مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی ـ پژوهشی)
جلد ۷، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۵

کلون و بیان ژن نوترکیب هومون رشد با استفاده از برچسب تیوردوکسین

حمیده روحانی نژاد .Ph.D *، ساناز یاری .M.Sc ، علی اصغر دلدار .Ph.D، امیر اشکان حمیدی .M.Sc

- پژوهشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: rohaninejhad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۵

چکیده

هدف: در قرن حاضر، تولید داروهای نوترکیب افزایش یافته است. از جمله این داروها، هورمون رشد می‌باشد که به‌علت مشکلاتی که در پروسه‌ی بیان نوع سیتوپلاسمی و پری پلاسمی این پروتئین وجود دارد، یافتن راه حلی که بتواند بیان را بهینه نماید ضروری به‌نظر می‌رسد. لذا در این تحقیق با استفاده نمودن از trx-tag بیان هورمون رشد را به‌صورت محلول بهینه شد که علاوه بر افزایش بیان پرتئین (حل مشکل پری پلاسمی) از تشکیل انکلوزیون بادی (مشکل سیتوپلاسمی) جلوگیری می‌نماید.

مواد و روش‌ها: سنتز ژن و کاست ژنی به‌منظور بیان هورمون رشد در سیستم بیانی pET 32a صورت گرفت. کاست ژنی شامل trx-tag برای محلول سازی پروتئین، His tag به‌منظور خالص سازی و انتروکیناز در ابتدای ژن rHgh به‌منظور جداسازی برچسب های قبلی از این پروتئین می‌باشد.

نتایج: بعد از کلون سازی این ژن در وکتور و بیان آن، تایید آن توسط وسترن بلات صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم افزارهای آنالیز ژل درصد بیانی حدود از کل بیان را در سویه نوترکیب نشان می‌دهد.

نتیجه گیری: در این تحقیق، نشان داده شد که با استفاده از Trx-tag می‌توان پروتئین را به‌حالت محلول در آورد و میزان بیان را بالا برد در ادامه با انجام مراحل تخمیر و پایین دستی می‌توان به نتایج بهتری دست یافت.

واژگان کلیدی: هورمون رشد، پروتئین محلول، برچسب تیوردوکسین

مقدمه

رشد یعنی افزایش اندازه بافت یا ارگانیسم که ناشی از افزایش در اندازه سلول، در تعداد سلول، ماتریکس خارج سلولی در اطراف سلول‌ها است. هورمون مهمی که رشد عمومی را در بدن تنظیم می‌کند، هورمون رشد می‌باشد. هورمون رشد انسانی یا سوماتوتروپین یک زنجیره پلی پپتید متشکل از ۱۹۱ آمینواسید با وزن مولکولی ۲۲ کیلودالتون می‌باشد که توسط بخش پیشین غده درون ریز هیپوفیز ساخته و ترشح می‌شود. این هورمون علاوه بر رشد سلولی دارای نقش مهمی در انواع روندهای متابولیک فیزیولوژیک و آناتومیک می‌باشد (۱و۲).

فراوان ترین نوع سلول‌ها در غده هیپوفیز سلول‌های اسیدوفیل سازنده هورمون رشد هستند که سوماتروتروف نامیده می‌شوند. غلظت پلاسمای هورمون رشد در حدود ۳ تا ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر است. ترشح هورمون از این سلول‌ها به‌صورت پالسی می‌باشد که تحت تأثیر عوامل گوناگونی قرار دارد. در فواصل بین دو تناوب مقدار این هورمون ناچیز بوده و بیشترین غلظت سرمی آن در فاز عمیق خواب مشاهده می‌شود. ترشح هورمون رشد توسط یک مکانیسم تنظیم‌کننده دوگانه هیپوتالاموس کنترل‌می‌شود.بدین‌صورت‌که فاکتور آزادکننده‌آن سبب‌تحریک و فاکتور مهار کننده موجب توقف‌ترشح آن می‌شود (۳).

