ORIGINAL ARTICLE

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

Hadi Mohammadzade[1],
Behzad Khansarinejad[2],
Abdolrahim Sadeghi[3],
Hamid Abtahi[4]

[1] Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[2] Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[3] Endocrinology and Metabolism Research Center, Department of Biochemistry, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[4] Molecular and Medicine Research Center, Department of Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

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

Abstract

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

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

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

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

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

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(147): 87-96 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۷ فروردین سال ۱۳۹۶ (۹۶-۸۷)

کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب زیرواحد بتای هورمون TSH انسانی (TSHβ) و ارزیابی آنتی‌ژنیسیته آن

هادی محمدزاده[۱]
بهزاد خوانساری‌نژاد[۲]
عبدالرحیم صادقی[۳]
حمید ابطحی[۴]

چکیده

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

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

یافته‌ها: ژن TSHβ، به‌درستی در میزبان باکتریایی، کلون و بیان گردید و پروتئین خالص‌شده با آنتی‌بادی اختصاصی در تکنیک وسترن بلات واکنش نشان داد.

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

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

مقدمه

هورمون تیروتروپین (TSH)، گلیکوپروتئینی بوده و از بخش قدامی غده هیپوفیز، سنتز و آزاد می‌شود (۲،۱). چهار هورمون TSH، LH، FSH و CG از دو زیرواحد α (مشترک) و β (اختصاصی هر هورمون) تشکیل شده‌اند (۵-۳). زیرواحد آلفا، قسمت فعال و مسئول اثرات عملکردی هورمون است؛ اما زیرواحد بتا در TSH، منحصربه‌فرد بوده و این قسمت به گیرنده هورمون در سطح سلول متصل می‌شود. شایان ذکر است که زیرواحدهای بتا در میان هورمون‌های گوناگون از نظر توالی آمینواسید تفاوت

مولف مسئول: حمید ابطحی– اراک: دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی Email: abtahi@arakmu.ac.ir
۱. گروه زیست‌فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲. گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳. مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۴. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۲۴

دارند (۷،۶).

علاوه‌براین، زیرواحد آلفا در گونه‌های حیوانی تقریباً ترادف یکسانی دارند. این زیرواحد، ۹۲ اسیدآمینه داشته و طول ژن آن در انسان ۹/۴ kb می‌باشد (۶). ژن hTSHβ، یک نسخه ژنی منحصربه‌فرد می‌باشد. این زیرواحد شامل ۱۱۸ اسیدآمینه است و فرم پیش‌ساز آن نیز، ۱۳۸ اسیدآمینه دارد که ۲۰ مورد اول آن مربوط به پپتید نشانه می‌باشد (۱۰ـ۸). سازماندهی ژن TSHβ تاحدودی در میان گونه‌های مختلف، متفاوت است. طول ژن TSHβ انسانی، ۴/۳ kb بوده و از سه اگزون و دو اینترون تشکیل شده است (۱۱،۹)؛ درحالی‌که وزن مولکولی توالی اسیدآمینه‌ای زیرواحد α به‌همراه β در حدود ۲۸,۰۰۰ Da است و کربوهیدرات‌های اضافی (۱۵ درصد وزن TSH) منجر به وزن مولکولی بالاتری از آن می‌شود (۷،۲) .

تشکیل TSH بالغ شامل چندین مرحله تغییرات پس از ترجمه می‌باشد که این مراحل دربرگیرنده‌ی خروج اسیدآمینه‌های نشانه از هر دو زیرواحد و گلیکوزیله‌شدن است که به زیرواحدهای α و β، اجازه بازآرایی صحیح را می‌دهد؛ به‌طوری‌که باعث هترودایمرشدن زیرواحدها گشته و مانع از تجزیه درون‌سلولی می‌شود (۱۳،۱۲). مطالعات نشان داده‌اند که TSH نقش بسیار مهمی را در تحریک سنتز و آزادسازی هورمون‌های تیروئیدی تیروکسین (T4) و تری یدو تیرونین (T3) ایفا کرده و به‌عنوان فاکتور رشد و بقای غدد تیروئید عمل می‌کند (۳،۱). هورمون‌های تیروئیدی وظیفه تنظیم مصرف انرژی، تولید گرما و تسهیل رشد در بدن را بر عهده دارند (۱۴). علاوه‌براین، TRH (Thyrotropin-releasing hormone) عمده‌ترین محرک سنتز و ترشح TSH می‌باشد و کاهش سطح هورمون‌های تیروئید سبب افزایش تولید پایه‌ای TSH و تشدید اثر تحریکی TRH بر TSH و برعکس می‌شود؛ به‌عبارت دیگر، T3 و T4 سبب بازخورد منفی مهاری به‌ترتیب بر ترشح TSH هیپوفیزی و TRH هیپوتالاموسی می‌گردد (۱).

