ابداع روشی کم‌هزینه و دقیق برای خالص‌سازی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی نوترکیب (hEGF)

فاطمه خدارحمی، سید عباس شجاع‌الساداتی *+

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۱۴ ـ ۱۴۱۱۵

رسول خلیل‌زاده، جعفر محمدیان

تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی

چکیده: فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) انسانی با ۵۳ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۶/۲ کیلو دالتون، پروتئینی با قابلیت تحریک رشد چندین نوع سلول است و به دلیل همین ویژگی در موارد پزشکی و تهیه فراورده‌های آرایشی کاربردهای بسیاری دارد. در این پژوهش، ابتدا پلاسمید pET23a(+) حاوی ژن EGF به باکتری اشرشیاکلی سویه BL21(DE3) منتقل شد که سویه نوترکیب به دست آمده قادر به تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی به صورت درون‌ریز بود. روند خالص‌سازی استفاده شده در این پژوهش، روشی آسان و به صرفه و دارای سه مرحله اصلی شامل بازکردن تاخوردگی مولکولی و واسرشتگی مولکول‌ها، خالص‌سازی پایانی به روش فراتصفیه و ایجاد تاخوردگی دوباره مولکول‌های جداشده می‌باشد. در این پژوهش، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در ستون فاز وارون در کنار آزمایش SDS-PAGE برای سنجش نتیجه‌های مرحله‌های گوناگون خالص‌سازی استفاده شد. درآخرین مرحله خالص‌سازی نتیجه‌های هردو آزمایش نشان‌دهنده خلوص بالا برای پروتئین جداشده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فاکتور رشد اپیدرمی انسانی، خالص‌سازی، نوترکیب، اشرشیاکلی، فراتصفیه، تاخوردگی دوباره.

KEY WORDS: *Recombinant human epidermal growth factor (rhEGF); Purification; Recombinant Escherichia coli; Ultrafiltration; Refolding.*

مقدمه

فاکتور رشد اپیدرمی انسانی(hEGF)، پلی‌پپتید تک زنجیره‌ای کوچکی با وزن مولکولی ۶۲۰۱ دالتون و ۵۳ اسیدآمینه می‌باشد و یکی از پروتئین‌هایی است که قابلیت تولید آن به صورت نوترکیب وجود دارد. در شرایط برون‌تنی فاکتور EGF انسانی یک آغازگر قوی برای بیشتر سلول‌ها با منشاء اپیدرمی بوده و در شرایط درون‌تنی این فاکتور تکثیر و تمایز بافت پوست و سلول‌های مخاطی قرنیه، شش‌ها و نای را تحریک می‌کند [۲ ، ۱]. این پروتئین در حال حاضر به عنوان یک داروی مناسب برای درمان سوختگی‌ها، عمل‌های جراحی و درمان مصدومان به‌کار می‌رود و پیش‌بینی می‌شود در آینده، کاربرد گسترده‌ای را برای ترمیم بافت‌های مخاطی و تولید لوازم آرایشی داشته باشد [۲].

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: shoja_sa@modares.ac.ir

تاکنون پژوهش‌های زیادی در مورد بیان، خالص‌سازی و تولید این پروتئین انجام شده است و فناوری‌های گوناگونی برای تولید آن به کار رفته است. این پروتئین در سامانه‌های بیانی ریزسازواره‌ها مانند *اشرشیاکلی* و قارچ‌ها بیان شده است. پروتئین EGF انسانی، اولین بار در سال ۱۹۶۲ میلادی توسط *کوهن* معرفی شده است. در سال ۱۹۸۳ میلادی ژن EGF انسانی ساخته شده و در سال ۱۹۸۶ میلادی پیش‌ساز آن کلون و بیان شده است [۶ ـ ۱].

