بررسی کلون و بیان هورمون نوترکیب انسانی پاراتیروئید در مقیاس آزمایشگاهی

صادق مجدی، حسین امانی *+، قاسم نجف پور
گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران

مجید شهبازی
دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

چکیده: *حفظ سطح غلظت کلسیم خون یک فرایند پویا است که با بر هم کنش چند عضو مانند روده، کلیه و غده‌های پاراتیروئید صورت می گیرد. هورمون انسانی پاراتیروئید(hPTH) با افزایش جذب روده ای کلسیم و کاهش دفع کلیوی موجب افزایش سطح کلسیم خون می شود. ازآنجایی‌که در صورت ناکافی بودن مقدار کلسیم در خون، به طور معمول این عنصر از استخوان‌ها برداشته می‌شود بنابراین کمبود این هورمون باعث پوکی استخوان و بیماری های ناشی از اختلال‌های غده‌های پاراتیروئید می‌شود. در این پژوهش از پلاسمید Puc 57 و سویه Escherichia coli DH5α برای کلون کردن و از پلاسمید Pet 32a(+) و سویه Escherichia coli BL21 برای بیان پروتئین استفاده شدند. در این پژوهش تولید پروتئین به صورت ناپیوسته در ارلن های یک لیتری و همچنین به صورت ناپیوسته به همراه خوراک دهی در یک فرمانتور ۱۰ لیتری همزن دار بررسی شد. طبق نتیجه های این پژوهش، کشت ناپیوسته در ارلن ها نشان داد که پس از ۱۶ ساعت مقدار زیست توده و پروتئین نو ترکیب به ترتیب به ۶/۵ g/L و ۱/۷ g/L می رسد. همچنین در حالت ناپیوسته به همراه خورک دهی، بیشترین مقدار زیست توده و پروتئین نو ترکیب درون فرمانتور پس از ۱۲ ساعت به ترتیب به ۸۱g/L و ۲۲ g/L به دست آمد. سرانجام تولید پروتئین نوترکیب با دو آزمایش SDS-PAGE و Western blot مورد تایید قرار گرفت. در این پژوهش وجود باند پروتئینی در ناحیه ۳۷ کیلو دالتون نشان دهنده درستی بیان هورمون پاراتیروئید می باشد. با توجه به تولید موفقیت آمیز هورمون انسانی پاراتیروئید در این پژوهش و همچنین مزیت های باکتری اشریشاکولی به عنوان میزبان، به نظر می‌رسد این روش میتواند جایگزین مناسبی برای تولید این ماده ارزشمند دارویی باشد.*

واژه های کلیدی: *هورمون پاراتیروئید انسانی نوترکیب، کلون، بیان، راکتور زیستی، کشت باکتری، Pet 32a(+)، اشرشیا کلی.*

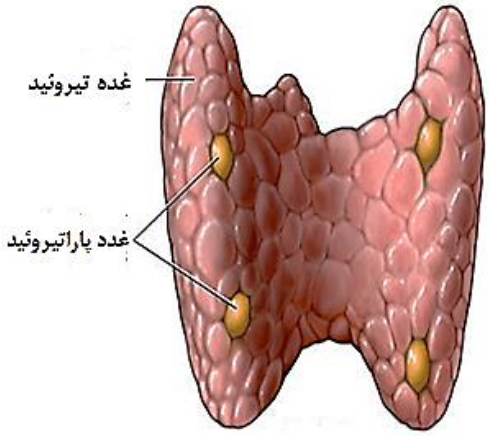
KEYWORDS: *Recombinant human parathyroid hormone, Cloning, Expression, Bioreactor, Cultivation of bacteria, Pet 32a(+) , Escherichia coli*

