمات فیزیکی و شیمیایی را بنیان نهاد.

- [19] Bollag, D. "Protein Methods."; Wiley-LISS.1992; 45-160.
- [20] "Recombinant Protein Purification Handbook. Principles and Methods."; Invitrogen, Chapter 4, 103-110, 2009.
- [21] "Current Protocols in Molecular Biology."; Green Publishing Associates and wileg-Interscience. John Wiley. chapter 10, 1987.
- [22] Sylvester, P. W. "Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability Drug Design and Discovery."; Methods in Molecular Biology 2011, 716, 157-168.
- [23] Esipov, R. S.; Stepanenko, V. N.; Chupova, L. A.; Boyarskikh, U. A.; Filipenko, M. L.; Miroshnikov, A. I. "Production of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Using Ssp dnaB Mini-Intein System."; Protein Expr. Purif. 2008, 61, 1-6.
- [24] Garfin, D. E. "Gel Electrophoresis of Protein."; Oxford University Press. Chapter 7, 197-268, 2003.
- [14] Abdull Azis, A. F.; Ismail, E. N.; Hambali, Z.; Abdullah, M. N.; Ali, A. M.; Mohd Lila, M. A. "The Periplasmic Expression of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (hEGF) in *Escherichia coli*."; Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotech. 2006, 14, 41-45.
- [15] Ferrer Soler, L.; Cedano, J.; Querol, E.; de Llorens, R. "Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor Using Different Expression Systems."; J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003, 788, 113-123.
- [16] Topczewska, J.; Bolewska, K. "Cloning and Expression of the hEGF Gene in *Saccharomyces Cervisiae*."; Acta Biochim. Pol. 1993, 40, 4-7.
- [17] Cheung, Q. C.; Yuan, Z.; Dyce, P. W.; Wu, D.; DeLange, K.; Li, J. "Generation of Epidermal Growth Factor Expressing *Lactococcus lactis* and its Enhancement on Intestinal Development and Growth of Early-Weaned Mice."; Am. J. Clin. Nutr. 2009, 89, 871-9.
- [18] Sambrook, J.; Mac Callum, P.; Russell, D. "Molecular Cloning A Laboratory Manual."; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; Third edition: Chapter 1-5-6-8-12-13.