در سال ۱۹۸۵ میلادی، *مونت* و *همکاران*، برای جداسازی پروتئین hEGF از ادرار انسانی، روش جذب چند مرحله‌ای را بر روی ستون‌های کروماتوگرافی گوناگون و سرانجام سه مرحله کروماتوگرافی فاز وارون مایع با کارایی بالا، به منظور دستیابی به تخلیص کامل به‌کار بردند[۷]. در پژوهش دیگری که توسط *جونگ لی* و *همکاران* در سال ۲۰۰۰ میلادی انجام گرفت، پروتئین hEGF به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی مایع پروتئین با سرعت بالا، جدا و خالص‌سازی شد[۸]. *یون لی* و *همکاران* در سال ۲۰۰۳ میلادی، جداسازی و خالص‌سازی hEGF از محیط‌کشت باکتری *اشرشیاکلی* نوترکیب را با استفاده از کروماتوگرافی جذبی روی بستر توسعه یافته و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالابررسی کردند[۹]. در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۰۳ میلادی توسط *سولرا* و *همکاران* انجام گرفت، پروتئین hEGF پس از تولید در باکتری *اشرشیاکلی* نوترکیب به دو روش کروماتوگرافی مایع به صورت شویشی با تغییر شیب و کروماتوگرافی تمایلی به‌صورت شویشی با تغییر شیب خالص‌سازی شد [۵]. *عبدل رضیص* و *همکاران* پژوهش دیگری را در سال ۲۰۰۶ میلادی انجام دادند که در آن، hEGF ترشح شده از باکتری *اشرشیاکلی* نوترکیب به درون محیط کشت ابتدا به وسیله شوک اسمزی جدا و سپس با استفاده از یک کیت آماده دارای لیگاند و به روش کروماتوگرافی تمایلی جداسازی شد[۱].

شارما و *همکاران* در سال ۲۰۰۸ میلادی، hEGF را در باکتری *اشرشیاکلی* نوترکیب بیان کرده و به صورت توده پروتئینی نامحلول تولید کردند. این پژوهشگران برای خالص‌سازی به‌ترتیب از روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون فاز وارون استفاده کردند[۱۰].

روشی که برای خالص‌سازی پروتئین فاکتور رشد اپیدرمی انسانی انتخاب می‌شود در میزان قیمت تمام شده پروتئین به دست آمده از اهمیت بالایی برخوردار است. در تمامی روش‌هایی که تاکنون گزارش شده‌اند، یکی از انواع کروماتوگرافی در مرحله‌های خالص‌سازی به‌کار برده شده است. هدف از این پژوهش، ابداع روش عملی و به‌صرفه‌ای برای خالص سازی این پروتئین بود که کارایی لازم را هم داشته و میزان خلوص قابل قبولی را برای پروتئین مورد بحث ارایه دهد.

بخش تجربی

میزبان، پلاسمید و ژن

میزبان استفاده شده برای تولید فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (hEGF)، سویه BL21(DE3) باکتری *اشرشیاکلی* بود که پس از انتقال پلاسمید pET23a(+) حاوی ژن EGF ، به‌صورت نوترکیب درآمد.

محیط کشت

برای نگهداری، تهیه و آزمایش اولیه سویه‌ها، از محیط کشت پیچیده LB به صورت مایع و جامد استفاده شد.

گسستن دیواره سلولی

محیط کشت حاوی باکتری نوترکیب با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۸ دقیقه در ۴°C، سانتریفوژ شد. سلول‌های ته‌نشین شده در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH=۴/۷، EDTA و PMSF، در دمای ۴°C به صورت تعلیق یکنواخت درآمد. برای عمل تخریب دیواره سلولی به روش فراصوتی از دستگاه مولد امواج فراصوت مدل WUC-D10H با توان ۶۹۰ وات استفاده شد.

شست‌وشو و حل کردن توده‌های پروتئینی

ته‌ماند به دست آمده پس از مرحله تخریب سلولی ۴ مرتبه با بافر فسفات حاوی ۳٪ حجمی ـ حجمی تریتون X-۱۰۰ شست‌وشو داده شد. در هر مرحله مخلوط پس از همگن شدن به کمک همزن مکانیکی به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفته و سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. در مرحله بعد، ته‌ماند به دست آمده از آخرین مرتبه شست‌وشو با تریتون X-۱۰۰، با بافر فسفات دارای اوره ۳ مولار شسته شد. سرانجام پس از قرار دادن توده‌های مجاور شده با اوره ۳مولار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط، تعلیق به‌دست آمده با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. به منظور حل کردن توده‌های پروتئینی از اوره ۸ مولار استفاده شد.

