

Production of Recombinant Human Epidermal Growth Factor and Assessment of its Activity in Cell Viability

Sara Pouranvari¹,
Firouz Ebrahimi²,
Gholamreza Javadi³,
Bozorgmehr Maddah⁴

¹ Ph.D in Molecular Genetics, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Faculty of Basic Sciences, Biology Research Center, Imam Hussein University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Imam Hussein University, Tehran, Iran

(Received April 25, 2015 ; Accepted June 5, 2015)

Abstract

Background and purpose: Human epidermal growth factor (hEGF) is a polypeptide of 53 amino acids with various medical application such as wound healing. The purpose of this study was cloning, expression, and purification of recombinant human EGF (rhEGF) and assessment of its mitogenic effect on NIH 3T3 cells.

Materials and methods: Subcloning of *hEGF* was performed in to pET24a (+). Protein expression was done under standard conditions. According to the protein expression as inclusion body, mild solubilization using alkaline pH buffer was utilized for protein solubilization. Ultimately, after refolding of solubilized proteins, MTT assay was performed to assess the mitogenic effect of rhEGF in NIH 3T3 cells treated with various concentrations of rhEGF.

Results: Mild solubilization of inclusion bodies with alkaline buffer and subsequent refolding had a very high efficiency. MTT assay showed that cells treated with our rhEGF exhibited significantly higher proliferation compared to control after 72 h ($P < 0.0001$).

Conclusion: It seems cytoplasmic expression system is an efficient system for production of recombinant hEGF. The method presented in this study is a simple, accessible, affordable and of high efficiency for solubilization of inclusion bodies which is also helpful in achieving bioactive form of human epidermal growth factor.

Keywords: Recombinant epidermal growth factor, solubilization, MTT assay, NIH 3T3 cell line

تولید آزمایشگاهی فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب و ارزیابی عملکرد آن در بقای سلولی

سارا پورانوری^۱
فیروز ابراهیمی^۲
غلامرضا جوادی^۳
بزرگمهر مداح^۴

چکیده

سابقه و هدف: فاکتور رشد اپیدرم انسانی (hEGF)، پلی پپتیدی دارای ۵۳ اسید آمینه است که کاربردهای وسیعی در پزشکی و به ویژه ترمیم زخم دارد. هدف از این پژوهش، همسانه سازی، بیان و تخلیص hEGF نو ترکیب و بررسی اثر میتوژنیک آن بر دودمان سلولی NIH3T3 بود.

مواد و روش‌ها: زیرهمسانه سازی ژن *hEGF* درون وکتور pET24a صورت گرفت. بیان پروتئین تحت شرایط استاندارد صورت گرفت. از آن جایی که بیان پروتئین به صورت کنجاله‌های نامحلول بود، محلول سازی ملایم با استفاده از بافری با pH قلیایی صورت گرفت. در نهایت و پس از ایجاد تاخوردگی مجدد، اثر میتوژنیک این پروتئین در غلظت‌های مختلف بر دودمان سلول NIH3T3 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: محلول سازی ملایم کنجاله‌های نامحلول با بافر قلیایی و پس از آن انجام تاخوردگی مجدد دارای بازده بسیار بالایی بود. نتایج آزمون MTT، نشان داد که سلول‌های تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرمی بیان شده در این تحقیق، پس از گذشت ۷۲ ساعت، به طور معنی داری درصد بقاء بیش تری نسبت به کنترل ($P < 0/0001$) نشان دادند.

استنتاج: به نظر می‌رسد که سیستم بیان سیتوپلاسمی به کار برده شده در این تحقیق، برای تولید فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب زیست فعال کارآمد باشد. روش ارائه شده در این تحقیق، روشی آسان، در دسترس، مقرون به صرفه و با بازده بالا برای محلول سازی کنجاله‌های نامحلول و به دست آوردن شکل زیست فعال فاکتور رشد اپیدرم انسانی می‌باشد.

واژه های کلیدی: فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب، محلول سازی، آزمون MTT، دودمان سلولی NIH3T3

مقدمه

م تفاوت از نوع موشی آن می‌باشد (۱). فاکتور رشد اپیدرم انسانی به واسطه تحریک رشد و تکثیر انواع مختلفی از سلول‌ها به صورت درون تنی (*In vivo*) و برون تنی (*In vitro*)، دارای کاربردهای گسترده‌ای در زمینه‌های بالینی و بهداشتی-آرایشی می‌باشد (۲).

فاکتور رشد اپیدرم انسانی Human Epidermal Growth Factor (hEGF) پلی پپتیدی دارای ۵۳ اسید آمینه با وزن مولکولی ۶۲۰۰ دالتون می‌باشد. فاکتور رشد اپیدرمی انسانی تقریباً مشابه نوع موشی آن بوده و در ۱۶ جایگاه دارای اسید آمینه‌های

E-mail: febrhimi@ihu.ac.ir

مؤلف مسئول: فیروز ابراهیمی - تهران: اتوبان شهید بابایی، دانشگاه امام حسین (ع)، گروه و مرکز تحقیقات زیست شناسی

۱. PhD رشته ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۴. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۲/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۱۵

فاکتور رشد اپیدرمی هم‌چنین باعث افزایش ساخت پروتئین و RNA در سلول‌های اپیدرمی (۳)، ترمیم جراحات‌های قرنیه، زخم معده و مانع تکثیر سلول‌های سرطان معده در انسان می‌شود (۴). علاوه بر این، دارای اثر میتوژنیک بوده و باعث افزایش تکثیر سلول‌های کراتینوسیت، فیبربلاست و اپیتلیال به صورت درون‌تنی و برون تنی می‌شود (۵).