شایع‌ترین اختلال غده تیروئید، تولید غیرطبیعی هورمون‌های تیروئید است. اندازه‌گیری سطح خونی هورمون TSH در بررسی اختلالات تیروئیدی مانند کم‌کاری، پرکاری و غیره بسیار مفید می‌باشد (۱۶،۱۵). همچنین، TSH انسانی نوترکیب می‌تواند جایگزین TSH انسانی هیپوفیزی شود؛ ازاین‌رو، می‌تواند به‌عنوان استاندارد و ردیاب در آزمایش‌های تشخیصی از جمله RIA (Radio Immunoassay) و IRMA (Immunoradiometric assay) به‌کار رود (۱۷). در پژوهش‌های مختلف، کارایی کلینیکی TSH نوترکیب در تشخیص بیماری‌های تیروئیدی مشخص شده است و هدف اصلی استفاده از آن، پیشگیری از هیپوتیروئیدیسم می‌باشد (۱۹،۱۸).

از آن‌جا که زنجیره آلفا در بین هورمون‌های TSH، LH، FSH و CG ترادف مشابهی دارد، ممکن است باعث ایجاد اختلال در آزمایش‌های تشخیصی این هورمون‌ها شود؛ بنابراین، در پژوهش حاضر سعی بر آن است که برای اولین‌بار، شکل نوترکیب زنجیره بتا TSH، تولید شده و تخلیص گردد و درنهایت، پروتئین تولیدشده از نظر آنتی‌ژنیسیته با شکل طبیعی آن مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ژن، پلاسمید و سویه‌های باکتریایی

توالی ژن TSHβ انسانی با شماره دسترسی NM_000549 از بانک ژنی NCBI به‌دست آمد و پس از بهینه‌سازی کدونی با برنامه Vector NTI (به‌دلیل استفاده از میزبان باکتریایی) توسط شرکت biomatic کشور کانادا در ناقل پلاسمیدی pBSK

سنتز گردید.

در این پژوهش، میزبان باکتریایی *E.coli* بود که برای کلونینگ اولیه و تکثیر پلاسمید از سویه DH5α و بیان از سویه BL21(DE3)pLysS استفاده گردید که هر دو سویه از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهیه شدند. همچنین، از پلاسمید pET32a (شرکت Novagen ساخت کشور آمریکا) به‌عنوان ناقل کلونینگ و بیانی استفاده گردید.

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

کلون کردن اولیه

سلول‌های مستعد E.coli DH5α به روش کلرید کلسیم- کلرید منیزیم ساخته شدند. کشت باکتری‌ها در محیط Luria-Bertani (LB) صورت گرفت و در طول موج ۶۰۰ nm با OD=۰/۴، انکوباسیون پایان یافت و باکتری‌ها وارد فرآیند مستعدسازی شدند. همچنین، ترانسفورماسیون ناقل پلاسمیدی pBSK حاوی TSH به سلول‌های DH5α مستعد صورت گرفت و باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار حاوی Amp (پلاسمید pBSK به آمپی‌سیلین مقاوم است) کشت داده شدند و تخلیص پلاسمید از این باکتری‌ها به شیوه mini-preparation انجام گرفت و در ادامه، پلاسمیدهای تخلیص‌شده از نظر کیفی و کمی بررسی گردیدند. بدین‌منظور، از روش الکتروفورز افقی بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و روش اسپکتروسکوپی استفاده شد (۲۰).

تکثیر ژن TSHβ با واکنش PCR

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

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش

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

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

کلون کردن ژن در میزبان تکثیری

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

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

کلون‌کردن ژن در میزبان بیانی

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

القای بیان پروتئین

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

سپس ۲، ۴ و ۶ ساعت بعد از القا، نمونه‌ها برداشته شد و رسوب باکتری‌ها تهیه گردید. در ادامه، نمونه‌های قبل و بعد از القا به‌همراه مارکر پروتئینی و با استفاده از الکتروفورز عمودی بر روی ژل ۱۲ درصد پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) بررسی شدند.