برای شفاف‌سازی محلول از صافی آمیکون با برش ـ حذف برابر با ۱۰۰KD استفاده شد. به‌منظورجلوگیری از به‌هم پیوستن مولکول‌های پروتئین از دی‌تیوتریتول (DTT) استفاده شد [۱۳-۱۱، ۸].

فراتصفیه

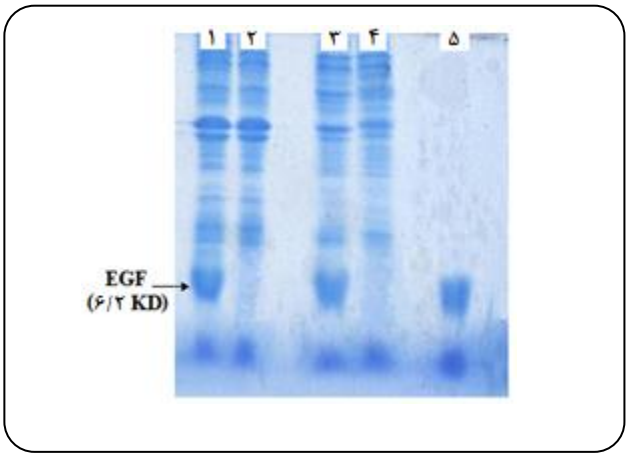
محلول شفاف به دست آمده از صاف کردن مرحله پیشین، به درون لوله‌های صافی‌دار (سامانه‌ای معروف به سنتریکون) با برش ـ حذف برابر با ۳ KD، ریخته و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و به صورت هم‌زمان صاف و جداسازی شد. در ادامه روند فراتصفیه، نمونه رقیق شده به درون لوله‌های صافی‌دار با برش ـ حذف برابر با ۱۰KD، ریخته و با سرعت‌های ۸۰۰۰، ۹۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ °C و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و به صورت همزمان صاف و جداسازی شد.

سنجش نتیجه‌های مرحله‌های گوناگون خالص‌سازی

برای تعیین میزان بیان و خلوص در مرحله‌های گوناگون خالص سازی فاکتور رشد اپیدرمی انسانی در سلول‌های نوترکیب، از روش الکتروفورز با ژل اکریل‌آمید ۱۵٪ در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد. آخرین مرحله بررسی خلوص پروتئین hEGF نوترکیب، استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز وارون بود. برای این منظور از ستون C۱۸ فاز وارون (SIGMA) در دستگاه Younglin Instrument(UV 7300) استفاده شد. بافرهای مورد استفاده برای انجام کروماتوگرافی محلول‌های ۱٪(v-v) تری‌فلورو استیک اسید (TFA) در آب دوبار تقطیر بدون یون و ۱٪(v-v) تری‌فلورو استیک اسید در استونیتریل بودند. در این مورد، از روش تجزیه شویشی با تغییر شیب به این ترتیب استفاده شد که در ابتدای آزمایش، فاز متحرک با نسبت ۱۰۰ به ۰ به ترتیب از محلول ۱٪ تری‌فلورو استیک اسید در آب و محلول ۱٪ اسید تری‌فلورو استیک در استونیتریل آغاز و پس از گذشت مدت‌زمان ۵۰ دقیقه با وارون این نسبت به پایان رسید.

بازیابی شکل فضایی پروتئین

برای ایجاد دوباره تاخوردگی در مولکول پروتئین، محلول سیستئین باغلظت ۵ mM به محلول به دست آمده از فراتصفیه افزوده شد، پس از گذشتن مدت زمان ۱ ساعت در دمای محیط،



شکل ۱ـ نتیجه آزمایش الکتروفورز سلول‌های نوترکیب و غیرنوترکیب باکتری پس از گسستن دیواره سلولی، ۱و ۲: باکتری نوترکیب با تزریق ۲۰ و ۱۲ میکرولیتر، ۳ و ۴: باکتری غیرنوترکیب با تزریق ۲۰ و ۱۲ میکرولیتر و ۵: نمونه hEGF استاندارد.

سیستین با غلظت ۵ mM به محلول بالا افزوده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار گرفت[۸].