از زمان کشف فاکتور رشد اپیدرم انسانی به‌عنوان یک ماده التیام بخش زخم و یک عامل تحریک‌کننده رشد، تولید مقادیر کافی از آن برای کاربردهای پزشکی هدف بسیاری از تحقیقات قرار گرفت. در گذشته، روش‌های سنتی از قبیل بازیافت فاکتور رشد اپیدرم انسانی از ادرار، از طریق مراحل پیچیده انجام گرفت (۶). هرچند این پروژه به واسطه عدم تولید مقادیر کافی فاکتور رشد اپیدرم انسانی هم‌وزن و دارای کیفیت بالا برای کاربردهای پزشکی، با شکست رو به رو شد.

تلاش‌های ابتدایی برای بیان نوترکیب این پروتئین در سال ۱۹۸۸ میلادی صورت پذیرفت. در این مطالعه، ژن *hEGF* به همراه توالی نشانه *phoA* (آلکالین فسفاتاز) برای بیان پری‌پلاسمی پروتئین به صورت صنعتی تهیه شده و در وکتور بیانی pFL142 همسانه سازی گردید. وکتور نوترکیب به باکتری *E. coli* سوش JM107 منتقل گردید (۷). در مطالعه دیگری، بخش عملکردی کدکننده این پروتئین (متشکل از ۱۵۹ نوکلئوتید) به دست آمد و پس از همسانه سازی این قطعه در حامل pQE30، آن را به باکتری *E. coli* سویه M15 انتقال دادند (۸). پس از آن و در سال ۲۰۰۳، فرآیند همسانه‌سازی *hEGF* در سه حامل بیانی pET-22b(+), pET-21b(+), و pET-32b(+), انجام شد و پروتئین حاصل از هر کدام از سیستم‌های بیانی مختلف بیان شده در میزبان *E. coli* BL21 (DE3) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۹). گروه تحقیقاتی دیگری در سال ۲۰۰۶ با استفاده از توالی نشانه *OmpA*، موفق به بیان پری‌پلاسمی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی در باکتری *E. coli* شدند. علاوه بر این ابراهیمی

و همکاران در سال ۲۰۱۲ موفق به بیان فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب به دو صورت ۹/۸ و ۶/۴ کیلودالتونی شدند. در مورد شکل ۹/۸ کیلودالتونی اضافه شدن نوکلئوتیدهای توالی T7-Tag به انتهای آمین و نوکلئوتیدهای His₆-Tag به انتهای کربوکسیل ژن *hEGF*، موجب افزایش وزن پروتئین از ۶/۲ کیلودالتون به ۹/۸ کیلودالتون شد. سپس به منظور حذف فیوژن‌های T7-Tag و His₆-Tag، همسانه سازی ژن *hEGF* در وکتور pET28a انجام شد و پروتئینی با ۵۵ اسید آمینه ایجاد شد (۱۰). ایمنی استفاده از فاکتور رشد اپیدرمی نیز با انجام آزمایش‌هایی برای بررسی سمیت آن مورد تایید قرار گرفته است (۱۱). ولی استفاده سیستمیک آن با توجه به اثر آن در تحریک تومورزایی و رشد غیر طبیعی سلول‌های اپیتلیال، محدود شده است (۱۲). با توجه به اهمیت فاکتور رشد اپیدرمی در درمان زخم‌های پوستی از جمله زخم‌های ناشی از سوختگی و هم‌چنین زخم پای دیابتی، به دست آوردن این فاکتور رشد، به صورت نوترکیب بسیار ارزشمند می‌باشد. در این تحقیق، بیان و تخلیص فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب با تعداد اصلی اسید آمینه و بررسی اثر میتوژنیک آن بر دودمان سلولی NIH3T3 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت‌های مرک (آلمان) و سیگما (آمریکا) خریداری شدند. پلاسمید pET24a و سوش باکتری *E. coli* BL21 star (DE3) از شرکت نواژن (آمریکا) تهیه شدند. آنزیم‌های محدودالثر *NdeI* و *EcoRI* و آنزیم *Pfu* DNA polymerase از شرکت فرمتاز (لیتوانی) تهیه شدند. آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ضد فاکتور رشد اپیدرم انسانی و هم‌چنین کونژوگ موشی از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد. فاکتور رشد اپیدرم انسانی تجاری، از شرکت پیروتک (آمریکا) خریداری

۰/۲) پیکومول) صورت گرفت. پس از آزمایش‌های متعدد، شرایط بهینه شده واکنش PCR، مطابق با جدول شماره ۱ اجرا شد. پس از انجام واکنش PCR، تکثیر قطعه مورد نظر با انجام الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۳ درصد تایید شد.

