ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):1-7

Optimized Solubilization and Purification of Recombinant Teriparatide Fusion Protein Expressed in *E. coli*

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Abbaszadeh S.[1] *MSc,*
Bakhtiari N. *[*1] *PhD,*
Amin-Bayat Z. [1] *PhD*

How to cite this article
Abbaszadeh S, Bakhtiari N, Amini-Bayat Z. Optimized Solubilization and Purification of Recombinant Teriparatide Fusion Protein Expressed in *E. coli*. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1): 1- 7.

ABSTRACT

Aims There are several cell disruption methods for intracellular protein extraction. The aim of this study was to select the best approach for recombinant teriparatide fusion protein extraction from E. coli and achieve the best purification conditions.

Materials & Methods In this experimental research, bacterial cells were disrupted by different methods such as sonication in different cycles, grinding with liquid nitrogen in two different cell culture volumes, and homogenization at two different pressures. The supernatant and pellet samples were run on sodium dodecyl sulphate gel. All the cell lysates were cultured on LB agar medium and stained with Gram staining method. The Ni2+ affinity chromatography of recombinant teriparatide fusion protein was done under denaturing and non-denaturing conditions, using pH and imidazole concentration gradient, respectively. All samples were taken on sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel and the amount of purified protein was calculated by Micro-Bradford assay.

Findings In the 20 and 25 cycles, a large part of the fusion protein led to protein solubilization. In the method of grinding with liquid nitrogen, proteins were more likely to enter the sediment part. The cell disruption was complete in a chemical method. The cell disruption under 50bar homogenization was more than that of 15bar. In chemical degradation and sonication, a large amount of fusion protein led to protein solubilization. In non-denaturing conditions, no recombinant fusion protein was removed from the column with the isolation buffer, but in the denaturing conditions, a large amount of proteins was purified.

Conclusion The combined method of chemical degradation and sonication leads to approximately 97.7% of protein solubilization, and the purification in denaturing condition has also the suitable result in contrast to non-denaturing condition.

Keywords Cell Disruption; *E. coli*; Purification; Recombinant Teriparatide Fusion Protein

[1]Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Research Complex of the Age of Revolution, End of Enghelab Street, Ahmad Abad Mostofi, Azadegan Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 3313193685.
Phone:-
Fax: +98 (21) 56276636
nbakhtiari@irost.ir

Article History
Received: October 16, 2016
Accepted: September 16, 2018
ePublished: March 16, 2019

CITATION LINKS

[1] Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products [2] Protein purification. In: Ekinci D, editor. Chemical biology [3] Bacterial cell disruption: A crucial step in protein production [4] Nonclassical inclusion bodies in Escherichia coli [5] Affinity chromatography: Principles and applications [6] Metal ion affinity adsorption of a Zn (II)-transport protein present in maternal plasma during lactation: Structural characterization and identification as histidine-rich glycoprotein [7] Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials, serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions [8] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags [9] Overexpression of recombinant human teriparatide, rhP TH (1-34) in Escherichia coli: An innovative gene fusion approach [10] Soluble protein production methods [11] Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies [12] Purification of polyhistidine-tagged proteins. In: Walls D, Loughran S, editors

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

محلول‌سازی و تخلیص بهینه پروتئین نوترکیب امتزاجی تری‌پاراتید بیان‌شده در *اشریشیا کلی*

سپیده عباس‌زاده MSc
پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
ناهید بختیاری* PhD
پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
زهرا امینی‌بیات PhD
پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: روش‌های تخریب سلولی مختلفی برای استخراج پروتئین‌های داخل سیتوپلاسمی وجود دارد. هدف مطالعه حاضر انتخاب بهترین روش استخراج پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید از میزبان باکتریایی *اشریشیا کلی* و دستیابی به بهترین شرایط تخلیص آن بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، سلول‌های باکتری با روش‌های سونیکاسیون با دورهای متفاوت، له‌کردن در نیتروژن مایع، هموژناسیون تحت دو فشار مختلف و روش شیمیایی شکسته شدند. نمونه‌های مربوط به رسوب و محلول رویی حاصل از هر روش، در ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات الکتروفورز شدند. سلول‌های شکسته‌شده در محیط کشت لوریا برتانی جامد کشت و به‌روش گرم رنگ‌آمیزی شدند. کروماتوگرافی تمایلی نیکل برای خالص‌سازی پروتئین در شرایط واسرشته و غیرواسرشته به‌ترتیب با شیب pH و غلظت ایمیدازول به کار رفت. تمامی نمونه‌ها روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید برده شدند و محاسبه میزان پروتئین تخلیص‌شده با آزمون میکروبرادفورد صورت گرفت.
یافته‌ها: در دورهای ۲۰ و ۲۵دور در دقیقه بخش زیادی از پروتئین امتزاجی وارد بخش محلول شد. در روش له‌کردن در نیتروژن مایع، پروتئین‌ها بیشتر وارد بخش رسوب شدند. تخریب سلول‌ها در روش شیمیایی کامل بود. شکستن سلول‌ها با هموژناسیون تحت فشار ۵۰بار، بیشتر از ۱۵بار بود. در تخریب شیمیایی همراه با سونیکاسیون مقدار بسیار زیادی از پروتئین امتزاجی وارد بخش محلول شد. در شرایط غیرواسرشته هیچ پروتئین امتزاجی نوترکیبی با بافر جداسازی از ستون خارج نشد، اما در شرایط واسرشته مقدار زیادی از پروتئین تخلیص شد.
نتیجه‌گیری: در تخریب شیمیایی همراه با سونیکاسیون، ۹۷/۷% پروتئین کل به بخش محلول وارد می‌شود و تخلیص در شرایط واسرشته برخلاف شرایط غیرواسرشته به‌طور مناسب و مطلوب صورت می‌گیرد.
کلیدواژه‌ها: تخریب سلولی، *اشریشیا کلی*، تخلیص، پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵
*نویسنده مسئول: nbakhtiari@irost.ir