* عهده دار مکاتبات
+E-mail: hamani@nit.ac.ir

مقدمه

داروهای زیستی به‌طور معمول شبیه ترکیب‌های موجود در بدن هستند و توسط بیوراکتورهای زیستی به روش زیست فناوری تولید می‌شوند. امروزه استفاده از این ویژگی‌ها برای درمان بیماری‌ها با عارضه‌های جانبی کم‌تر گسترش زیادی یافته است. بهترین و کاربردی ترین روش در درمان برخی از بیماری استفاده از پروتئین‌ها می‌باشد. نخست پروتئین‌های طبیعی مورد نیاز از حیوانات، گیاهان و منابع انسانی تامین می‌شد. به تازگی با پردازش پلاسمای خون انسان بسیاری از پروتئین‌ها جداسازی شده و در درمان بیماری‌هایی مانند هموفیلی استفاده می‌شود[۱]. مطالعه‌های گذشته نشان داده است که انسولین تهیه شده از خون خوک که تنها در یک اسید آمینه با شکل انسانی متفاوت می باشد می تواند یک راه برای درمان بیماری دیابت باشد. اولین داروی نوترکیب انسولین با نام تجاری هومولین[۱] با همکاری دو شرکت *الی لیلی*[۲] و *ژن تک*[۳] در سال ۱۹۸۲ میلادی توسط FDA[۴] تأیید و به بازار عرضه شد. این پروتئین‌های نوترکیب به تدریج جایگزین پروتئین‌های طبیعی شدند که از منابع حیوانی و انسانی به دست می‌آمدند[۱]. یکی از مهم‌ترین پروتئین های نوترکیب هورمون پاراتیروئید است که می تواند کلسیم و فسفر خون را تنظیم کند[۲-۶]. این هورمون از ۴ غده پاراتیرویید که در پشت تیروئید قرار دارند ترشح می شوند. شکل ۱ جایگاه غده هورمون پاراتیروئید را نشان می دهد[۷]. همچنین تولید این نوع پروتئین‌ها در باکتری‌ها که به صورت میزبان عمل می‌کنند نیز صورت می‌گیرد. یک سوم از پروتئین‌های درمانی در باکتری *اشریشیاکلای* تولید می شوند که این امر قابلیت بالای *اشریشیاکلای* را برای تولید پروتئین‌های نوترکیب را نشان می دهد.

برتری استفاده از این باکتری برای تولید پروتئین‌های نوترکیب سرعت رشد بالا، وجود سویه‌های متنوع قابل دسترس از این باکتری، وجود سامانه‌های بیان ژنی زیاد برای تولید پروتئین های بیرونی، توسعه روش‌های تخمیری برای این باکتری و پایداری ژنتیکی مناسب می باشد[۷]. *توماس*[۵] و *همکاران* هورمون انسانی پاراتیروئید (hPTH[۶]) را با همراه ترشحی[۷] فاکتور X قابل برش در باکتری اشیریشیاکلای بیان کرده و تا mg/L ۵۰ خالص سازی



شکل ۱: جایگاه غدد پاراتیروئید هورمون [7]

کردند [۹ ، ۸]. با توجه به پایداری گرمایی پاراتیروئید هورمون، *گو*[۸] و *همکاران* با ادغام دو روش شوک اسمزی و تیمار گرمایی، Trx-hPTH را از باکتری اشریشیاکلای با خلوص ۷۲٪ استخراج کردند. آن‌ها همچنین نشان دادند که این روش اقتصادی و آسان تر برای پروتئین‌های ترشحی با پایداری گرمایی، در مقایسه با کروماتوگرافی تمایلی است[۱۰]. *لیو*[۹] و همکاران، hPTH را با پلاسمید pET32a (+) در باکتری اشریشیا کلای بیان کردند و با سه مرحله کروماتوگرافی تمایلی تثبیت شده، تعویض یونی و غربال مولکولی به mg/L ۳۰۰ هورمون پاراتیروئید با خلوص ۹۹٪ رسیدند. در پایان نیز فعالیت زیستی آن را با رده سلولی UMR-106 موش صحرایی تأیید کردند [۱۱]. خوراک دهی آهسته و همچنین خالص سازی بالای ۹۹ ٪ هورمون پاراتیروئید با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی کاتیونی و فاز معکوس[۱۰] به صورت متعامد از ابتکارهای *اوما*[۱۱] و *همکاران* بود[۱۲]. *ون جو*[۱۲] و *همکاران* نیز ژن hPTH را با روش *بایسیسترونیک*[۱۳] سنتز و به صورت محلول غیر ترشحی در باکتری *اشریشیاکلای* در فرمانتور ۱۵ لیتری بیان کردند و به زیست توده g/L ۲۷ دست یافتند[۱۳]. آن‌ها سپس با سه مرحله کروماتوگرافی خالص سازی را انجام داده و فعالیت زیستی آن را با افزایش چشمگیر در میزان cAMP[۱۴] سلول‌های موش صحرایی تائید کردند[۱۳]. با توجه به موفقیت‌آمیز بودن پژوهش‌های گذشته به نظر می رسد که تولید هورمون پاراتیروئید انسانی در باکتری اشریشیاکلای و رسیدن به دانش فنی بومی آن