تخلیص پروتئین نوترکیب

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

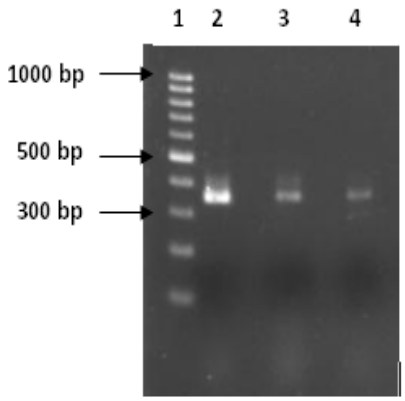
بررسی آنتی‌ژنیسیته با تکنیک وسترن بلات

در این قسمت، پروتئین تخلیص‌شده به‌همراه مارکر پروتئینی در ژل عمودی الکتروفورز گردید و انتقال باندهای پروتئینی از ژل پلی‌آکریل‌آمید به غشای PVDF، طی ۲ ساعت صورت گرفت. سپس، غشای PVDF با رنگ پانسو اس، رنگ‌آمیزی گشت و توسط بافر شستشو داده شد. پس از بلوکه‌کردن غشا، PVDF به‌مدت ۲ ساعت با آنتی‌بادی Anti-TSH کونژوگه با آنزیم HRP و رقت ۱:۱۰۰ انکوبه گشت و در روتاتور قرار گرفت. قابل ذکر است که این آنتی‌بادی‌ها، منوکلونال موشی و اهدایی شرکت پادتن‌گستر ساوه بودند. در مرحله آخر نیز، غشاهای PVDF در سوبسترای DAB تازه منتقل شد و با اعمال تاریکی محیط، به‌لحاظ وجود باندهای پروتئینی مورد نظر بررسی گردید.

یافته‌ها

تکثیر ژن TSHβ

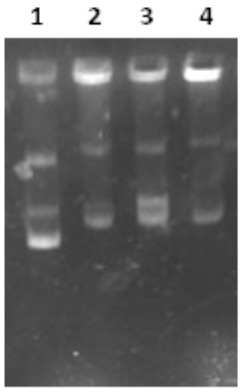
در واکنش PCR در هر سه غلظت منیزیم، باند قطعه با اندازه ۳۵۴ bp دیده شد که در غلظت منیزیم ۰/۷۵ mM، باند بهتری در ژل وجود داشت (تصویر شماره ۱).



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

کلون‌کردن ژن در ناقل بیانی

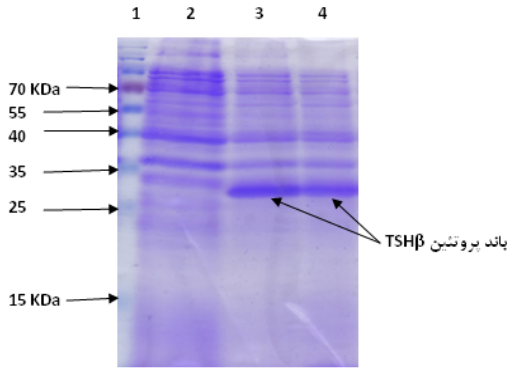
کلون‌کردن ژن در ناقل بیانی pET32a صورت گرفت. ترانسفورماسیون pET32a + TSHβ به باکتری‌های مستعد DH5α موفقیت‌آمیز بود و جهت تأیید، تخلیص پلاسمید انجام شد. شایان ذکر است که پلاسمیدهای حاوی قطعه ژنی به‌علت سنگین‌ترشدن، حرکت کندتری داشته و بالاتر از پلاسمید pET32a کنترل بر روی ژل قرار می‌گیرند (تصویر شماره ۲).