مقدمه

شکستن سلول‌ها به دلایل مختلفی از جمله برای استخراج و خالص‌سازی پروتئین‌ها انجام می‌شود و روش‌های مختلفی برای آن وجود دارد. این روش‌ها شامل روش‌های زیستی مانند تخریب سلول‌ها توسط آنزیم‌هایی مانند لیزوزیم، روش‌های شیمیایی مانند استفاده از شوینده‌های مختلف و روش‌های مکانیکی مانند سونیکاسیون، هموژناسیون، فریزکردن و ذوب‌کردن، له‌کردن در نیتروژن مایع و تخریب با استفاده از دانه‌های شیشه‌ای هستند[1].
هیچ کدام از روش‌های فوق، روش مناسب و عمومی برای تخریب سلولی در تمام شرایط نیست و هر روش در شرایط خاص بر دیگری ارجحیت دارد. عواملی مانند خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین و نوع میزبانی که این پروتئین را تولید می‌کند و حتی هدف پژوهش، نوع روش شکستن برای استخراج پروتئین را تعیین می‌کنند[2].
در مواردی که هدف، استخراج پروتئین‌های محلول باشد، ایجاد یک شکاف کوچک در دیواره سلولی باکتری‌ها کافی است و این کار با روش‌های مختلف تخریب سلولی امکان‌پذیر است، اما در استخراج اجسام توده‌ای، دیواره باید به‌طور گسترده شکافته شود. حتی نوع اجسام توده‌ای در انتخاب روش مناسب برای تخریب سلولی تاثیرگذار است. انواع مختلف اجسام توده‌ای با حلالیت و شکنندگی‌های مختلفی وجود دارند[3]. در یک دسته‌بندی، اجسام توده‌ای به دو گروه کلاسیک و غیرکلاسیک تقسیم می‌شوند. اجسام توده‌ای غیرکلاسیک در مقایسه با انواع کلاسیک شکننده‌تر و حلالیت بیشتری دارند[4].
برای تخلیص پروتئین مورد نظر از عصاره استخراج‌شده روش‌های مختلفی وجود دارد، یکی از این روش‌ها کروماتوگرافی تمایلی است. اساس کروماتوگرافی تمایلی بر تعاملات برگشت‌پذیر و اختصاصی بین پروتئین مورد نظر و گروه عاملی متصل به رزین کروماتوگرافی استوار است[5].
یکی از روش‌های رایج کروماتوگرافی تمایلی، استفاده از یون‌های فلزی برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب دارای دنباله هیستیدینی است. این روش بر پایه برهم‌کنش بین دنباله هیستیدینی با یون فلزی تثبیت‌شده روی رزین که معمولاً مس (Cu^{2+})، نیکل (Ni^{2+})، کبالت (Co^{2+}) و روی (Zn^{2+}) هستند، استوار است[6, 7]. در نهایت برای جداسازی پروتئین متصل‌شده به رزین در حالت غیرواسرشته پروتئین از شیب غلظت ایمیدازول به‌عنوان مولکول رقیب هیستیدین و در حالت واسرشته آن از شیب pH برای از بین‌بردن شرایط بهینه اتصال پروتئین مورد نظر با رزین تمایلی استفاده می‌شود[8]. در فرآیند تخلیص پروتئین‌ها همواره تلاش بر آن است که بیشترین میزان پروتئین مورد نظر خالص‌سازی شود.
برخی از سئوالات پژوهش حاضر شامل موارد زیر بودند:
آیا پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید به‌صورت اجسام توده‌ای یا محلول بیان شده است؟
با توجه به نوع پروتئین بیان‌شده، بهترین روش استخراج آن از میزبان باکتریایی چیست؟
پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید در چه شرایطی (واسرشته یا غیرواسرشته) با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل خالص می‌شود؟
پژوهش حاضر با هدف انتخاب بهترین روش استخراج پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید از میزبان باکتری *اشریشیا کلی* (*E. coli*) و در نهایت دستیابی به بهترین شرایط تخلیص آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر برای سنجش مقدار پروتئین از روش میکروبرادفورد (۱۰۰میلی‌لیتر محلول برادفورد حاوی ۱۰میلی‌گرم کوماسی‌بلو G250، ۵میلی‌لیتر اتانول ۹۵%، ۱۰میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۸۵% و ۸۵میلی‌لیتر آب مقطر است که از کاغذ صافی Fisher brand QL120 عبور داده شده است) استفاده شد و نرمال‌سازی نمونه‌های بارگذاری‌شده در الکتروفورز ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید بر مبنای تعداد باکتری با احتساب دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰نانومتر صورت گرفت.
سلول باکتری، محیط و شرایط کشت: باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) نوترکیب حاوی پلاسمید pET-28a (دارای ژن

نوترکیب پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید) [9] ابتدا در محیط لوریا برتانی جامد حاوی ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و به‌مدت ۱۶ساعت در دمای ۳۷°C قرار داده شد. سپس یک کلنی حاصل از کشت شبانه در محیط لوریا برتانی مایع حاوی ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین تلقیح و به‌مدت ۱۶ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C و سرعت چرخش ۱۵۰دور در دقیقه قرار گرفت.

در محیط کشت ۱۵۰ و ۱۵میلی‌لیتری تازه لوریا برتانی مایع حاوی ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین، کشت شبانه به نسبت ۱ به ۱۶۰ تلقیح شد و در شرایط ذکرشده فوق قرار گرفت تا چگالی نوری آن در طول موج ۶۰۰نانومتر به حدود ۰/۶ تا ۰/۷ برسد. سپس ۰/۲میلی‌مولار القاکننده ایزوپروپیل‌تیوگالاکتوزید به آن اضافه شد و به‌مدت ۱۶ساعت با سرعت ۱۵۰دور در دقیقه در دمای ۲۸°C قرار گرفت.

جمع‌آوری سلول‌ها: رسوب سلولی هر نمونه با انجام سانتریفیوژ توسط دستگاه Hettich universal 320 R؛ آلمان) به‌مدت ۱۰دقیقه و با سرعت ۷۰۰۰دور در دقیقه از محیط کشت جدا و محلول رویی دور ریخته شد.