جدول شماره ۱: برنامه بهینه شده PCR با آنزیم Pfu DNA polymerase برای ژن *hEGF*

طول شدن نهایی	مراحل PCR (۳۵ سیکل)			دنا تورا سیون اولیه
	تطویل	اتصال	دنا تورا سیون	
۵ دقیقه ۷۲ °C	۴۵ ثانیه ۷۲ °C	۴۵ ثانیه ۶۷ °C	۳۰ ثانیه ۹۴ °C	دقیقه ۹۴ °C

تاریخ کردن میزبان

پس از انجام هضم دو گانه آنزیمی محصول PCR و پلاسمید pET24a به طور جداگانه با آنزیم‌های محدودالانتر *NdeI* و *EcoRI* و سپس تخلیص آن‌ها، غلظت آن‌ها با دستگاه پیکودراپ اندازه گیری شد و فرایند الحاق ژن *hEGF* با وکتور pET24a توسط آنزیم T4 DNA Ligase به مدت نیم ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد انجام گرفت. برای تهیه سلول‌های مستعد *E. coli* سوش BL21 star (DE3) از روش شیمیایی (تیمار با کلرید کلسیم و کلرید منیزیم در حضور سرما) استفاده شد و سپس این پلاسمید نو ترکیب با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد انتقال داده شد. در مرحله آخر سلول‌های میزبان تاریخ شده بر روی محیط LB آگاردار (جامد) حاوی کانامایسین (به غلظت ۸۰ μg/ml) کشت داده شدند.

بررسی صحت همسانه سازی

برای بررسی صحت همسانه‌سازی، ابتدا تعدادی کلونی انتخاب و پس از نمونه برداری از آن‌ها در محیط‌های LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. پس از تخلیص پلاسمید، برای تأیید صحت همسانه‌سازی، سه روش PCR با پرایمرهای طراحی شده برای ژن، هضم آنزیمی پلاسمید استخراج شده با آنزیم‌های *NdeI* و *EcoRI* و تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای عمومی T7 Promoter و وکتور pET مورد استفاده قرار گرفتند.

شد. نشانگرهای پروتئینی با شماره کاتالوگ SM1861 از شرکت فرمتناز و شماره کاتالوگ SM7012 از شرکت سیناکلون خریداری شدند.

ساخت سازه *pET24a-hEGF* (زیر همسانه سازی ژن *hEGF* در وکتور *pET24a*)

در نتیجه مطالعه‌ای در مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه امام حسین (ع) (۱۰) سازه pET28a-*hEGF* حاوی کدن یک اسید آمینه اضافی در انتهای آمین توالی بهینه شده *hEGF* (با شماره دسترسی AY548762.1) در اختیار ما قرار داده شد. در پژوهش حاضر، به منظور حذف اسید آمینه انتهای آمین، زیر همسانه‌سازی *hEGF* در pET24a صورت گرفت. برای این منظور، پس از استخراج پلاسمید pET28a و تایید و بررسی کیفیت آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد، طراحی پرایمر و انجام PCR به منظور جدا سازی و تکثیر ژن مورد نظر صورت گرفت. طراحی پرایمر به نحوی صورت گرفت که در انتهای 5' پرایمر مستقیم، جایگاه برش *NdeI* و در انتهای 5' پرایمر معکوس جایگاه برش *EcoRI* تعبیه گردد. هم چنین توالی نوکلئوتیدی کدون پایان نیز بر روی پرایمر معکوس در نظر گرفته شد. علاوه بر این در انتهای 5' هر دو پرایمر ۷ نوکلئوتید اضافی به عنوان قطعه آویزان برای نشست راحت تر آنزیم‌های محدودالانتر در نظر گرفته شد. توالی پرایمرها در ادامه آمده است.

پرایمر مس —————
 5'GAATCAACATATGAACTCTGACTCTGA
 ATGC3' با Tm برابر با ۶۹/۱ °C

پرایمر معک —————
 5'GTATCATGAATTCCTTAACGCAGTCC
 ACCA 3' با Tm برابر با ۶۹ °C

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل آنزیم Pfu DNA polymerase (۴ واحد آنزیمی)، dNTPs (۰/۲ میکرومولار)، MgSO₄ (۳ میکرومولار)، بافر آنزیم پلیمرز (با غلظت نهایی 1X)، پلاسمید استخراج شده (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) و پرایمرها

بیان پروتئین hEGF در باکتری *E. coli BL21(DE3)*

ابتدا مقدار ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مربوط به یک کلونی تایید شده در دو لوله حاوی ۵ میلی لیتر محیط LB حاوی ۸۰ $\mu\text{g/ml}$ کانامایسین اضافه شد و پس از رسیدن OD لوله‌ها به ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ nm در شرایط گرمادهی ۳۷°C و ۱۸۰ rpm، به یکی از لوله‌ها IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار در شرایط استریل اضافه و لوله دوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. لوله‌های نمونه و شاهد به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷°C و سرعت ۱۵۰ rpm در شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. در مرحله بعد پس از جمع آوری سلول‌ها، لیز کردن آن‌ها و جدا سازی فاز محلول و نامحلول از هم، بررسی پروتئین بیان شده روی ژل تریسین پلی اکریل آمید ۱۶ درصد صورت گرفت.