(۱) Humulin
(۲) Eli lilly
(۳) Genetech
(۴) Food and Drud Administration
(۵) Tomus
(۶) Human parathyroid hormone
(۷) Fusion partner
(۸) Guo
(۹) Liu
(۱۰) Reverse Phase Chromatography
(۱۱) Uma
(۱۲) Wenju
(۱۳) Bicistronic
(۱۴) Cyclic adenosine monophosphate

در کشور ما نیز امری ضروری باشد. لذا هدف از این پژوهش بررسی کلون و بیان هورمون پاراتیروئید انسانی نوترکیب درون باکتری E.coli و کشت دادن آن در به صورت ناپیوسته در مقیاس ارلن و کشت ناپیوسته همراه با خوراک دهی در فرمانتور می‌باشد. استخراج پروتئین نوترکیب و خالص سازی آن نیز از اهداف نهایی این پژوهش می باشد.

بخش تجربی

تهیه سویه مناسب جهت بیان هورمون پاراتیروئید نوترکیب انسانی

پلاسمید pUC57 [1] حاوی ژن Trx-His6-EK-PTH84، سنتز شده توسط شرکت GenScript (USA) پس از تکثیر در باکتری Escherichia coli DH5α، به‌وسیله کیت استخراج پلاسمید شد. ژن Trx-His6-EK-PTH84 پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های برش دهنده محدود [2] MscI و BamHI، از پلاسمید pUC57 خارج و به کمک آنزیم مای با اثر محدود T4 DNA لیگاز در پلاسمید pET32a(+) قرار داده شد و برای بیان به باکتری BL21 Escherichia coli منتقل شد.

محیط کشت برای بیان هورمون پاراتروئید نوترکیب انسانی

در این پژوهش کلیه مواد شیمیایی استفاده شده از شرکت مرک تهیه شد. برای نگهداری میکروارگانیسم از محیط کشت LB جامد (تریپتون ۱۰g/L، عصاره مخمر ۵g/L، سدیم کلرید ۵g/L، آگار ۱۵g/L) استفاده شد. برای پیش کشت از محیط کشت ZYP-0.8G (تریپتون ۹/۳g/L ، عصاره مخمر ۴/۶۵g/L ، منیزیم سولفات ۰/۱۲ g/L ، گلوکز ۰/۸ w/v ٪ ، آمونیوم سولفات ۳/۳ g/L، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۶/۸ g/L ، دی سدیم هیدروژن فسفات ۷/۱ g/L و آمپلی سیلین ۱۰۰ µg/mL) استفاده شد. برای بیان پروتئین در کشت ناپیوسته از محیط کشت ZYP-5052 (تریپتون ۹/۳ g/L ، عصاره مخمر ۴/۶۵ g/L ، منیزیم سولفات ۱mM ، آمونیوم سولفات ۳/۳ g/L ، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۶/۸ g/L ، دی سدیم هیدروژن فسفات ۷/۱ g/L ، آمپلی سیلین ۱۰۰ µg/mL ،گلوکز (w/v) ۰/۵ ٪ ، لاکتوز ۰/۲ w/v ٪ ، گلیسرول ۰/۵ w/v ٪) استفاده شد. محیط کشت ها به صورت جدا به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ °C اتوکلاو شده و برای ادامه کار خنک شدند. برای خوراک دهی در زمان کار نیز از محلول اوتکلاو شده که شامل تریپتون ۳۵۰ g/L، منیزیم سولفات ۲۰ g/L، گلوکز ۶۰۰ g/L و عنصرهای کم مقدار ۵ ml/L استفاده شد. عناصرهای کم مقدار در یک لیتر HCl یک مولار شامل FeSO4.7H2O ۲/ ۷۸ g، CaCl2.H2O ۱/۷۴ g، CoSO4.7H2O ۰/۱۸g، MnCl2.4.H2O ۱/۸۹g، ZnSO4.7H2O ۰/۹۲ g ، CuCl2.2H2O ۰/۷۱ g بود. دلیل استفاده از عنصرهای کم مقدار به این خاطر است که عنصرهایی مانند Mn، Fe، Zn، Cu، Ca، Co نیز برای رشد باکتری مورد نیاز است و بایستی حتماً در محیط کشت وجود داشته باشند. اگر این عنصرها در محیط کشت کم باشند باید با املاح موجود در آب تامین شوند و گرنه رشد میکروارگانیسم‌ها مختل خواهد شد.