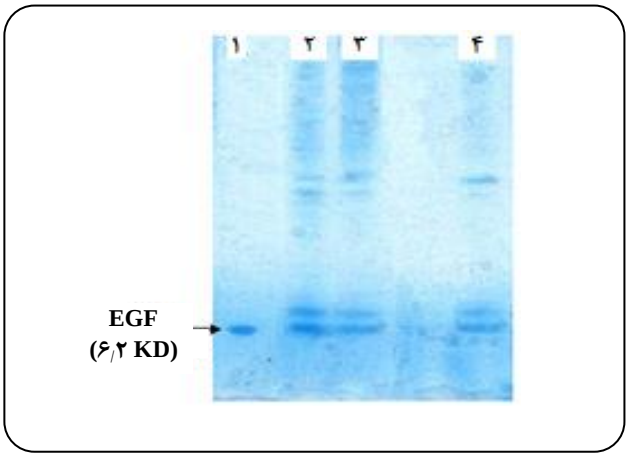
نتیجه‌ها و بحث

پس از اطمینان از بیان مناسب پروتئین hEGF به‌وسیله القاگر IPTG در باکتری اشرشیاکلی نوترکیب به روش انجام آزمایش الکتروفورز SDS-PAGE که نتیجه آن در شکل ۱ دیده می‌شود، دیواره سلولی گسسته و توده نامحلول پروتئین به صورت تعلیق یکنواخت در بافر فسفات درآمد.

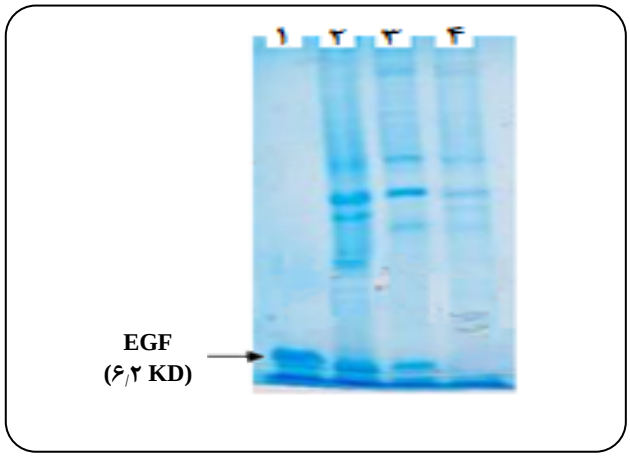
مرحله شست‌وشو و حل‌کردن توده نامحلول پروتئینی

در ادامه و در مرحله بعدی، توده نامحلول پروتئینی با مواد واسرشته کننده با غلظت بالا حل شد. در این پژوهش با استفاده از تریتون۱۰۰-X با غلظت ۳٪ در بافر فسفات، همراه با شست‌وشو بخش چشمگیری از آلودگی‌ها و به‌ویژه چربی‌های غشایی حل شده و به صورت روماند از محیط خارج شد. نتیجه‌های چهار مرحله شست‌وشوی توده نامحلول پروتئینی با این ماده فعال سطحی غیر یونی در شکل۲ آورده شده است.

گفتنی است که برای شکستن دیواره سلولی و حذف چربی‌ها از سدیم دودسیل سولفات نیز استفاده شد اما به دلیل ایجاد مشکلاتی در جداسازی این شوینده از توده نامحلول پروتئینی و دست نیافتن به خلوص مناسب برای پروتئین مورد بحث، این شوینده مورد استفاده قرار نگرفت.



شکل ۲ـ نتیجه آزمایش الکتروفورز پس از اثر تریتون X-۱۰۰ بر توده پروتئینی نامحلول. ۱: نمونه استانداردEGF، ۲:نمونه شسته نشده با تریتون X-۱۰۰ ،۳:نمونه دو بار شسته شده با تریتون X-۱۰۰ و ۴:نمونه چهار بار شسته شده با تریتون X-۱۰۰.



شکل ۳ـ نتیجه آزمایش الکتروفورز نمونه‌های حل شده در اوره ۸ مولار پیش و پس از عبور توده از صافی با برش- حذف برابر با۱۰۰KD. ۱: نمونه استانداردEGF،۲و۳: نمونه‌های عبور کرده از صافی با تزریق به‌ترتیب۲۰ و۱۲ میکرولیتر و۴:نمونه توده باقی مانده در روی صافی.