سونیکاسیون: رسوب حاصل از چهار نمونه محیط کشت ۱۵۰میلی‌لیتری جدا و هر نمونه در ۶میلی‌لیتر بافر ویژه شکست (تریس ۵۰میلی‌مولار، EDTA ۵میلی‌مولار و pH برابر ۵/۸) به‌مدت یک‌دقیقه در حمام یخ همگن‌سازی شد. هر چهار قسمت با تعداد دورهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ (دور در دقیقه) و با دامنه فرکانس ۴۰% به‌مدت یک‌دقیقه و زمان استراحت یک‌دقیقه (یک‌ثانیه پالس و یک‌ثانیه بدون پالس)، در حمام یخ و با دستگاه سونیکاتور مدل BANDELIN SONOPULS HD 200 تحت امواج ماورای صوت قرار داده شدند. محلول رویی و رسوب پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها با سرعت ۷۵۰۰دور در دقیقه در دمای ۴°C و به‌مدت ۲۰دقیقه از هم جدا و مقادیر مساوی از محلول رویی و رسوب از هر نمونه در ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز شدند.

له‌کردن در نیتروژن مایع: رسوب مربوط به ۱۵۰میلی‌لیتر محیط کشت در ۶میلی‌لیتر و رسوب مربوط به ۱۵میلی‌لیتر محیط کشت در ۰/۶میلی‌لیتر بافر ویژه شکست ذکرشده حل شدند. سپس هر نمونه ۲بار توسط نیتروژن مایع فریز و با دسته هاون کوبیده شد. محلول رویی و رسوب نمونه‌ها پس از ۲۰دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۷۵۰۰دور در دقیقه در دمای ۴°C از هم جدا و مقادیر مساوی از آنها در ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز شدند.

تخریب شیمیایی: رسوب حاصل از ۱۵۰میلی‌لیتر محیط کشت در ۵۰میلی‌لیتر بافر شکست شیمیایی (فسفات‌سدیم ۱۰۰میلی‌مولار، تریس ۱۰میلی‌مولار، اوره ۸مولار و pH برابر ۸) به‌مدت ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. از هر نمونه یک‌میلی‌لیتر برداشته و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۷۵۰۰دور در دقیقه در دمای ۴°C و به‌مدت ۲۰دقیقه رسوب داده شد، سپس محلول رویی از هم جدا و مقادیر مساوی از آنها در ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید الکتروفورز شدند. همچنین میزان پروتئین کل واردشده در فاز محلول با استفاده از روش میکروبرادفورد محاسبه شد.

هموژناسیون: به رسوب حاصل از ۱۵۰میلی‌لیتر محیط کشت، ۵۰میلی‌لیتر بافر شکست شیمیایی ذکرشده در بخش بالا اضافه شد. سپس با استفاده از هموژنایزر مدل GEA Niro Soavi, Panda PLUS 2000، تخریب سلولی تحت فشار ۱۵ و ۵۰بار صورت گرفت. از هر نمونه یک‌میلی‌لیتر برداشته و مراحل ذکرشده در روش‌های قبل، در هموژناسیون نیز تکرار شد.

سونیکاسیون همراه با تخریب شیمیایی: به رسوب حاصل از ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۵۰میلی‌لیتر بافر شکست شیمیایی ذکرشده در بخش بالا اضافه شد. سونیکاسیون در دور ۲۰دور در دقیقه مطابق شرایط گفته‌شده انجام شد. سپس نمونه به‌مدت ۶۰دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بقیه مراحل مانند قبل تکرار شد. همچنین در حالتی دیگر، ابتدا تخریب شیمیایی و سپس سونیکاسیون صورت گرفت.

کشت روی پلیت: ۵۰میکرولیتر از سلول‌های شکسته‌نشده (10^5 برابر رقیق‌شده در سرم فیزیولوژی) و سلول‌های شکسته‌شده با روش‌های مختلف، روی محیط کشت‌های جداگانه لوریا برتانی جامد حاوی ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کانامایسین کشت گسترده داده شدند و به‌مدت ۱۶ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند.

از سلول‌های شکسته‌نشده و تمام سلول‌های شکسته‌شده به روش‌های مختلف، لام تهیه شد و برای آنها رنگ‌آمیزی گرم صورت گرفت.

تخلیص پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل در شرایط غیرواسرشته: به ۴میلی‌لیتر محلول حاصل از تخریب سلولی به روش سونیکاسیون همراه با تخریب شیمیایی، ایمیدازول با غلظت نهایی ۱۰میلی‌مولار افزوده شد و سپس به مدت یک‌ساعت در ستون حاوی یک‌میلی‌لیتر رزین Ni-NTA (نیکل- نیتریلوتری‌استیک‌اسید؛ کیاژن؛ آلمان) قرار گرفت. پس از جمع‌آوری مایع خارج‌شده، ابتدا ستون به‌وسیله ۴میلی‌لیتر و سپس ۸میلی‌لیتر بافر شست‌وشو (ایمیدازول ۲۰میلی‌مولار، فسفات‌سدیم ۵۰میلی‌مولار، کلریدسدیم ۳۰۰میلی‌مولار و pH برابر ۸) شسته و مایع حاصل از آن جمع‌آوری شد. به‌منظور کنده‌شدن پروتئین‌های امتزاجی حاوی دنباله هیستیدینی تری‌پاراتید از رزین، ۴میلی‌لیتر بافر جداسازی (ایمیدازول ۲۵۰میلی‌مولار، فسفات‌سدیم ۵۰میلی‌مولار، کلریدسدیم ۳۰۰میلی مولار و pH برابر ۸) از ستون عبور داده شد و سپس مایع خارج‌شده از ستون جمع‌آوری شد. تمامی نمونه‌های خارج‌شده در مراحل مختلف تخلیص، روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید برده شدند و در نهایت میزان پروتئین امتزاجی تخلیص‌شده با استفاده از آزمون میکروبرادفورد محاسبه شد.