تأیید پروتئین بیان شده با روش لکه گذاری وسترن

برای تایید پروتئین نو ترکیب، از تکنیک وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال موشی ضد فاکتور رشد اپیدرم انسانی استفاده شد (۱۳). از پروتئین نو ترکیب تجاری به عنوان کنترل مثبت و از پروتئین آلبومین سرم گاوی^۱ (BSA) و نمونه لیز سلولی القاء نشده نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تخلیص پروتئین

از آن جایی که بیان پروتئین rhEGF به صورت کنجاله‌های نامحلول^۲ بود، باید به نحوی این اجسام نامحلول تخلیص و جدا می شدند. اساس روش به کار رفته، مراحل شستشو با دترجنت سدیم داکسی کولات و سانتریفیوژ پشت سر هم است که باعث تخلیص بیش از ۹۵ درصد کنجاله‌های نامحلول می شود (۱۴). در واقع در هر مرحله، مقداری از پروتئین‌ها وارد محلول رویی شده و دور ریخته می شد.

در مرحله بعد به منظور محلول سازی کنجاله‌های نامحلول، نمونه‌های ترسیب یافته به مدت ۱۲ ساعت در بافر محلول سازی متشکل از اوره ۲ مولار، EDTA ۰/۵ میلی مولار، Tris ۵۰ میلی مولار و سوکروز ۱۰ درصد دارای pH برابر با ۱۲/۵ قرار داده شد. پس از طی این مدت زمان، جهت ایجاد تا خوردگی مجدد^۳ در پروتئین‌های محلول شده، دیالیز بر علیه شیب کاهشی pH از ۱۲/۵ تا ۷/۲ انجام گرفت. برای این منظور بشر حاوی بافر و کیسه دیالیز محتوی نمونه روی به هم زن مغناطیسی قرار داده شد و بافر به طور دائم با استفاده از مگنت یکنواخت گردید. این کار در سردخانه با دمای ۴°C انجام شد و برای هر مرحله شیب کاهشی pH، مدت حداقل ۱۲ ساعت زمان داده شد. پس از طی این مراحل، محتویات کیسه دیالیز سانتریفیوژ شد و رسوب به دست آمده بر روی ژل SDS-PAGE Tricin ۱۶ درصد الکتروفورز شد. در مرحله بعد به منظور تخلیص نهایی پروتئین مورد نظر، محلول رویی به دست آمده از مرحله قبل، از فیلترهای آمیکون با منافذ ۵۰ و ۱۰ کیلودالتونی عبور داده شد که در نهایت منجر به حذف سایر پروتئین‌های باقی مانده و تخلیص کامل فاکتور رشد اپیدرمی نو ترکیب شد.

سنجش فعالیت زیستی فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب با استفاده از آزمون MTT^۴

آزمون MTT، آزمون کمی برای اندازه گیری میزان تکثیر سلول‌ها در مواجهه با عوامل مختلف می باشد (۱۵). ابتدا سلول‌های فیروبلاستی موش سوئیسی (NIH3T3) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید و جهت آماده سازی برای انجام تست، سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی^۵ (FBS) در دمای ۳۷°C در غلظت ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند. سلول‌ها برای رسیدن به

3. Refolding
4. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay
5. Fetal bovine serum

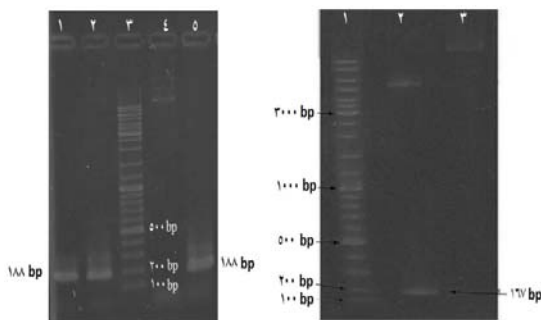
1. Bovin serum albomin
2. Inclusion body

یک طرفه و محاسبه P value انجام گرفت. معنی دار بودن اختلاف بقاء سلولی دو به دو گروه ها با هم، با آزمون Tukey's مقایسه شد.

یافته ها

همسانه سازی و بیان $hEGF$

پس از استخراج پلاسمید pET28a و جداسازی و تکثیر $hEGF$ با استفاده از واکنش PCR، الحاق ژن به وکتور و انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول های مستعد انجام گرفت. به منظور غربالگری کلونی های به دست آمده و تایید صحت همسان سازی، PCR با پرایمرهای طراحی شده برای ژن، صورت گرفت (تصویر شماره ۱-الف) و علاوه بر این هضم دوگانه آنزیمی با $EcoRI$ و $NdeI$ صحت همسان سازی را تایید کرد (تصویر شماره ۱-ب). در نهایت تعیین توالی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های تایید شده قبلی، هم ترازوی کامل بین پلاسمید تعیین توالی شده و توالی زیر همسان سازی شده و بنابراین صحت همسان سازی تایید شد. بعد از بیان پروتئین، فاز محلول و نامحلول حاصل از سانتریفوژ لیزیت سلولی، بر روی ژل SDS PAGE Tricin ۱۶ درصد الکتروفورز شده. همان طور که در تصویر شماره ۲-الف نشان داده شده است، باند بیانی مربوط به پروتئین مورد نظر در ستون مربوط به فاز نامحلول قابل رویت است و بنابراین بیان پروتئین به صورت کنجاله های نامحلول است.