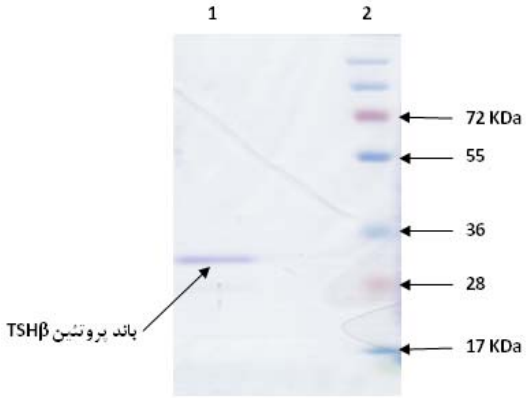
تصویر شماره ۲: نتیجه تخلیص پلاسمید pET32a حاوی قطعه روی ژل افقی
چاهک شماره ۱: pET32a دست‌نخورده؛ چاهک‌های شماره ۲، ۳ و ۴: تخلیص پلاسمید pET32a + TSHβ

تولید و تخلیص پروتئین نوترکیب

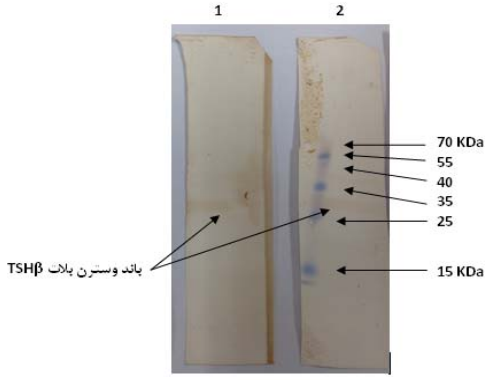
پروتئین نوترکیب TSHβ پس از گذشت ۴ ساعت از القا با IPTG تولید گردید که وزن پروتئین تولیدشده در حدود ۳۰ KDa بود. نتیجه القای پروتئین TSHβ در تصویر شماره ۳ آمده است. خالص‌سازی پروتئین TSHβ نیز با استفاده از کیت Ni-NTA و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (تصویر شماره ۴) ذکر این نکته ضرورت دارد که غلظت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



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



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



تصویر شماره ۵: نتیجه وسترن بلات پروتئین TSHβ روی کاغذ PVDF
ستون ۱: نمونه پروتئینی TSHβ؛ ستون ۲: مارکر پروتئینی به‌همراه نمونه پروتئینی

بررسی آنتی‌ژنیسیته

براساس نتایج به‌دست‌آمده، نمونه پروتئینی خالص‌شده با آنتی‌بادی اختصاصی در کاغذ نیتروسلولز واکنش نشان داد و باند مربوط به آن در محدوده مورد نظر روی غشای PVDF تشکیل شد (تصویر شماره ۵).

بحث

اندازه‌گیری سطح خونی هورمون TSH در بررسی اختلالات تیروئیدی مانند کم‌کاری، پرکاری و غیره، بسیار مفید می‌باشد. قابل‌توجه است که بیماری‌های تیروئیدی، شیوع متوسط تا نسبتاً زیادی در جامعه دارند و تعداد اندکی از آن‌ها بیماری نادر محسوب می‌شوند.

TSH به‌وسیله آزمون‌های بسیار حساس (ایمنو-رادیومتریک و الایزا) اندازه‌گیری می‌شود و به‌طور معمول برای سنجش آن از TSH انسانی استفاده می‌گردد و با توجه به تولید اندک این هورمون در غده هیپوفیز، بیشترین تمرکز بر تولید نوترکیب آن با استفاده از میزبان‌های باکتری می‌باشد. شایان ذکر است که در آزمایش‌های اندازه‌گیری TSH از کل پروتئین آن استفاده می‌شود. با توجه به شباهت ترادف آلفا در هورمون‌های TSH، LH، FSH و CG، امکان کسب نتایج کاذب وجود دارد.

هدف از این پژوهش، تولید نوترکیب زنجیره بتا و بررسی آنتی‌ژنیسیته آن بود. به همین منظور، TSH نوترکیب انسانی برای تهیه استاندارد ثانویه در RIA و IRMA جهت بررسی کلینیکی، آزمایش گردید و مشخص شد که hTSH نوترکیب با تمام اتصالات و معیارهای کروماتوگرافیکی که در hTSH هیپوفیزی وجود دارد، مطابقت داشته و هیچ نوع خطای چشمگیری را حین استفاده در اندازه‌گیری نمونه‌های سرمی نامعلوم ایجاد نمی‌کند؛ بنابراین، hTSH نوترکیب می‌تواند به‌طور کامل جایگزین hTSH هیپوفیزی شود و به‌عنوان استاندارد و همچنین ردیاب در تشخیص *In vitro* مانند RIA، ELISA و IRMA مورد استفاده قرار گیرد (این امر پیشنهاد می‌کند که سایر هورمون‌های نوترکیب نیز می‌توانند برای تهیه معرف جهت ایمنواسی به‌کار روند) (۱۷).