تخلیص پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل در شرایط واسرشته: ۴میلی‌لیتر محلول حاصل از تخریب سلولی به روش سونیکاسیون همراه با تخریب شیمیایی، به‌مدت یک‌ساعت در ستون حاوی یک‌میلی‌لیتر رزین Ni-NTA قرار داده شد. پس از جمع‌آوری مایع خارج‌شده، ستون ابتدا به‌وسیله ۴ و سپس ۸میلی‌لیتر بافر شست‌وشو (تریس ۱۰میلی‌مولار، فسفات‌سدیم ۱۰۰میلی‌مولار، اوره ۸مولار و pH برابر ۶/۳) شسته و مایع حاصل از آن جمع‌آوری شد. سپس بافرهای جداسازی ۱ (تریس ۱۰میلی‌مولار، فسفات‌سدیم ۱۰۰میلی‌مولار، اوره ۸مولار و pH برابر ۵/۹)، ۲ (تریس ۱۰میلی‌مولار، فسفات‌سدیم ۱۰۰میلی‌مولار، اوره ۸مولار و pH برابر ۴/۵) و ۳ (تریس ۱۰میلی‌مولار، فسفات‌سدیم ۱۰۰میلی‌مولار، اوره ۸مولار و pH برابر ۴) از ستون عبور داده شد تا پروتئین‌های امتزاجی حاوی دنباله هیستیدینی تری‌پاراتید از رزین کنده شوند. مایع خارج‌شده از ستون جمع‌آوری و جذب آن در طول موج ۲۸۰نانومتر خوانده شد.

تمامی نمونه‌های خارج‌شده در مراحل مختلف تخلیص روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌اکریل‌آمید برده شدند و در نهایت میزان پروتئین امتزاجی تخلیص‌شده با استفاده از آزمون میکروبرادفورد

محاسبه شد. اندازه‌گیری بیان بالای ۵۰% نسبت به پروتئین کل توسط نرم‌افزار Alpha Ease FC صورت گرفت.

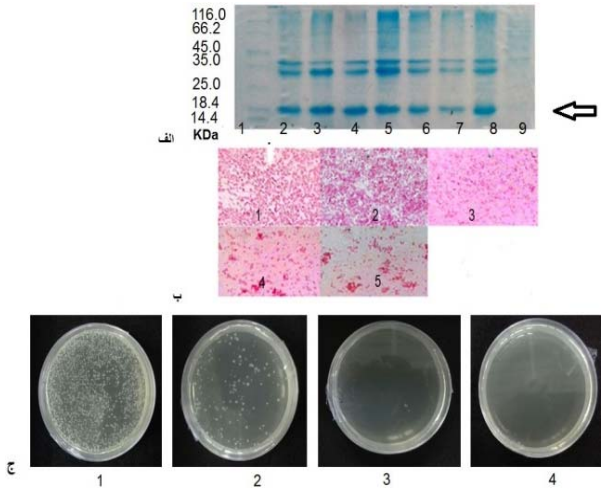
یافته‌ها

باکتری *اشریشیا کلی* BL21(DE3) حاوی ژن پروتئین امتزاجی نوترکیب دارویی تری‌پاراتید بود که توسط ماده القاکننده ایزوپروپیل‌تیوگالاکتوزید بیان شد.

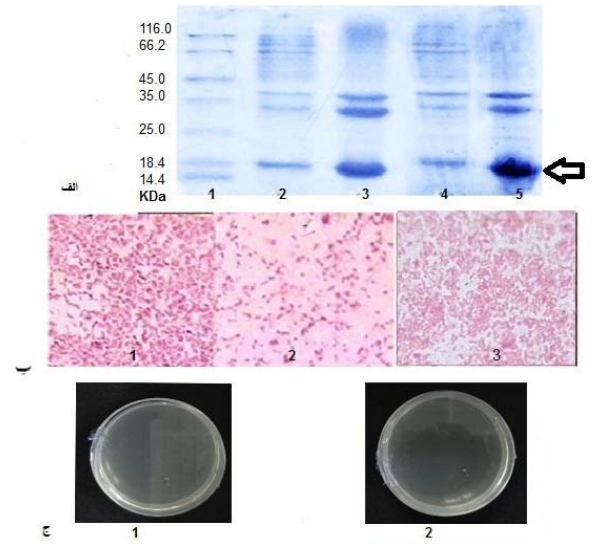
در روش سونیکاسیون در دورهای ۲۰ و ۲۵، بخش قابل توجهی از پروتئین امتزاجی مورد نظر وارد بخش محلول شد، اما همچنان در حدود نیمی از پروتئین‌های امتزاجی تری‌پاراتید در بخش رسوب بودند. در بررسی لام و محیط کشت، تخریب سلولی در دورهای ۲۰ و ۲۵ به‌طور کامل انجام شد (شکل ۱). پروتئین امتزاجی مورد نظر به شکل اجسام توده‌ای غیرکلاسیک بود.

در روش له‌کردن در نیتروژن مایع پروتئین‌ها بیشتر وارد بخش رسوب شدند. به‌علاوه، تفاوت چندانی بین شکست سلول‌ها در دو حجم متفاوت مشاهده نشد و در هر دو حالت تخریب سلولی به‌طور کامل صورت گرفت (شکل ۲).