تصویر شماره ۱: الف: الگوی الکتروفورز ژل آگارز ۳ درصد مربوط به آنالیز کلونی ها به روش PCR. ستون ۱ و ۲: محصول PCR حاصل از

شرایط رشد مطلوب چندین مرتبه پاساژ داده شدند. پاساژ سلولی با استفاده از PBS محتوی تریپسین (۰/۰۱۲۵ درصد) و EDTA (۱۰ درصد) انجام شد. تعداد 10^4 سلول در حالی که در محیط پایه آماده شده بودند به چاهک های میکروپلیت ۹۶ خانه ای کشت سلول اضافه گردید. فاکتور رشد اپیدرمی نو ترکیب حاصل از این پژوهش و نمونه تجاری به نحوی در محیط کشت پایه آماده شدند که پس از اضافه کردن مقادیر محاسبه شده از آن ها، در چاهک ها، چهار غلظت ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر وجود داشته باشد. در ضمن چاهک های بدون فاکتور رشد اپیدرمی هم به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. سلول ها در دمای $37^{\circ}C$ در محیط حاوی ۵ درصد CO_2 برای یعنی ۷۲ ساعت انکوبه شدند و پس از اتمام هر یک از این زمان ها محیط کشت مربوط به پلیت مربوطه تخلیه شده و ماده MTT محلول در PBS با غلظت ۰/۵ mg/ml به هر یک از چاهک ها اضافه گردید و میکروپلیت ها برای مدت ۳ ساعت تحت شرایط قبلی تیمار شدند. پس از تخلیه MTT، کریستال های فورمازان ایجاد شده در $150^{\circ}C$ میکرولیتر ایزوپروپانول حل شدند. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به کمک دستگاه الایزا ریدر اندازه گیری شد. درصد بقاء سلول های مورد بررسی که تحت تیمار با فاکتور رشد اپیدرمی نو ترکیب تهیه شده در این تحقیق قرار گرفته بودند، از رابطه ۲-۱ محاسبه شده و با درصد بقا سلول های تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرمی تجاری مقایسه شدند.

رابطه ۲-۱:

$$(\text{Cell viability})\% = \frac{OD \text{ of treated samples}}{OD \text{ of untreated sample as control}} \times 100$$

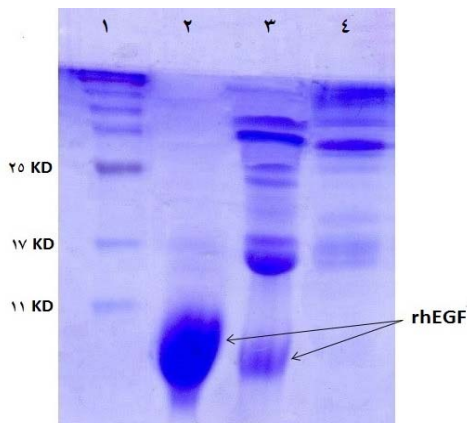
تجزیه و تحلیل های آماری

نتایج به دست آمده از آزمون MTT بر اساس حداقل سه تکرار استوار می باشد. محاسبات با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 6 و با آزمون ANOVA

بنابراین بازده مرحله محلول سازی و تاخوردگی مجدد در حد بسیار بالایی بود (تصویر شماره ۳). پس از تخلیص نهایی با استفاده از عبور از فیلتر آمیکون ۵۰ کیلودالتون و سپس ۱۰ کیلودالتون، نمونه خروجی از فیلتر ۱۰ کیلودالتونی بر روی ژل تریسین الکتروفورز شد و تک باند مربوط به فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب مشاهده شد.

بررسی فعالیت بیولوژیکی

در نهایت برای تایید این که فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب، به شکل صحیحی تاخوردگی پیدا کرده و بنابراین از لحاظ کارکردی فعال است، توانایی این پروتئین برای القاء تکثیر سلول‌های NIH3T3 با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج پس از ۷۲ ساعت ثبت شد (تصویر شماره ۴). نتایج نشان داد که پس از گذشت ۷۲ ساعت، درصد بقا سلول‌های تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میلی لیتر نسبت به کنترل معنی دار ($p < 0/0001$) بود ولی در غلظت ۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر نسبت به کنترل معنی دار نبوده است ($p > 0/05$).

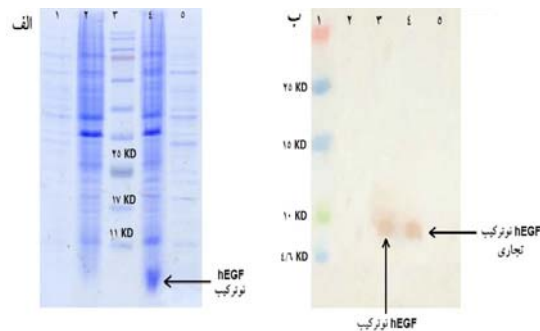


تصویر شماره ۳: الگوی الکتروفورز SDS PAGE ۱۸ درصد. تخلیص نهایی فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب با استفاده از فیلترهای آمیکون. ستون ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ستون ۲: نمونه خروجی از فیلتر آمیکون ۱۰ کیلودالتون. ستون ۳: نمونه خروجی از فیلتر آمیکون ۵۰ کیلودالتون. ستون ۴: رسوب حاصل از سانتریفیوژ محتویات کیسه دیالیز پس از تاخوردگی مجدد