ذکر این نکته ضرورت دارد که بیان ژن‌های انسانی در *E.coli* به‌دلیل تفاوت زیاد میان ترکیب کدون‌های غالب انسان و *E.coli* و نیز تشکیل انکلوژن‌بادی در پروتئین نوترکیب به‌دلیل وجود پیوندهای دی‌سولفیدی داخلی، به میزان پایینی بوده است (۲۲،۲۱). در پژوهش حاضر جهت غلبه بر این مشکل، بهینه‌سازی کدونی و طراحی ژن TSHβ توسط نرم‌افزار Vector NTI انجام شد. همچنین، به‌دلیل وجود دنباله هیستیدینی (6His.tag) در انتهای آمینی پروتئین بیان‌شده که توسط ناقل بیانی pET32a اضافه گردید، تخلیص آن توسط رزین نیکل (Ni-NTA) و براساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت (۲۳).

علاوه‌براین، تولید پروتئین TSHβ در میزبان باکتریایی بهینه گردید و برای کلونینگ و بیان، تنها از میزبان باکتریایی استفاده گردید؛ بنابراین، گلیکوزیلاسیون و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی در پروتئین نوترکیب، انجام نشد و شکل فضایی آن متفاوت خواهد بود؛ به‌گونه‌ای که می‌توان گفت تنها در داشتن ساختار اسیدآمینه‌ای و برخی اپی‌توپ‌های خطی با پروتئین‌های طبیعی یا نوترکیب

یوکاریوتی مشابهت دارد.

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

با این وجود، در پژوهش حاضر ژن TSHβ، کلونینگ، بیان و تخلیص موفقیت‌آمیزی در میزبان باکتریایی داشت. همچنین، به‌لحاظ اندازه ژنی و پروتئینی با نمونه‌های طبیعی مطابقت داشت و در بررسی آنتی‌ژنیسیته نیز، واکنش خوبی را با آنتی‌بادی‌های ضد TSH منوکلونال موشی نشان داد؛ بنابراین، این موضوع با یافته‌های مطالعات قبلی مبنی بر دخیل‌نبودن اسید سیالیک و دیگر ساختارهای کربوهیدراتی در آنتی‌ژنیسیته این پروتئین هماهنگ می‌باشد. از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد که پروتئین TSHβ می‌تواند آنتی‌ژنیسیته‌ای در حد TSH را از خودش نشان دهد و این‌طور استنباط می‌شود که بیشتر اپی‌توپ‌های مورد نیاز برای واکنشی قابل‌قبول با آنتی‌بادی‌های ضد TSH، در زیرواحد بتای TSH قرار گرفته‌اند؛ بدین‌معنا که احتمالاً می‌توان به‌جای استفاده از TSH در کیت‌های تشخیصی، از TSHβ استفاده کرد که در این صورت، احتمال واکنش متقاطع با هورمون‌های LH، FSH و CG در این کیت‌ها به کمترین حد ممکن می‌رسد؛ بدین‌معنا که اختصاصی‌بودن آزمایش بالاتر می‌رود.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین TSHβ به روش نوترکیب تولید می‌گردد و از نظر آنتی‌ژنیسیته، مشابه با فرم طبیعی آن می‌باشد.

درمجموع، می‌توان گفت با اینکه کلون‌سازی و بیان پروتئین TSHβ در *E.coli* موفقیت‌آمیز بود و در بررسی آنتی‌ژنیسیته این پروتئین، آزمایش وسترن بلات با آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی نیز نتیجه مطلوبی داشت؛ اما استفاده از این پروتئین‌های نوترکیب در کیت‌های تشخیصی الایزا به‌عنوان استاندارد یا کنترل و یا حتی تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه TSH و نیز استفاده از این آنتی‌بادی‌ها در کیت، نیازمند تحقیقات دیگری جهت همسان‌سازی حداکثری این پروتئین با نوع طبیعی آن در بدن جاندار به‌لحاظ ساختار، حضور باندهای دی‌سولفیدی، شکل فضایی، شاخص‌های آنتی‌ژنیک و غیره می‌باشد.

سپاسگزاری

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

References

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

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

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