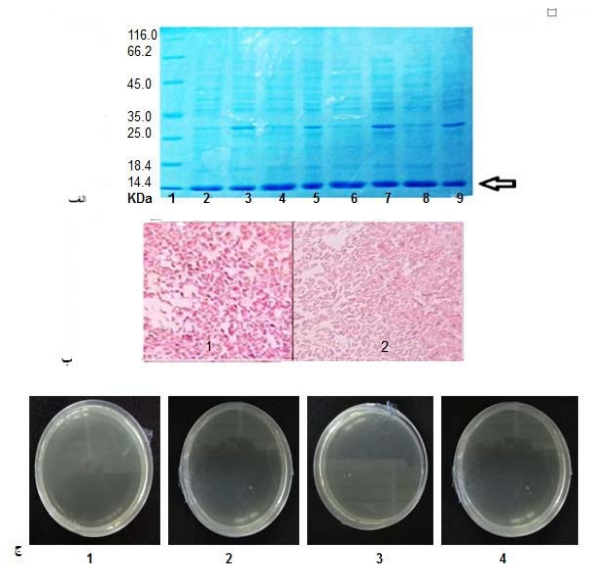
تمام نمونه‌های باکتریایی که در زمان‌های مختلف با بافر تخریب شیمیایی تیمار شده بودند، روی محیط کشت لوریا برتانی جامد رشد نکردند؛ اما در مشاهده لام مربوط به این روش تخریب، سلول‌ها شکل ظاهری خود را حفظ کردند. بنابراین تخریب سلول‌ها در این روش کامل بود، اما با ایجاد منافذ کوچک در غشای سلولی تنها بخشی از پروتئین‌هایی که محلول بودند به بیرون سلول تراوش کردند (شکل ۳)، علاوه بر این بیشترین میزان پروتئین واردشده در فاز محلول در اثر تیمار شیمیایی به‌مدت ٤٥ و ٦٠دقیقه و به میزان ۲۳/۵% بود (جدول ۱).



شکل ۱) شکستن سلول‌ها با روش سونیکاسیون؛ الف) ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط به: ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئینی Thermo scientific 26610، ۲) رسوب حاصل پس از ۲۵دور سونیکاسیون، ۳) محلول رویی پس از ۲۵دور سونیکاسیون، ۴) رسوب حاصل پس از ۲۰دور سونیکاسیون، ۵) محلول رویی پس از ۲۰دور سونیکاسیون، ۶) رسوب حاصل پس از ۱۵دور سونیکاسیون، ۷) محلول رویی پس از ۱۵دور سونیکاسیون، ۸) رسوب حاصل پس از ۱۰دور سونیکاسیون، ۹) محلول رویی پس از ۱۰دور سونیکاسیون؛ ب) لام تهیه‌شده مربوط به: ۱) باکتری شکسته‌نشده، ۲) نمونه شکسته‌شده با ۱۰دور سونیکاسیون، ۳) نمونه شکسته‌شده با ۱۵دور سونیکاسیون، ۴) نمونه شکسته‌شده با ۲۰دور سونیکاسیون، ۵) نمونه شکسته‌شده با ۲۵دور سونیکاسیون؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: ۱) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده با ۱۰دور سونیکاسیون، ۲) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده با ۱۵دور سونیکاسیون، ۳) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده با ۲۰دور سونیکاسیون، ۴) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده با ۲۵دور سونیکاسیون



شکل ۲) شکستن سلول‌ها با روش له‌کردن در نیتروژن مایع؛ الف) ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط به: ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، ۲) محلول رویی پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۶میلی‌لیتر)، ۳) رسوب حاصل پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۶میلی‌لیتر)، ۴) محلول رویی پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۰/۶میلی‌لیتر)، ۵) رسوب حاصل پس از شکستن سلول‌ها (با حجم سلول ۰/۶میلی‌لیتر)؛ ب) لام تهیه‌شده مربوط به: ۱) باکتری شکسته‌نشده، ۲) نمونه شکسته‌شده (با حجم نمونه ۶میلی‌لیتر)، ۳) نمونه شکسته‌شده (با حجم نمونه ۰/۶میلی‌لیتر)؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: ۱) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده (با حجم نمونه ۶میلی‌لیتر)، ۲) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده (با حجم نمونه ۰/۶میلی‌لیتر)



شکل ۳) شکستن سلول‌های باکتری به روش تخریب شیمیایی؛ الف) ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط: ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، ۲) محلول تخریب شیمیایی در ۱۵دقیقه، ۳) رسوب تخریب شیمیایی در ۱۵دقیقه، ۴) محلول تخریب شیمیایی در۳۰دقیقه، ۵) رسوب تخریب شیمیایی در ۳۰دقیقه، ۶) محلول تخریب شیمیایی در ۴۵دقیقه، ۷) رسوب تخریب شیمیایی در ۴۵دقیقه، ۸) محلول تخریب شیمیایی در ۶۰دقیقه، ۹) رسوب تخریب شیمیایی در ۶۰دقیقه؛ ب) لام تهیه‌شده مربوط به: ۱) باکتری شکسته‌نشده، ۲) نمونه شکسته‌شده به‌وسیله تخریب شیمیایی بعد از ۶۰دقیقه؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: ۱) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده به روش شیمیایی بعد از ۱۵دقیقه، ۲) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده به روش شیمیایی بعد از ۳۰دقیقه، ۳) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده به روش شیمیایی بعد از ۴۵دقیقه، ۴) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده به روش شیمیایی بعد از ۶۰دقیقه

جدول ۱) درصد حلالیت پروتئین کل

نمونه‌ها	حلالیت پروتئین (%)
نمونه باکتری شکسته‌شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ۱۵دقیقه	۱۱
نمونه باکتری شکسته‌شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ۳۰دقیقه	۲۷/٤
نمونه باکتری شکسته‌شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ٤۵دقیقه	۳۲/۵
نمونه باکتری شکسته‌شده در بافر تخریب شیمیایی به مدت ٦۰دقیقه	۳۲/۵

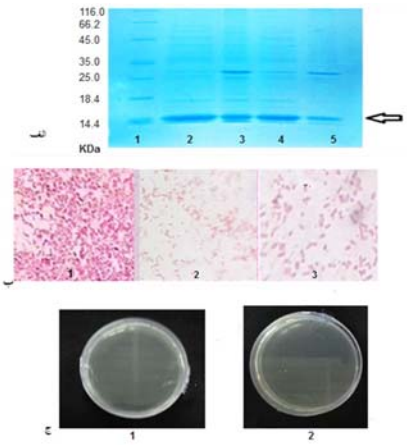
محاسبات براساس نتایج آزمایش میکروبرادفورد حاصل شده است

شکستن سلول‌ها با هموژناسیون تحت فشار ۵۰بار، بیشتر از ۱۵بار بود اما با این حال در این روش تخریب سلولی نیز پروتئین امتزاجی مورد نظر به‌طور قابل توجهی در هر دو بخش محلول و رسوب وجود داشت (شکل ٤).