در سال‌های اخیر، تولید پروتئین‌های انسانی با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب در میزبان‌های باکتریایی، قارچی، مخمری و حتی جانوری افق تازه ای برای تولید محصولات دارویی به‌منظور بهبود زندگی بشر پیش روی محققان قرار داده است (۴ و ۵). در دنیای امروز تقاضا برای داروهای زیستی روز به‌روز در حال افزایش است، درحالی‌که هزینه‌های بالای تولید و مسیرهای بیوسنتزی داروهای نوترکیب امکان دسترسی به این نسل از داروها را کاهش داده است(۶). از آنجایی‌که یک ژن می‌تواند در سیستم‌های گوناگونی بیان شود، تعیین سیستمی با بیشترین بازده تولید پروتئین‌های نوترکیب امری ضروری می‌باشد که می‌تواند در کاهش هزینه‌های تولید دارو نقش به‌سزائی داشته باشد (۷). تعیین بهترین سیستم بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب یکی از مباحث مهم در بیوتکنولوژی است. یک سیستم بیان کننده پروتئین‌های نوترکیب باید بتواند مواد زیستی را با بیشترین فعالیت زیستی، ایمنی و کمترین هزینه تولید کند (۷ و ۸).

از آنجایی‌که قیمت داروهای زیستی به‌دست آمده از سیستم‌های کشت سلول‌های حیوانی یا گیاهی فراوانی آن‌ها را محدود می‌کند. بنابراین توسعه سیستمی که بتواند این داروها را با قیمت و فراوانی مناسب در اختیار مصرف کنندگان قرار دهد امری ضروری می‌باشد (۹). تولید مقادیر بالایی از پروتئین نوترکیب با هزینه کشت کمتر در سیستم‌های کشت باکتریایی در فرمانتور قابل انجام است(۱۰).

هورمون رشد یکی از این پروتئین‌های انسانی است که می‌توان با استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک آن را تولید کرد. ژن هورمون رشد هیپوفیزی، ۶۵۱ نوکلئوتید طول دارد که ۷۸ نوکلئوتید اول آن مربوط به پپتید نشانه است که بعد از ترجمه جدا می شود (۱۱). برای تولید شکل نوترکیب این پروتئین در سال‌های گذشته مطالعات بسیاری انجام شده است که سیستم‌های بیانی پروکاریوتی و یوکاریوتی متفاوتی برای تولید این هورمون مورد استفاده قرار گرفته اند.

در مطالعه‌ی انجام شده ،بیان هورمون رشد در باکتری اشرشیا کلی مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از چالش‌های استفاده از سیستم‌های پروکاریوتی، تولید پروتئین نوترکیب به شکل انکلوزیون بادی در داخل باکتری است که در این‌حالت به‌علت نبود فولدینگ صحیح، پروتئین فعالیت بیولوژیکی مناسبی نداشته و باید مراحل فولدینگ بر روی پروتئین تولیدی انجام شود که این پروسه علاوه بر افزایش زمان و هزینه، باعث کاهش بازده هم می‌شود. زیرا مقداری از پروتئین تولید شده در طی مراحل بعدی از دست می‌رود. در این مقاله برای حل مشکل از تیوردوکسین استفاده شده است که به‌عنوان یک برچسب بسیار مفید در جلوگیری از شکل گیری انکلوزیون بادی در تولید پروتئین نوترکیب است.

تیوردوکسین پروتئین مقاوم به حرارت ، ۱۲کیلو دالتونی است که به‌راحتی بیان و محلول می‌شود حتی زمانی که تا ۴۰ درصد از مجموع پروتئین سلولی بیان می‌شود. این پروتئین در باکتری‌ها، گیاهان و اندام‌های حیوانی موجود است (۱۲). گزارش شده تیوردوکسین در همه بخش‌های سلول باکتری، یعنی سیتوپلاسم، منطقه کروموزومی و پری پلاسم وجود دارد. تحقیقات نشان می‌دهد که برچسب TRX هنگامی‌که در N-ترمینال پروتئین هدف قرار داده می‌شود مؤثرتر است. تیوردوکسین در سایت‌های چسبندگی غشای سیتوپلاسمی تجمع می‌یابد تا اجازه دهد

پروتئین‌های فیوژن با TRX توسط شوک اسمزی و یا تیمار سرد / گرم شدن به‌راحتی منتشر شوند که منجر به انجام مرحله اولیه تخلیص می‌شود (۱۲-۱۴).

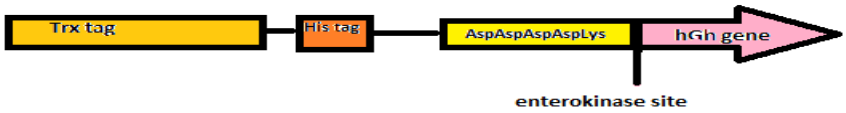
تیوردوکسین به‌عنوان فیوژن پروتئین در جلوگیری از تشکیل انکلوزیون بادی، به‌ویژه برای تولیدات کم مانند ترشح سایتوکاین فعال پستانداران در سیتوپلاسم باکتری اشرشیاکلی مفید می‌باشد. تیوردوکسین اشرشیاکلی پروتئین فشرده، بسیار محلول و پایدار حرارتی با ویژگی‌های فولدینگ قوی می‌باشد. این خواص اجازه می‌دهد مولکول، هنگامی‌که به پروتئین مورد نظر متصل می شود، به‌عنوان مولکول چاپرون با اتصال کووالانت عمل کند (۱۳).