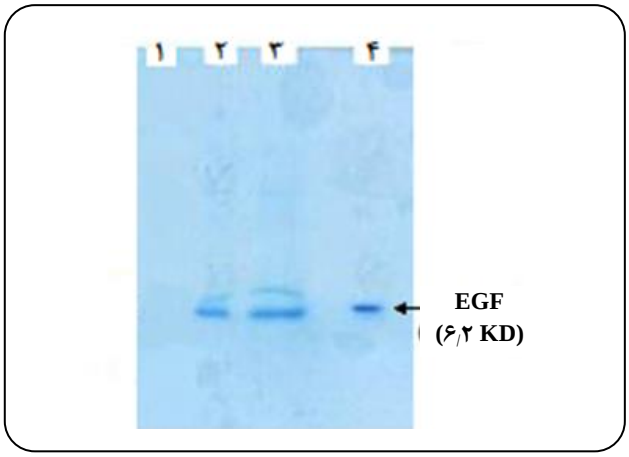
توده نامحلول پروتئینی پس از شست‌وشو، در اوره ۸ مولار حل شد که نتیجه این مرحله در شکل ۳ دیده می‌شود. دلیل استفاده از اوره این است که این ماده به‌صورت مستقیم و غیر مستقیم باعث بر هم زدن شکل طبیعی و باز شدن تاخوردگی مولکول‌های پروتئینی می‌شود. مولکول‌های اوره به‌طور مستقیم جذب گروه‌های آب‌دوست و قطبی در سطح پروتئین ها می شوند. این مولکول‌های جذب شده به گروه های قطبی، اثر دفعی بر یکدیگر دارند. بر اثر این نیروی دفعی موجود در سطح، مولکول پروتئین باز شده و متورم می‌شود، به‌طوری که گروه‌های آب‌گریز موجود در داخل ساختمان پروتئین را در معرض محیط خارجی قرار می‌دهد. ورود آب و اوره به درون ساختمان پروتئین سبب ایجاد بی‌ثباتی و برهم زدن شکل طبیعی پروتئین می شود[۱۴].

تعلیق یکنواخت به دست آمده از اثر اوره بر توده نامحلول پروتئینی به‌منظور جداسازی مولکول‌های پروتئین حل شده و حذف آلودگی‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ شد اما جداسازی مناسب انجام نشد. صافی با برش ـ حذف ۱۰۰KD به عنوان راه حل این مشکل به‌کار گرفته شد و با عبور تعلیق یکنواخت توده نامحلول پروتئینی در اوره از این صافی نتیجه مطلوب به دست آمد. برش ـ حذف ۱۰۰KD به‌دلیل سادگی عبور نسبی مخلوط از آن، قابلیت عبوردهی محدوده مطمئنی از اوزان مولکولی برای ادامه روند خالص سازی و دستیابی به شفافیت مطلوب برای عبور دادن مخلوط از صافی‌های با برش ـ حذف‌های پایین انتخاب شد.