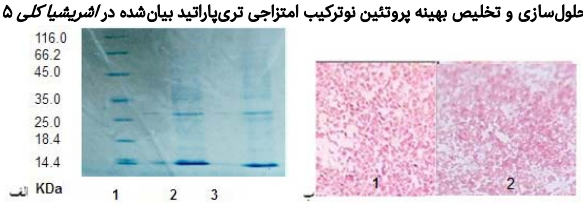
در تخریب سلولی با تخریب شیمیایی به‌همراه سونیکاسیون مقدار بسیار زیادی از پروتئین امتزاجی مورد نظر وارد بخش محلول شد، سلول‌ها شکل میله‌ای خود را از دست دادند و دیواره سلولی کاملاً تخریب و شکسته شد (شکل ۵). در نهایت در شرایطی که ابتدا سونیکاسیون و سپس تخریب شیمیایی صورت گرفت، ۹۷/۷% پروتئین کل سلول وارد بخش محلول شد.

در شرایط غیرواسرشته هیچ پروتئین امتزاجی نوترکیبی با بافر جداسازی از ستون خارج نشد و همه آنها در باندهای مربوط به بافر شست‌وشو و محلول عبوری مشاهده شدند (شکل ٦).

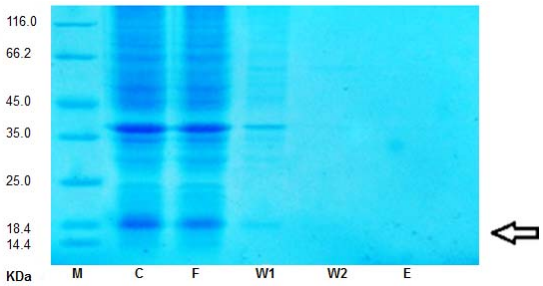
در شرایط واسرشته، اتصال دنباله پلی‌هیستیدینی به رزین به شکل فضایی خاصی نیاز نداشت و به‌دلیل واسرشته‌شدن پروتئین‌ها به‌راحتی با نیکل برهم‌کنش داد. در شرایط واسرشته، مقدار بسیار کمی از پروتئین نوترکیب امتزاجی هنگام شست‌وشو از دست رفت اما مقدار قابل توجهی از آن با استفاده از بافرهای جداکننده با pHهای ۵/۹، ۴/۵ و ۴ تخلیص شد (شکل ۷). طبق روش میکروبرادفورد میزان پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید تخلیص‌شده، ۳۵۰میلی‌گرم به‌ازای هر لیتر محیط کشت بود.



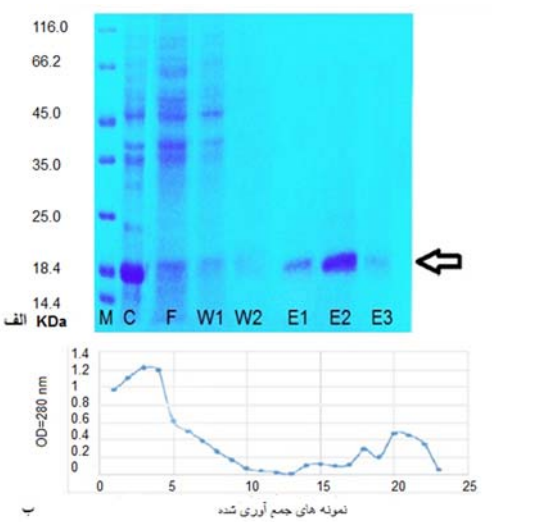
شکل ۴) شکستن سلول‌های باکتری به روش هموژناسیون؛ الف) ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط به: ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، ۲) محلول حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۱۵بار، ۳) رسوب حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۱۵بار، ۴) محلول حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۵۰بار، ۵) رسوب حاصل از تخریب سلولی تحت فشار ۵۰بار؛ ب) لام تهیه‌شده مربوط به: ۱) باکتری شکسته‌نشده، ۲) نمونه شکسته‌شده تحت فشار ۱۵بار، ۳) نمونه شکسته‌شده تحت فشار ۵۰بار؛ ج) کشت گسترده روی محیط کشت جامد مربوط به: ۱) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده تحت فشار ۱۵بار، ۲) کشت گسترده از نمونه شکسته‌شده تحت فشار ۵۰بار



شکل ۵) شکستن سلول‌های باکتری به روش تخریب شیمیایی همراه با ۲۰دور سونیکاسیون؛ الف) ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط به: ۱) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، ۲) رسوب حاصل از تخریب شیمیایی و سپس سونیکاسیون، ۳) محلول حاصل از تخریب شیمیایی و سپس سونیکاسیون، ۴) رسوب حاصل از سونیکاسیون و سپس تخریب شیمیایی، ۵) محلول حاصل از سونیکاسیون و سپس تخریب شیمیایی؛ ب) لام تهیه‌شده مربوط به: ۱) باکتری شکسته‌نشده، ۲) نمونه شکسته‌شده



شکل ۶) ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط به تخلیص پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید توسط کروماتوگرافی تمایلی در شرایط غیرواسرشته؛ M) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، C) نمونه عبور داده‌نشده از ستون، F) محلول عبوری، W1) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر شست‌وشو در مرحله اول، W2) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر شست‌وشو در مرحله دوم، E) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر جداکننده



شکل ۷) الف) تخلیص پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید توسط کروماتوگرافی تمایلی در شرایط واسرشته ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات- پلی‌آکریل‌آمید مربوط به: M) نشانگر وزن مولکولی پروتئین Thermo scientific 26610، C) نمونه عبور داده‌نشده از ستون، F) محلول عبوری، W1) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر شست‌وشو در مرحله اول، W2) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر شست‌وشو در مرحله دوم، E1) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر جداکننده ۱، E2) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر جداکننده ۲، E3) نمونه حاصل از شست‌وشوی ستون با بافر جداکننده ۳؛ ب) نمودار مربوط به تخلیص پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید توسط کروماتوگرافی تمایلی در شرایط واسرشته؛ ۱ تا ۴) محلول عبوری، ۵ تا ۸) شست‌وشو با بافر شست‌وشو در مرحله اول، ۹ تا ۱۳) شست‌وشو با بافر شست‌وشو در مرحله دوم، ۱۴ تا ۱۷) نمونه جمع‌شده حاصل از عبور بافر جداکننده ۱، ۱۸ تا ۲۴) نمونه جمع‌شده حاصل از عبور بافر جداکننده ۲، ۲۵ تا ۲۷) نمونه جمع‌شده حاصل از عبور بافر جداکننده ۳

بحث

پژوهش حاضر با هدف انتخاب بهترین روش استخراج پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید از میزبان باکتری *اشریشیا کلی* و دستیابی به بهترین شرایط تخلیص آن با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد.