تکثیر پلاسمیدهای تخلیص شده از کلونی‌های رشد یافته (با توجه به اضافه شدن توالی مربوط به پرایمرها به ابتدا و انتهای توالی، قطعه‌ای با طول ۱۸۸ bp ایجاد شده است). ستون ۳: نشانگر مولکولی. ستون ۴: کنترل منفی واکنش PCR. ستون ۵: کنترل مثبت واکنش PCR. ب: الگوی الکتروفورز آگارز ۳ درصد. آنالیز کلون‌ها به روش هضم آنزیمی. ستون ۱: نشانگر مولکولی DNA. ستون ۲: هضم آنزیمی وکتور pET24a-hEGF توسط آنزیم‌های محدودالثر NdeI و EcoRI. ستون ۳: وکتور pET24a-hEGF برش نخورده

آنالیز وسترن بلات

نتایج وسترن بلات، با توجه به استفاده از rhEGF تجاری به عنوان کنترل مثبت و قرار گیری باند بیانی پروتئین مورد نظر در جایگاه درست خودش، صحت پروتئین بیان شده را تایید کرد (تصویر شماره ۲-ب).

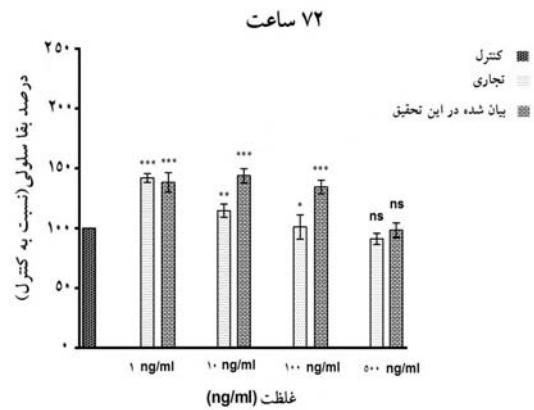


تصویر شماره ۲: الف: الگوی الکتروفورز تریسین پلی آکریل آمید ۱۶ درصد، تعیین موقعیت پروتئین بیان شده در باکتری. ستون ۱ و ۲: فاز محلول و غیر محلول در باکتری‌های القا نشده با IPTG به عنوان کنترل منفی. ستون ۳: نشانگر مولکولی پروتئین. ستون ۴ و ۵: فاز غیر محلول و محلول در باکتری‌های القا شده با IPTG. ب: تأیید پروتئین نو ترکیب hEGF از طریق ایمونوبلات با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال موشی ضد فاکتور رشد اپیدرم انسانی. ستون ۱: نشانگر مولکولی پروتئین. ستون ۲: نمونه القاء نشده. ستون ۳: باند مربوط به تأیید پروتئین hEGF نو ترکیب. ستون ۴: rhEGF تجاری. ستون ۵: BSA به عنوان کنترل منفی وسترن بلات

تخلیص

سانتریفیوژ محتویات کیسه دیالیز پس از انجام تاخوردگی مجدد، هیچ بانندی مبنی بر وجود فاکتور رشد اپیدرم انسانی نو ترکیب در فاز نامحلول نشان نداد و

بیان شده به شکل کنجاله‌های نامحلول فاقد فعالیت زیستی می‌باشد، شکل‌گیری کنجاله‌های نامحلول منجر به تخلیص کارآمد پروتئین مورد نظر می‌شود. در واقع، به دلیل مزایای ذکر شده، بیان پروتئین نوترکیب به صورت کنجاله‌های نامحلول در *E. coli* به‌طور گسترده برای تولید تجاری پروتئین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). استراتژی معمول برای بازیافت پروتئین شامل شستشو و جداسازی کنجاله‌های نامحلول، محلول‌سازی پروتئین‌های مجتمع شده و ایجاد تاخوردگی مجدد در پروتئین‌های محلول شده است (۲۱-۱۸). به واسطه چگالی بالای کنجاله‌های نامحلول (تقریباً ۱/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، به راحتی به وسیله سانتریفیوژ با دور بالا پس از شکست سلولی جدا می‌شوند. سانتریفیوژ با گرادیان سوکروز نیز برای به دست آوردن کنجاله‌های نامحلول با خلوص بالا از لیزیت سلولی *E. coli*، مورد استفاده قرار گرفته است (۲۲). علاوه بر این جداسازی کنجاله‌های نامحلول به وسیله شستشو با درجنت‌ها و غلظت‌های پایین نمک و اوره هم انجام می‌گیرد (۲۵-۲۳). در این تحقیق، از روش شستشو با نمک سدیم داکسی کولات برای تخلیص و جداسازی کنجاله‌های نامحلول استفاده شد. استراتژی‌های متعددی برای محلول‌سازی کنجاله‌های نامحلول به کار گرفته می‌شود. یکی از این روش‌ها استفاده از غلظت بالای دنتاتوره‌کننده‌ها از قبیل اوره و گوانیدین هیدروکلراید به همراه عوامل احیا کننده‌ای مانند بتا مرکاپتواتانول می‌باشد. در این روش، پروتئین‌های محلول شده اغلب با استفاده از عوامل اکسید کننده، تاخوردگی مجدد پیدا کرده و به شکل طبیعی و زیست فعال خود بر می‌گردند (۲۶). یکی دیگر از روش‌ها، محلول‌سازی ملایم کنجاله‌های نامحلول با استفاده از اوره ۲ مولار و pH قلیایی است (۲۷). در این پژوهش از روش دوم استفاده شده است. گزارش‌های متعددی برای استفاده از pH قلیایی (۲۹، ۲۸، ۱۴) برای محلول‌سازی پروتئین‌ها وجود دارد. در این پژوهش، تخلیص نهایی با استفاده از فیلترهای آمیکون با منافذی با قابلیت عبور