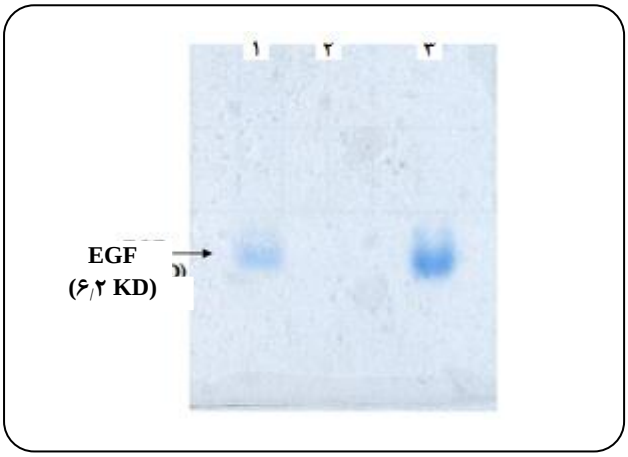
مرحله فراتصفیه

با توجه به وزن مولکولی پایین پروتئین hEGF (۶/۲ KD) و ناچیز بودن پروتئین های میزبان با وزن مولکولی نزدیک به آن، روش صاف کردن را می‌توان برای جداسازی این پروتئین از دیگر محتویات سلول به‌کار برد. در این پژوهش از دو مرحله فراتصفیه برای صاف کردن محلول حاوی مجموعه‌ای از پروتئین‌ها استفاده شد. از آن‌جا که ممکن بود مولکول‌هایی با اوزان مولکولی کم‌تر از ۶/۲ KD در زمان انجام مرحله‌های پیشین و به صورت آلودگی وارد محلول شده باشد و صافی مورد استفاده برای مرحله دوم فراتصفیه و خالص‌سازی پایانی برش ـ حذفی برابر با ۱۰KD داشت، لازم بود تا پیش از عبور محلول از این صافی آلاینده‌های احتمالی سبک‌تر از محیط خارج شوند. به این منظور و در اولین مرحله‌ی فراتصفیه محلول بالا از صافی با برش ـ حذف ۳ KD عبور داده شد.

سپس مرحله دوم تصفیه یعنی عبور روماند صافی پیشین، از صافی با برش ـ حذف برابر با ۱۰KD، انجام شد و عبور پروتئین hEGF به‌طور خالص مورد انتظار بود. به این منظور، نمونه درون لوله‌های سانتریفوژ صافی‌دار ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت‌های گوناگون ۸۰۰۰، ۹۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ °C، سانتریفوژ شدند. سرعت‌های گوناگون سانتریفوژ، با هدف بررسی و تعیین سرعت و به عبارت دیگرنیروی گریز از مرکز مناسب برای جداسازی پروتئین hEGF مورد آزمایش قرار گرفت. با دیدن شکل‌های ۴و ۵ به‌راحتی می‌توان سرعت مناسب برای جداسازی را انتخاب کرد.



شکل ۴ـ نمونه های زیر صافی با برش- حذف = ۱۰٫۱KD: نمونه زیر صافی با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه، ۲: نمونه زیر صافی با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با غلظت ۱۵ میکرولیتر،۳: نمونه زیر صافی با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه با غلظت ۲۰ میکرولیتر و ۴:نمونه استانداردEGF.



شکل ۵ ـ نمونه زیر صافی با برش- حذف = ۱۰KD. ۱: نمونه صاف شده با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه و ۲: نمونه استانداردEGF.

حد بالایی سرعت قابل دستیابی برای دستگاه سانتریفیوژ یعنی ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، به حدی بالا بود که باعث عبور مولکول‌های سنگین‌تر از پروتئین هدف شده بود و سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه نیز نیروی لازم برای عبور پروتئین هدف از صافی را تأمین نکرد. سرانجام سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌عنوان سرعت مناسب برای تخلیص کامل فاکتور رشد اپیدرمی انسانی از باکتری نوترکیب اشرشیاکلی انتخاب شد.

خلوص نمونه عبور داده شده از صافی با برش ـ حذف ۱۰KD و سانتریفوژ شده با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون فاز وارون نیزتأیید شد.

نتیجه‌گیری

روش پیشنهادی روشی آسان، مقرون به‌صرفه و مناسب برای جداسازی و تخلیص پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین می‌باشد. از انواع روش‌های کروماتوگرافی مانند روش جذب روی بستر توسعه یافته، تمایلی، تعویض یون، مایع با کارایی بالا، به‌عنوان یکی از مرحله‌های اصلی در روند خالص‌سازی این پروتئین استفاده شده است که این امر باعث پرهزینه شدن فرایند خالص‌سازی می‌شود. در پژوهش حاضر، برای نخستین بار از روش جداسازی با سانتریفوژ و صافی استفاده شد و از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تنها برای سنجش خلوص پروتئین نهایی استفاده شد. وزن مولکولی پایین پروتئین hEGF این امکان را می‌دهد که بتوان روش فراتصفیه را به‌عنوان اساس کار در این پژوهش انتخاب نمود. در مواردی که از روش تصفیه برای خالص‌سازی پروتئین استفاده می‌شود، انتخاب صافی‌های مناسب و ترتیب استفاده از آن‌ها باید مورد توجه قرار گیرد. البته باید توجه داشت، که مرحله شست‌وشو در این فرایند بسیار با اهمیت بوده و در صورت وجود نقص یا اشکال در این مرحله، روند خالص‌سازی به نتیجه نخواهد رسید. سرانجام می‌توان گفت که بر اساس این پژوهش، تنها با استفاده از روش فراتصفیه و با استفاده از بهترین سرعت سانتریفوژ که ۹۰۰۰rpm تعیین شد، می‌توان به خلوص بالایی از فاکتور رشد اپیدرمی انسانی (hEGF) دست یافت. کاهش چشم‌گیر هزینه جداسازی و خالص‌سازی پروتئین hEGF، با توجه به استفاده نکردن از روش کروماتوگرافی در روند خالص‌سازی نیز از برتری‌های دیگر این روش می‌باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۹