طبق نتایج پژوهش حاضر پروتئین امتزاجی به شکل اجسام توده‌ای غیرکلاسیک بود. بنابراین، برای ازدست‌ندادن پروتئین یا باید پروتئین امتزاجی مورد نظر موجود در بخش رسوب و محلول به‌طور جداگانه تخلیص می‌شد که این کار از نظر اقتصادی به‌ویژه در مرحله انبوه‌سازی به‌صرفه نبود یا روشی برای استخراج انتخاب می‌شد که در آن بیشترین میزان پروتئین امتزاجی در بخش محلول قرار بگیرد.

وقتی پروتئین نوترکیب در سیتوپلاسم باکتری بیان می‌شود، برای استخراج آن از روش‌های مختلفی می‌توان بهره برد. بسته به مقیاس عمل، نوع اجسام توده‌ای تشکیل‌شده و میزان محلول‌بودن یا تاخوردگی صحیح پروتئین‌های بیان‌شده، می‌توان این روش‌ها را اولویت‌بندی کرد[3]. علاوه بر احتساب موضوعات نظری، انتخاب بهترین روش بدون آزمایش‌کردن روش‌های مختلف عملاً امکان‌پذیر نیست، زیرا پروتئین‌های مختلف بسته به ماهیت، رفتارهای متفاوتی را در این روش‌ها نشان می‌دهند. در پژوهش حاضر برای استخراج پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید که در باکتری *اشریشیا کلی* به‌صورت اجسام توده‌ای غیرکلاسیک بیان شده بود[9]، روش‌های مختلفی مورد آزمایش قرار گرفت.

طبق نتایج پژوهش حاضر با توجه به این که بیش از نصف پروتئین مورد نظر پس از سونیکاسیون وارد بخش محلول شد و بقیه آن که غلظت قابل توجهی هم داشت در بخش رسوب باقی ماند، انجام دو روش مجزا برای بازیافت و خالص‌سازی پروتئین‌های محلول و نامحلول مقرون به صرفه نبود. بنابراین روش‌های مختلف به‌صورت جداگانه یا ترکیبی برای واردکردن بیشترین مقدار پروتئین بیان‌شده در بخش محلول مورد استفاده قرار گرفت.

وقتی از روش له‌کردن در نیتروژن مایع استفاده شد، بخش کمتری از پروتئین‌ها نسبت به روش سونیکاسیون وارد بخش محلول شدند که این هدف مورد نظر پژوهش را تامین نمی‌کرد. بنابراین روش‌های دیگر مورد آزمایش قرار گرفت. یکی از این روش‌ها هموژناسیون بود که تحت دو فشار مختلف روی باکتری آزمایش شد ولی نتایج همچنان مانند نتایج قبل بود.

با توجه به این که روش شیمیایی تنها می‌توانست پروتئین‌های محلول را از باکتری استخراج کند[3]، استفاده از آن به‌تنهایی قاعدتاً منجر به استخراج ۱۰۰% پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید که به‌صورت اجسام توده‌ای بیان شده بود، نمی‌شد و فقط بخشی از آنها که دارای ساختار درهم‌تنیده شل‌تری بودند می‌توانستند از باکتری خارج شوند. بنابراین این روش با سونیکاسیون ترکیب شد تا بقایای به‌جامانده از اجسام توده‌ای که قادر به خروج از منافذ ریز ایجادشده با بافر شیمیایی نبودند، بتوانند از باکتری خارج شوند. با توجه به این موضوع، تیمار با بافر شیمیایی همراه با سونیکاسیون انجام شد. پس از سانتریفیوژ و جداسازی بخش محلول از رسوب، تقریباً ۱۰۰% پروتئین‌های مورد نظر (۹۷/۷%) وارد فاز محلول شده بودند که نتیجه بسیار مطلوب و قابل توجهی بود.

از مقایسه نتایج آزمایشات انجام‌شده و با توجه به طراحی صورت‌گرفته در مورد ژن پروتئین امتزاجی تری‌پاراتید که دارای ساختار سخت و بار منفی زیاد بود[9]، می‌توان گفت علی‌رغم بیان بالای باکتری که موجب ادغام و توده‌ای‌شدن مولکول‌های پروتئین می‌شود[10]، اگر گروه‌های عاملی واکنش‌دهنده در سطح ساختار نباشند یا نیروی دافعه بین مولکول‌های بیان‌شده وجود داشته باشد، می‌توان به اجسام توده‌ای دست یافت که با ترکیب روش شیمیایی و سونیکاسیون بتوانند کاملاً به حالت محلول درآیند. این یافته‌ها زمانی که روش شیمیایی به ساختار و عملکرد پروتئین صدمه‌ای نزند یا هنگامی که این موارد در زمان استخراج و تخلیص اهمیت نداشته باشند (مانند پروتئین امتزاجی مورد نظر پژوهش حاضر) می‌توانند بسیار ارزشمند باشند[11]، زیرا در عین اینکه پروتئین‌ها در ساختار اجسام توده‌ای قرار گرفته‌اند و از دسترس آنزیم‌های پروتئاز میزبان خارج می‌شوند، به‌راحتی قابل جداسازی بوده[9] و در نهایت به‌علت شل‌بودن ساختار به‌آسانی محلول‌سازی می‌شوند و سایر فرآیندهای پایین‌دستی با سهولت بیشتری انجام خواهد شد. این مساله در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیله باکتری اهمیتی چندین برابر دارد و سبب کاهش پیچیدگی‌های فرآیندهای پایین‌دستی و مقرون‌به‌صرفه‌بودن آنها خواهد شد.