مواد و روش‌ها

سنتز ژن و ساختار پلاسمی: توالی ژن موردنظر از پایگاه داده‌ی DRUGBANK کسب شد (۱۵) و با استفاده از پایگاه داده ی Genescript توالی به‌دست آمده (شکل ۱) با توجه به میزبان‌های مورد استفاده از نظر کدون‌های بیان بهینه سازی و به شرکت پویا ژن آزما برای سنتز سفارش داده شد. پلاسمید pET32a جهت همسانه سازی و بیان مورد استفاده قرار گرفت. وکتور بیانی طراحی شده (شکل ۲) دارای Trx tag در بالادست محل ورود ژن hGH+ انتروکیناز است که بعد از بیان باعث افزایش محلول شدن توده پروتئین هدف شده که در ادامه کار، مرحله فولدینگ و اوره زدائی را تسهیل می‌کند. به‌علاوه در کنار برچسب یاد شده این پلاسمید حاوی His_6 tag نیز می‌باشد که در مرحله تخلیص با استفاده از ستون نیکل مورد استفاده قرار خواهد گرفت. در کاست بیانی طراحی شده بین تگ‌های یادشده و ابتدای‌ژن hGH توالی‌جایگاه‌برش‌اختصاصی آنزیم‌انتروکیناز(Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) قرار داده شد.

DDDDKFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLC
FSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDL
LKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDM
DKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

شکل ۱: توالی پروتئین هورمون رشد همراه با انتروکیناز



شکل۲: تصویر شماتیک از وکتور نوترکیب طراحی شده

تکثیر ژن rhGH به‌منظور تکثیر ژن hGH و قرار دادن جایگاه برش مربوط به آنزیم‌های Xho1 و BamH1، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای پیشرو: AAGCGGATCCTGATGACGATGACAAG و پسرو: AGGTCTCGAGATTAAAAGCCACAACTCC و مطابق جدول ۱ انجام شد.

جدول ۱: شرایط دمایی به‌منظور تکثیر ژن rhGH.

Program		temperature	time
Initial denaturing		94°C	5'
8 cycle	A Denaturing	94°C	30"
	A Annealing	50°C	30"
	A Extension	72°C	30"
17 cycle	Denaturing	94°C	30"
	Annealing	55°C	30"
	Extension	72°C	30"
Final extension		72°C	5'

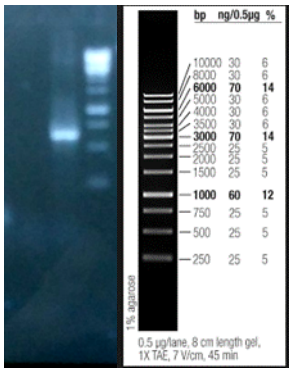
ترانسفورماسیون و تایید آن با استفاده از کلنی PCR: بعد از تکثیر قطعه ژنی و پلاسمید، هضم آنزیمی پلاسمید pET32a با استفاده از دو آنزیم Xho1 و BglIIو هضم آنزیمی ژن rhGH با استفاده از Xho1 و BamH1 صورت گرفت. قطعات مربوطه ژن و پلاسمید از روی ژل آگارز جدا شده و قطعات با استفاده از آنزیم T4 به‌هم الحاق شدند. محصول الحاق به‌داخل باکتری مستعد شده‌ی اشرشیاکلی سویه‌ی رزتاگامی ترانسفورم شد. کلنی‌های تشکیل شده حاوی پلاسمید نوترکیبی که ژن hGH در آن وارد شده می‌باشند. برای تائید ترانسفورماسیون از کلنی‌های تشکیل شده به‌شکل تصادفی با استفاده از پرایمرهای قسمت قبل کلنی PCR انجام شد که نتایج به‌دست آمده صحت وجود وکتور نوترکیب را در کلنی‌های حاصله تایید کردند.