تصویر شماره ۴: درصد بقای سلول‌های NIH-3T3 تیمار شده با غلظت‌های مختلف فاکتور رشد اپیدرمی نوترکیب پس از گذشت ۷۲ ساعت. نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با کنترل (سلول‌های تیمار نشده با EGF) و به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده‌اند ($p < 0/05$ ، *، $p < 0/01$ ، **، $p < 0/001$ ، ***، ns: Non significant: عدم معنی دار بودن)

بحث

در این مطالعه، فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب در *E. coli* بیان شد و با روشی آسان، در دسترس، مقرون به صرفه و دارای بازده بالا محلول‌سازی کنجاله‌های نامحلول و تخلیص فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب صورت گرفت. با توجه به طیف وسیع کاربردهای واقعی و بالقوه فاکتور رشد اپیدرمی به ویژه در حیطه سلامت انسان (۱۶)، تولید این پروتئین با تعداد صحیح اسید آمینه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هرچند، برخی از انواع تجاری آن دارای یک (متیونین آغازین) یا دو اسید آمینه اضافه هستند. در این پژوهش، فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب واجد ۵۴ اسید آمینه (با توجه به متیونین آغازین) بیان و تخلیص شد.

همان‌طور که انتظار می‌رفت بیان فاکتور رشد اپیدرم انسانی به صورت کنجاله‌های نامحلول بود. بیان به صورت کنجاله‌های نامحلول مزایای خود را دارد از جمله این که سطح بسیار بالایی از پروتئین، به صورت همگن و مقاوم در برابر فعالیت پروتئولیتیک پروتئازهای سلولی بیان می‌شود. بنابراین، علی‌رغم این که پروتئین

میزان بقاء سلول‌های تیمار شده با فاکتور رشد اپیدرم انسانی بیان شده در این تحقیق در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پس از ۷۲ ساعت، تیمار سلول‌ها با این پروتئین در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری میزان بقاء سلولی بیش‌تری را نسبت به کنترل یعنی سلول‌های تیمار نشده نشان داد. حداکثر فعالیت مشاهده شده برای پروتئین تولید شده در مقایسه با کنترل در غلظت ۱۰ ng/ml در ۷۲ ساعت مشاهده شد و میزان آن، ۱/۸ برابر سلول‌های تیمار نشده بود. علاوه بر این در برخی از غلظت‌ها (۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، میزان بقا سلولی القا شده از نمونه تجاری هم به طور معنی‌داری بالاتر بود. دارا بودن فعالیت میتوژنیک و یا به عبارتی زیست فعال بودن فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب بیان شده در این تحقیق، تاییدی است بر انجام صحیح تاخوردگی مجدد به نحوی که این پروتئین قابلیت اتصال به گیرنده و متعاقب آن به راه انداختن آبشارهای درون سلولی را داشته است. به نظر می‌رسد که سیستم بیان سیتوپلاسمی به کار برده شده در این تحقیق، به قدر کافی برای تولید فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب کارآمد است. علاوه بر این، با توجه به آسان، مقرون به صرفه بودن و بالای بودن بازده روش ارائه شده در این پژوهش برای محلول سازی و تخلیص فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب، این روش می‌تواند برای تولید فاکتور رشد اپیدرم انسانی نوترکیب در مقیاس‌های نیمه صنعتی و صنعتی، مورد بررسی قرار گیرد.

پروتئین‌های زیر ۵۰ و ۱۰ کیلو دالتون انجام گرفت. در مطالعات مربوط به فاکتور رشد اپیدرمی، روش‌های مختلفی برای محلول‌سازی کنجاله‌های نامحلول مورد استفاده قرار گرفته است. برای مثال در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳، پس از تهیه ژن *hEGF* و همسانه سازی آن در حامل pUC118، فرآیند همسانه سازی آن در سه حامل بیانی pET-21b(+), pET-22b(+), و pET-32b(+), انجام دادند و پروتئین حاصل از هر کدام از سیستم‌های بیانی مختلف در میزبان *E. coli* BL21 (DE3) مورد ارزیابی قرار دادند. در هر سه مورد، پروتئین به صورت کنجاله‌های نامحلول تولید شد و برای محلول‌سازی پروتئین از عوامل دناتور کننده اوره و گوانیدین هیدروکلراید استفاده گردید. با تخلیص و سنجش فعالیت زیستی هر یک از این پروتئین‌ها بر دودمان سلولی A431 (دودمان سلولی تومور اپیدرم انسانی) مشخص گردید که فاکتور رشد اپیدرمی حاصل از ساختار pET-21b با بیش‌ترین فعالیت و دارای ۹۴ درصد فعالیت کامل نوع تجاری فاکتور رشد اپیدرمی می‌باشد (۹). در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۸، این ژن توسط وکتور pET-11b به باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) RIL انتقال یافت. محلول‌سازی با اوره ۸ مولار و شکل‌گیری تاخوردگی مجدد توسط کروماتوگرافی جذبی (Expanded-bed adsorption) انجام گرفت. پس از هضم با تریپسین و تخلیص نهایی فاکتور رشد اپیدرمی ۶/۲ کیلودالتونی با روش کروماتوگرافی تعویض یونی، سنجش فعالیت زیستی آن بر روی دودمان سلولی NIH-3T3 انجام شد و نتایج نشان دهنده اثر تقریباً یکسان پروتئین تولیدی و تجاری بر افزایش تکثیر میتوزی بود (۳۰).