کشت سلولی

کشت ناپیوسته در مقیاس ارلن

برای تولید مایه تلقیح بهترین تک کلونی را از محیط کشت جامد برداشته و در محیط کشت ZYP-0.8G به حجم ۵۰ mL تلقیح و در ۳۷ °C و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۶ ساعت گرما گذاری شد. سپس ۵۰ mL از مایه تلقیح در ۴۵۰mL محیط کشت ZYP-5052 که درون ارلن یک لیتری قرار داشت تلقیح شد و در ۳۷°C و ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت گرماگذاری شد. برای بررسی رشد باکتری و آنالیز پروتئین‌های تولید شده در زمان‌های گوناگون کشت از این ارلن نمونه گیری شد.

کشت ناپیوسته در مقیاس فرمانتور ۱۰ لیتری

کشت ناپیوسته همراه با خوراک‌دهی در فرمانتور استوانه‌ای ۱۰ لیتری با حجم کاری ۸ لیتر شامل دو همزن توربینی با یک محور انجام شد. برای این منظور ابتدا فرمانتور و اتصالات به همراه ۳ لیتر محیط کشت اولیه اتوکلاو شد. از مایه تلقیح مرحله ناپیوسته پیشین به مقدار ۵٪ حجمی به درون فرمانتور که شامل محیط ZPY-5052 می باشد، تلقیح می‌شد. دانسیته نوری محیط کشت به طور پیوسته بر حسب زمان اندازه گیری شد. در طول دوره خوراک‌دهی pH محیط تخمیر با استفاده از محلول ۲۰٪ w/v (وزنی بر حجمی) سود و محلول فسفریک اسید ۳ نرمال در ۷ تنظیم شد. غلظت اکسیژن محلول نیز با تغییر دور همزن و شدت هوادهی و همچنین در صورت نیاز غنی‌سازی اکسیژن هوای ورودی به‌صورت دستی در حدود ۴۳ ٪ اشباع حفظ شد. دما در طول فرایند در °C ۳۷ کنترل و تولید کف با افزودن ضد کف (روغن سیلیکون سترون) به صورت دستی مهار شد.

(۱) Plasmid, University of California

(۲) Restriction Enzyme

گسستن دیواره سلولی

جداسازی پروتئین نوترکیب با اولترا فیلتراسیون

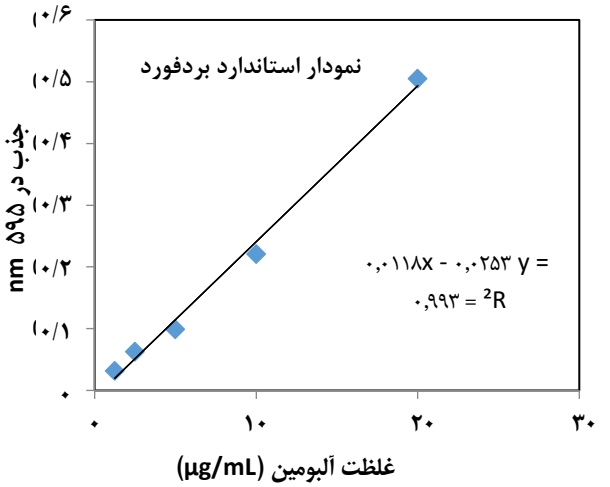
نخست محیط کشت حاوی باکتری نوترکیب با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه درoC ۴ سانتریفوژ شد و سپس زیست توده به‌دست آمده در ایمیدازول حل‌شده و برای عمل تخریب دیواره سلولی از روش اولترا سونیک با توان ۶۹۰ وات استفاده شد. این عملیات با شدت ۷۰٪ آمپلی تود به مدت ۱۵ دقیقه به صورت ناپیوسته با توقف‌های ۱۵ ثانیه‌ای انجام شد تا از گرم شدن و تخریب پروتئین‌ها خودداری شود. در حین عمل همگن‌سازی، نمونه‌ها درون یخ قرار داده شدند تا فعالیت آن‌ها حفظ شود. ازآنجایی‌که این فراورده درون‌سلولی نیست و به صورت محلول است، به علت اختلاف دانسیته با ذرات باقی‌مانده، محلول رویی با سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ °C برای ادامه مرحله‌های جدا شد. با توجه به وزن مولکولی ۲۶ kDa پروتئین و تگ‌های همراه، در این پژوهش از اولترا فیلتراسیون با غشاهای سلولزی با برش ـ حذفی ۵ و ۳۰ کیلو دالتون برای جداسازی و تغلیظ محلول دارای مجموعه‌ای از پروتئین‌ها استفاده شد. برای جداسازی پروتئین مورد نظر از غشای ۳۰ KD استفاده شد و از غشاء ۵ KD برای تغلیظ و حذف پروتئین‌های کوچک‌تر از ۵ KD استفاده شد.