مراجع

[1] Sharma K., Cherish Babu P.V., Sasidhar P., Srinivas V.K., Krishna Mohan V., Krishna Ella, Recombinant Human Epidermal Growth Factor Inclusion Body Solubilization and Refolding at Large Scale using Expanded-Bed Adsorption Chromatography from *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, **60**: 7-14 (2008).

[2] Huang R.C., Lam E., Chen Y.H., Hackett J, Lam T.L., Liu D., Ma M.C., Siu K.L., Sivakesava S., Xu Z.N., Wong R.S.C. Wong W.K.R., Human Epidermal Growth Factor Excreted by Recombinant *Escherichia coli* K-12 has the Correct N-Terminus and is Fully Bioactive, *Process Biochem.*, **35**: 1-5 (1999).

[۳] شجاع‌الساداتی، سید عباس؛ خلیل‌زاده، رسول؛ محمدیان، جعفر؛ "کلونینگ و بیان فاکتور رشد اپیدرمی انسانی در باکتری اشرشیاکلی"، گزارش پروژه تحقیقاتی، صفحات۲-۲۰ (۱۳۸۶).

[4] Heo J.H., Won H.S., Kang H.A., Rhee S.K. Chung B.H., Purification of Recombinant Human Epidermal Growth Factor Secreted from the Methylotrophic Yeast Hansenula Polymeorpha, *Protein Expression and Purification*, **24**: 117-122 (2002).

[5] Soler L.F., Cedano J., Querol E. Liorens R., Cloning, Expression and Purification of Human Epidermal Growth Factor using Different Expression Systems, *Journal of Chromatography*, **788**: 113-123 (2003).

[6] Finkenaur, "Stabilized Compositions Containing Epidermal Growth Factor", US Patent References, Publication Number *EP 0267015 A2* (1988).

[7] Mount C.D., Lukas T.J., Orth D.N., Purification and Characterization of Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Fragments from Large volumes of Human Urine, *Arch Biochem. Biophys.*, **240**: 33-42 (1985).

[8] Lee J.Y., Chang S.Y., Chung Y., Lee Y.S. Lee E.K., Scale-up Process for Expression and Renaturation of Recombinant Human Epidermal Growth Factor from *Escherichia coli* Inclusion Bodies, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **31**: 245-248 (2000).

[9] Lee Y.S., Suh C.W., Park S.K. Lee E.K., Purification of Soluble Human Epidermal Growth Factor (hEGF) from Recombinant *Escherichia coli* Culture Broth by Using Expanded-Bed Adsorption Chromatography, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **38**: 9-13 (2003).

[10] Abdull Razis A.F., Ismail E.N., Hambali Z., Abdullah M.N.H., 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 Biotechnology*, **14**: 41-45 (2006).

[۱۱] اسفندیار، سمانه؛ "خالص سازی اینترلوکین-۲ تولید شده در باکتری اشرشیاکلی نوترکیب"، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس (۱۳۸۷).

[12] Getz E.B., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R. Selvin P.R., A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitolfor Use in Protein Biochemistry, *Analytical Biochem.*, **273**: 73-80 (1999).

[13] Reddya G.B., Narayananb S., Reddya P.Y., Suroliab I., Suppression of DTT-Induced Aggregation of Abrin by KA- and KB-Crystallins: a Model Aggregation Assay for K-Crystallin Chaperone Activity in Vitro, *Federation of European Biochemical Societies*, **522**: 59-64 (2002).

[14] Stevan Jovanovich, Carol J. Tillis, David L. Barker, "Handbook of Protein Purification", Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala Sweden (2001).