References

1. Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 1975; 257(5524): 325-327.
2. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979; 48: 193-216.
3. Kim H, Muller WJ. The role of the epidermal growth factor receptor family in mammary tumorigenesis and metastasis. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 78-87.

4. Jiang G, Hunter T. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol* 1999; 9(15): R568-571.
5. Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994; 269(31): 20060-20066.
6. Starkey RH, Cohen S, Orth DN. Epidermal growth factor: identification of a new hormone in human urine. *Science* 1975; 189(4205): 800-802.
7. Engler DA, Matsunami RK, Campion SR, Stringer CD, Stevens A, Niyogi SK. 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(25): 12384-12390.
8. Lee JY, Yoon CS, Chung IY, Lee YS, Lee EK. Scale-up process for expression and renaturation of recombinant human epidermal growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 31(Pt 3): 245-248.
9. Ferrer Soler L, Cedano J, Querol E, de Llorens R. Cloning, expression and purification of human epidermal growth factor using different expression systems. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 788(1): 113-123.
10. Bakhshi M, Ebrahimi F, Hajizadeh A, Keshavarz Alikhani H. Purification and biological activity assessment: Comparison between two recombinant human epidermal growth factors with different molecular weights. *European Journal of Experimental Biology* 2012; 2(5): 1672-1679.
11. Tuyet HL, Nguyen Quynh TT, Vo Hoang Minh H, Thi Bich DN, Do Dinh T, Le Tan D, et al. The efficacy and safety of epidermal growth factor in treatment of diabetic foot ulcers: the preliminary results. *Int Wound J* 2009; 6(2): 159-166.
12. Krishnan K, Arnone B, Buchman A. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17(1): 410-422.
13. Ausubel F. *Current Protocols in Molecular Biology*. United State of America: John Wiley & Sons; 1995.
14. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2000; 18(2): 182-192.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
16. Wong WR, Lam E, Huang RC, Wong RS, Morris C, Hackett J. Applications, and efficient large-scale production, of recombinant human epidermal growth factor. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2001; 18: 51-71.
17. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks--2003. *Nat Biotechnol* 2003; 21(8): 865-870.
18. Smith JC, Derbyshire RB, Cook E, Dunthorne L, Viney J, Brewer SJ, et al. Chemical synthesis and cloning of a poly (arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. *Gene* 1984; 32(3): 321-327.
19. Ferreira S, Sousa F, Queiroz JA, Domingues FC. Improved recovery of a fusion protein containing the antigenic domain 1 of the

-
- human cytomegalovirus glycoprotein B. *Biotechnol Lett* 2005; 27(16): 1241-1245.
20. Yang J, Zhang W, Liu K, Jing S, Guo G, Luo P, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant human interleukin 24 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2007; 53(2): 339-345.
21. Yadwad VB, Meghji K, Ward OP. Rapid purification and partial characterization of recombinant human epidermal growth factor produced by *Escherichia coli*. *Biotechnology Techniques* 1993; 7(9): 657-662.
22. Bowden GA, Paredes AM, Georgiou G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 1991; 9(8): 725-730.
23. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9(5): 497-501.
24. Styczyńska B, Krzemińska A, Sobótka W. Effect of diflubenzuron on insects of medical importance. *Wiad Parazytol* 1986; 32(4-6): 553-557.
25. Khan RH, Rao KB, Eshwari AN, Totey SM, Panda AK. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 1998; 14(5): 722-728.
26. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005; 99(4): 303-310.
27. Heiker JT, Klötting N, Blüher M, Beck-Sickinger AG. Access to gram scale amounts of functional globular adiponectin from *E. coli* inclusion bodies by alkaline-shock solubilization. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 398(1): 32-37.
28. Raina K, Panda AK, Ali MM, Talwar GP. Purification, refolding, and characterization of recombinant LHRH-T multimer. *Protein Expr Purif* 2004; 37(1): 8-17.
29. Patra AK, Gahlay GK, Reddy BV, Gupta SK, Panda AK. Refolding, structural transition and spermatozoa-binding of recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-C expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 2000; 267(24): 7075-7081.
30. Sharma K, Babu PV, Sasidhar P, Srinivas VK, Mohan VK, Krishna E. Recombinant human epidermal growth factor inclusion body solubilization and refolding at large scale using expanded-bed adsorption chromatography from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2008; 60(1): 7-14.