سنجش نتیجه‌های مرحله‌های گوناگون خالص سازی

برای تعیین میزان بیان هورمون پاراتیروئید انسانی در سلول‌های نوترکیب و برای تعیین خلوص در مرحله‌های گوناگون خالص‌سازی، از روش الکتروفورز با ژل اکریل آمید ۱۳٪ در حضور سدیم دودسیل سولفات SDS-PAGE استفاده شد.

اندازه گیری غلظت کل پروتئین به روش برد فورد[1]

برد فورد روشی سریع و حساس برای اندازه گیری پروتئین می‌باشد[۱۴]. در این روش برای رسم منحنی استاندارد از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد. پس از آماده سازی نمونه و خواندن جذب نمونه ها ، منحنی استاندارد ترسیم شد. از این نمودار برای اندازه‌گیری غلظت کل پروتئین نمونه‌های پروتئینی استفاده شد. برای این منظور ابتدا از سرم آلبومین با غلظت اولیه ۲ mg/mL نمونه های استاندارد ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ ، ۱/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر را با رقیق سازی به وسیله نرمال سالین ۰/۹ ٪ تهیه و سپس نمونه‌های مجهول ۱۰۰۰ برابر با نرمال سالین ۰/۹ ٪ رقیق شدند.



شکل ۲ : منحنی استاندارد برای اندازه گیری غلظت کل پروتئین به روش بردفورد

نمونه‌های مجهول و استاندارد به نسبت یک به یک با رنگ کوماسی ترکیب شدند. بلانک نیز از نسبت یک به یک، نرمال سالین با رنگ کوماسی تهیه شد. سپس جذب در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر بلانک، نمونه‌های استاندارد و نمونه‌های مجهول خوانده شد. در پایان غلظت پروتئین نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی کالیبراسیون و تراکم نوری آن‌ها تعیین شد.

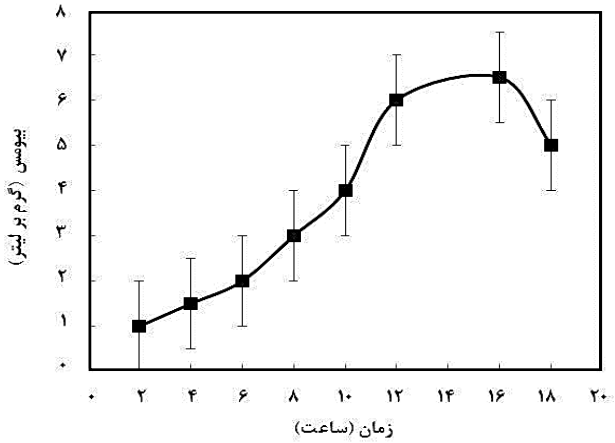
نتیجه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. برای افزایش دقت اندازه‌گیری، صرفه جویی در مصرف آلبومین و سادگی در اندازه‌گیری نمونه‌های آلبومین و مجهول هزار برابر رقیق شد.