اما در تخلیص پروتئین، زمانی که پروتئین نوترکیب دنباله هیستیدینی دارد، می‌توان پروتئین نوترکیب را با استفاده از روش کروماتوگرافی تمایلی فلزی با خلوص بالایی از سایر پروتئین‌ها جدا کرد[8]. بسته به هدف تحقیق، محلول‌بودن یا نبودن پروتئین نوترکیب یا این که دنباله هیستیدینی پس از شکل‌گیری فضایی پروتئین در کدام بخش از ساختار آن قرار بگیرد، تخلیص در یکی از شرایط غیرواسرشته یا واسرشته انجام خواهد شد. در مرحله اول موقعیت دنباله هیستیدینی تعیین‌کننده شرایط آزمایش است. اگر دنباله هیستیدینی در ساختار پروتئین به‌گونه‌ای قرار گیرد که در معرض یون‌های نیکل تثبیت‌شده روی رزین کروماتوگرافی باشد، شرایط واسرشته‌نشده بر شرایط واسرشته ارجحیت خواهد داشت. طبق نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد با حذف عامل واسرشته‌کننده در طول تخلیص، پروتئین شکل فضایی خاصی یافت و احتمالاً دنباله هیستیدینی در داخل آن پنهان شد و نتوانست با یون‌های نیکل اتصال برقرار کند، پس طی شست‌وشو از ستون خارج شد.

در پروتئین‌های نوترکیب نامحلول نیز اگر جای‌گیری دنباله هیستیدینی به‌صورتی باشد که بتواند در معرض یون‌های فلزی قرار گیرد، عمل تخلیص و تاخوردگی مجدد می‌تواند به‌صورت همزمان انجام شود. اما اگر این دنباله‌ها در ساختار درونی پروتئین پنهان شوند و نتوانند اتصال مناسبی با یون‌های فلزی تثبیت‌شده برقرار کنند، برای تخلیص به واسرشته‌شدن پروتئین و کروماتوگرافی تمایلی در شرایط واسرشته نیاز است[12].

در پژوهش حاضر تخلیص پروتئین نوترکیب امتزاجی تری‌پاراتید در دو شرایط غیرواسرشته و واسرشته با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام شد که در شرایط غیرواسرشته، تخلیص پروتئین‌های امتزاجی ناموفق بود، اما در شرایط واسرشته، پروتئین مورد نظر به شکل کاملاً مطلوب تخلیص شد. این مشاهدات گواه آن است که احتمالاً با حذف عامل واسرشته‌کننده، پروتئین امتزاجی نوترکیب تری‌پاراتید ساختار فضایی پیدا می‌کند که در آن دنباله هیستیدینی در بخش درونی ساختار قرار گرفته و نمی‌تواند به یون‌های فلزی متصل شود.

اگر چه در پژوهش حاضر فعالیت پروتئین امتزاجی اهمیت نداشت، اما باید توجه داشت که تخلیص پروتئین‌ها در شرایط غیرواسرشته به‌ویژه در مواردی که فعالیت زیستی محصول کروماتوگرافی تمایلی اهمیت دارد، بازده فعالیت بالا می‌رود، زیرا

تاخوردگی مجدد فرآیندی پیچیده است و همیشه موجب برگشت ساختار صحیح به‌طور کامل نخواهد شد[10]. بنابراین، در این موارد بهتر است با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در صورت امکان ژن پروتئین نوترکیب را به‌شکلی طراحی کرد که این دنباله‌ها در بخش بیرونی ساختار قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

در تخریب شیمیایی همراه با سونیکاسیون، ۹۷/۷% پروتئین کل در بخش محلول وارد می‌شود و تخلیص در شرایط واسرشته برخلاف شرایط غیرواسرشته به‌طور مناسب و مطلوب صورت می‌گیرد.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.
منابع مالی: موردی از سوی نویسنده گزارش نشد.

منابع

1- Harrison ST. Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. Biotechnol Adv. 1991;9(2):217-40.
2- Sattayasai N. Protein purification. In: Ekinci D, editor. Chemical biology. London: IntechOpen; 2012. p. 444.
3- Peternel Š. Bacterial cell disruption: A crucial step in protein production. N Biotechnol. 2013;30(2):250-4.
4- Peternel Š, Bele M, Gaberc-Porekar V, Menart V. Nonclassical inclusion bodies in Escherichia coli. Microb Cell Factories. 2006;5(Suppl 1):P23.
5- Magdeldin S, Moser A. Affinity chromatography: Principles and applications. In: Magdeldin S, editor. Affinity chromatography. London: IntechOpen; 2012. p. 368.
6- Yip TT, William Hutchens T. Metal ion affinity adsorption of a Zn (II)-transport protein present in maternal plasma during lactation: Structural characterization and identification as histidine-rich glycoprotein. Protein Expr Purif. 1991;2(5-6):355-62.
7- Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials, serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. Biochemistry. 1983;22(7):1621-30.
8- Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. Methods Enzymol. 2000;326:245-54.
9- Bakhtiari N, Amini Bayat Z, Sagharidouz S, Vaez M. Overexpression of recombinant human teriparatide, rhP TH (1-34) in Escherichia coli: An innovative gene fusion approach. Avicenna J Med Biotechnol. 2017;9(1):19-22.
10- Amini Bayat Z, Shame Riz Sh. Soluble protein production methods. 1st Volume. Tehran: Iideh Negar; 2015. [Persian]
11- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Protein Expr Purif. 2003;28(1):1-8.
12- Loughran ST, Bree RT, Walls D. Purification of polyhistidine-tagged proteins. In: Walls D, Loughran S, editors. Protein chromatography, methods in molecular biology. 1485th Volume. New York: Humana Press; 2017. pp. 275-303.