نتیجه‌ها و بحث

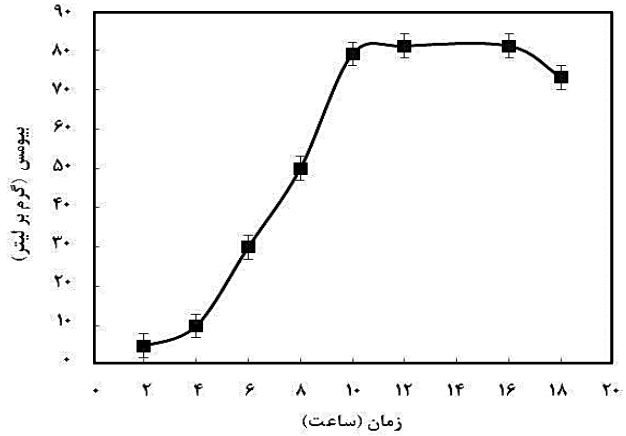
بررسی بیان پروتئین نوترکیب در کشت ناپیوسته درون ارلن

در این پژوهش ابتدا کشت به صورت ناپیوسته در ارلن بررسی شد. برای سنجش بیان در کشت ناپیوسته در ساعت‌های گوناگون نمونه‌برداری شد . نتیجه‌های این آزمایش نشان داد که در کشت ناپیوسته اگر از محیط کشت ZYP-5052 که دارای سه منبع کربنی ۰/۰۵ w/v ٪ گلوکز، ۰/۵ w/v ٪ گلیسرول، ۰/۲ w/v ٪ لاکتوز می‌باشد استفاده شود پس از ۱۶ ساعت مقدار زیست توده به ۶/۵ g/L می‌رسد. منحنی رشد باکتری Escherichia coli BL21 در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از گسستن دیواره سلولی مقدار پروتئین نیز اندازه‌گیری شد که در ساعت ۱۶ برابر ۱/۷ g/L به‌دست آمد. نتیجه آزمایش الکتروفورز نیز در شکل ۴ آورده شده است. همان‌گونه که در این شکل نشان داده شده است بیش‌ترین بیان

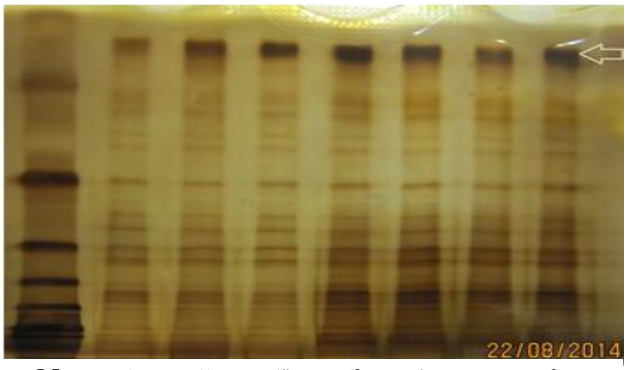
(۱) Bradford



شکل۳: منحنی رشد باکتری Escherichia coli BL21 بر حسب زمان در مقیاس ارلن



شکل۵: منحنی رشد باکتری Escherichia coli BL21 بر حسب زمان در بیوراکتور



شکل۴: نتیجه آزمایش ژل SDS-PAGE ۱۳٪ برای نمونه‌های به‌دست آمده از بیان پروتئین در ساعت‌های گوناگون کشت ناپیوسته در محیط کشت ZYP-5052 با القای خودکار، M: شاخص وزن مولکولی، ۱ نمونه ساعت ۱۱، ۲ نمونه ساعت ۱۲، ۳ نمونه ساعت ۱۳، ۴ نمونه ساعت ۱۴، ۵ نمونه ساعت ۱۵، ۶ نمونه ساعت ۱۶.

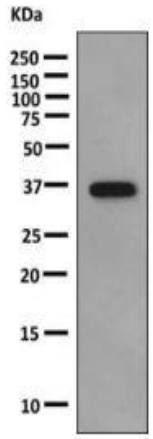
پروتئین در ۱۶ ساعت پس از کشت به دست آمده است که در ناحیه ۳۵ کیلو دالتون است. با توجه به رشد خوب باکتری در این پژوهش و سایر پژوهش ها [۱۵] و همچنین نتیجه های آزمایش الکتروفورز می‌توان گفت تولید پروتئین نو ترکیب با بیان در باکتری Escherichia coli BL21 با موفقیت انجام پذیرفته است.

کشت ناپیوسته به همراه خوراک دهی درون فرمانتور ۱۰ لیتری

برای رسیدن به دانسیته سلولی بالا، کشت ناپیوسته باکتری Escherichia coli BL21 همراه با خوراک دهی انجام شد. در واقع خوراک دهی ثانویه برای مصرف سوخت و ساز باکتری Escherichia coli BL21 استفاده می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۵ نشان داده شده است در ساعت ۱۲ ام از آغاز کشت بیشینه تولید زیست توده به‌دست آمد که پس از آن باکتری وارد فاز مرگ شد. وزن تر سلولی به ۸۱ g/L رسید. برای سنجش بیان در ساعت‌های گوناگون پس از خورک‌دهی نمونه برداشته شد. پس از جداسازی زیستی توده زیستی با سانتریفیوژ و شکستن دیواره سلولی مقدار پروتئین در ساعت ۱۲ ام به ۲۲ g/L رسید.

سرانجام برای تأیید پروتئین تولید شده از روش وسترن بلاتینگ[۱] استفاده شد. اطمینان بخش‌ترین روش برای درستی تولید پروتئین روش وسترن بلاتینگ است زیرا در این آزمایش پیوندی که سبب رنگ آمیزی می‌شود به‌طور کامل اختصاصی بوده و در نتیجه تنها پروتئین هدف رنگ آمیزی می شود. در این روش آنتی پاراتیروئید هورمون در یک واکنش ایمونولوژیک اختصاصی به پاراتیروئید هورمون انسانی متصل شده و پس از آن آنتی بادی ثانویه نیز در واکنشی ایمونولوژیک به آنتی بادی اولیه متصل می‌شود. سپس با اتصال عامل رنگ آمیزی DAB به آنتی بادی ثانویه باند پاراتیروئید هورمون انسانی همان گونه که در شکل ۶ دیده می‌شود ظاهر شود. وجود باند پروتئینی در ناحیه ۳۷ کیلو دالتون نشان دهنده درستی بیان هورمون پاراتیروئید می‌باشد. در اغلب آزمون‌ها به دلیل تشکیل دی مر، تری مر، و ... وزن باند دیده شده درست نیست، و از این روش تنها برای اثبات وجود و نبود آن استفاده می‌شود. به هر حال با توجه به نتیجه‌های این پژوهش

(۱) Western Blot



شکل ۶: آزمایش وسترن بلات پاراتیروئید هورمون انسانی

می توان گفت که پاراتیروئید هورمون انسانی نوترکیب در محیط کشت ZYP-5052 در دو حالت ناپیوسته و ناپیوسته همراه با خوراک دهی، با موفقیت تولید می شود.

به هر حال با توجه به اهمیت این پژوهش می‌توان از این دانش به‌دست آمده در تولید داروهای مهمی در جهت رفع پوکی استخوان استفاده نمود. پوکی استخوان بیماری خاموشی است که با کاهش دانسیته مواد معدنی ساختار استخوان همراه است و سبب ضعیف شدن ساختار استخوان و در پی آن افزایش احتمال شکستگی است. قابلیت یگانه پاراتیروئید هورمون در درمان پوکی استخوان افزایش دانسیته استخوان به‌صورت آنابولیک است. در واقع پاراتیروئید هورمون پلی پپتیدی ۸۴ اسیدآمینه‌ای است که در مقابل کاهش سطح کلسیم خون از غدد پاراتیروئید ترشح می‌شود. اصلی‌ترین فعالیت پاراتیروئید هورمون انسانی تنظیم غلظت کلسیم و فسفات خون با تأثیر مستقیم روی استخوان کلیه، همچنین بازسازی ساختار استخوان است. بیماری پوکی استخوان توسط سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۱ میلادی به‌عنوان چهارمین عامل تهدیدکننده زندگی بشر پس از سرطان، سکته قلبی و مغزی در نظر گرفته‌شده است.

نتیجه گیری

هورمون انسانی پاراتیروئید با افزایش جذب روده‌ای کلسیم، کاهش دفع کلیوی و افزایش فعالیت استئوکلاستها موجب افزایش سطح کلسیم خون می شود. در صورت ناکافی بودن کلسیم در خون، این عنصر به طور معمول از استخوان‌ها برداشته می‌شود تا میزان آن در خون ثابت بماند که این موضوع نیز باعث پوکی استخوان خواهد شد. بنابراین این هورمون در درمان پوکی استخوان و بیماری‌های ناشی از اختلال‌های غدد پاراتیروئید کاربرد فراوانی دارد. در این پژوهش از پلاسمید Puc 57 و سویه E.coli DH5α برای کلون کردن و از پلاسمید Pet 32a(+) و سویه E.coli BL21 برای بیان پروتئین استفاده شد. نتیجه‌های کشت ناپیوسته و ناپیوسته به همراه خوراک دهی E.coli BL21 در دو مقیاس ارلن و فرمانتور نشان داد که هورمون پاراتیروئید انسانی به صورت موفقیت آمیزی تولید می‌شود. نتیجه‌های آزمایش‌های وسترن بلات و الکتروفورز نیز تأیید کننده تولید این پروتئین نوترکیب بود. با توجه به عملکرد خوب میزبانی باکتری اشریشیاکلی جهت تولید پروتئین نوترکیب، این روش می‌تواند جاگزین مناسبی جهت تولید این پروتئین ارزشمند دارویی نسبت به سایر روش‌های تولید پروتئین باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵۸

مراجع

[1] Schmidt S.R," Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals", John Wiley & Sons Inc. (2013).

[2] Huang C.J., Lin H., Yang X., Industrial Production of Recombinant Therapeutics in Escherichia Coli and its Recent Advancement, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **3**: 383-399 (2012).

[3] Bieglmayer C., Prager G., Niederle B., Kinetic Analyses of Parathyroid Hormone Clearance as Measured by Three Rapid Immunoassays During Parathyroidectomy, *Clinical Chemistry*, **48**: 1731-1738 (2002).

[4] Francis S.,"Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology", McGraw Hill (2011).

[5] Al-Badran A.E., Abdul-Jabbar R.A., Extraction and Purification of Recombinant Intact Human Parathyroid Hormone (hPTH) from Bacterial Cell, *Journal of Biomedical Engineering and Informatics*, **3(2)**: 1-10 (2017).

[6] Hamedifar H., Salamat F., Saffarion M., Ghiasi M., Hosseini A., Lahiji H., Mahboudi F. *A Novel Approach for High-Level Expression of Soluble Recombinant Human Parathyroid Hormone(rhPTH 1-34) in Escherichia coli. Avicenna Journal of Medical Biotechnology* , **5(3)**: 193-201 (2013).

[7] Lövblad K. O., Essig M., Head and Neck Imaging. *European Radiology Supplements*, **2(1)**: 18-35 (2008).

[8] Vasicek, T.J., McDevitt B.E., Freeman M.W., Fennick B.J., Hendy G.N., Potts J. T.J., Kronenberg H.M., Nucleotide Sequence of the Human Parathyroid Hormone Gene, *Proc Natl Acad Sci*, **80**: 2127-2131(1983).

[9] Gardella T.J., Rubin D., Abou- Samra A.B., Keutmann H.T ., Potts J .T., Kronenberg H.M., Nussbaum S. R., Expression of Human Parathyroid Hormone-(1-84) in *Escherchia Coli* as a Factor X-Cleavable Fusion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, **265**:15854-15859 (1990).

[10] Guo Q. R., Wei D.-Z., Tong W. Y., Partial Purification oh Human Parathyroid Hormone 1-84 as a Thioredoxin Fusion form in Recombinant Escherichia Coli by Thermoosmotic Shock. *Protein Expression and Purification*, **49 (1)**: 32-8 (2006).

[11] Liu Q., Lin J., Liu M., Tao X., Wei D., Ma X., Yang S., *Large Scale Preparation of Recombinant Human Parathyroid Hormone 1-84 from Escherichia Coli, Protein Expression and Purification*, **54(2)**: 212-219 (2007).

[12] Uma S., Orthogonal Process for Purification of Recombinant Human Parathyroid Hormone(rhPTH), *US Patent 8298789B2*. (2012).

[13] Wang W., Tang W., Yan M., He K., Yang L., Jiang L., Li H. A Bicistronic Expression Strategy for Large Scale Expression and Purification of Full-Length Recombinant Human Parathyroid Hormone for Osteoporosis Therapy, *Protein Expression and Purification*, **69(2)**: 178-85(2010).

[14] Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram of 1976 Bradford M.M Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254 (1976).

[۱۵] خوانچه زر س.، هاشمی نجف آبادی س.، محمدیان ج.، خلیل زاده ر، اسفندیار س.، بهینه سازی شرایط کشت باکتری اشرشیا کولی برای اصلاح تولید قطعه نوترکیب باکتریورودوپسین، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۲)۳۲، ۹۳ تا ۱۰۱ (۱۳۹۲).