بیان پروتئین توسط SDS PAGE و تایید آن با روش وسترن بلات: برای بررسی اولیه بیان پروتئین نوترکیب، باکتری ترانسفورم شده‌ی رزتاگامی در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت Lb Broth در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و بعد از ۱۶ ساعت ۲۵۰ میکرولیتر از آن عنوان مایه تلقیح به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت (۰/۱ گرم تریپتون، ۰/۰۵گرم عصاره مخمر و ۰/۱ گرم سدیم کلرید) اضافه شد. در OD=۰/ ۶ بعد از نمونه‌گیری، بیان با غلظت ۱ میلی مولار از IPTG القا و بعد از ۴ ساعت در OD=۱/۸ نمونه گیری از باکتری القا شده انجام شد. با توجه به اندازه پروتئین فیوژ شده (۴۰ کیلو دالتون) ژل پلی اکریل آمید ۱۴/۵ درصد برای بارگذاری نمونه ها مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های پروتئین بعد از بارگذاری بر روی ژل با اختلاف پتانسیل ۸۵ به‌مدت ۳ ساعت الکتروفورز شدند. به‌منظور تایید پروتئین بیانی با استفاده از روش وسترن بلات، نمونه‌ها بر روی ژل دیگری بارگذاری شده و پروتئین‌های مربوطه به‌مدت ۱۶ ساعت با جریان ۲۲۰ میلی آمپر بر روی PVDF انتقال یافت. کاغذ را به‌مدت یک ساعت در محلول BSA، ۳ درصد بلاک شد. بعد از سه بار شستشو با استفاده از TBS-T، کاغذ به‌مدت یک ساعت در آنتی‌بادی اول-Anti His(Roche) با نسبت ۱:۶۰۰۰ در دمای اتاق گرماگذاری گردید. سپس بعد از سه مرحله شستشوی مجدد کاغذ در آنتی بادی دوم- anti Rabbit (Roche) با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ گرماگذاری شد. بعد از شستشوی مجدد ۱۰ میلی لیترDAB (Fluka) با غلظت mg/ml ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به کاغذ اضافه و بعد از ۵ دقیقه باند نهایی مشاهده شد.

نتایج

تکثیر ژنrhGH با استفاده از PCR

طبق شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، برای تکثیر ژن hGH ، PCR انجام شد و نتایج آن با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد که نتیجه حاصله در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

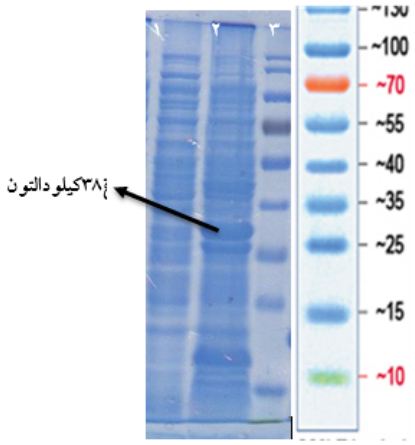


شکل۳: ستون ۱ باند ۶۷۰ جفت باز تکثیر شده مربوط به ژن hGH، ستون ۲ مارکر یک کیلو باز

بررسی نتیجه بیان

نمونه‌های بیان ژن rhGH با استفاده از ژل SDSPAGE مورد بررسی قرار گرفت. وجود باند ۴۰ کیلو دالتونی در زمان ۴ ساعت پس از القا و عدم وجود باند در نمونه قبل از بیان در زمان صفر قبل از القا نشان از بیان پروتئین

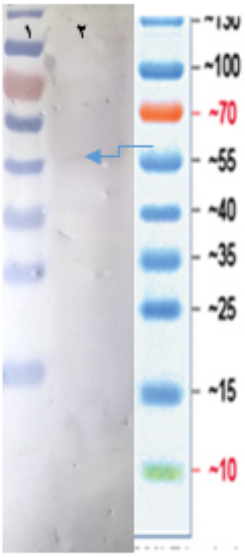
نوترکیب دارد. شکل ۴ نشان دهنده باند مربوط به هورمون رشد است.



شکل۴: بیان هورمون رشد نوترکیب در باکتری اشرشیاکلی رزتاگامی حامل وکتور pET32arhGH. ستون۱، باکتری قبل از القا. ستون ۲، باکتری ۴ ساعت بعد از القا. ستون ۳ مارکر پروتئینی می‌باشد.

نتیجه لکه گذاری وسترن

برای بررسی صحت نتایج ژل پلی اکریل آمید وسترن بلات همان نمونه‌ها بر روی غشا نیتروسلولزی انجام شد که طی نتیجه به‌دست آمده باند مشاهده شده در سایز مورد نظر صحت بیان پروتئین نوترکیب هورمون رشد انسانی را در سویه بیانی نشان می دهد. نتیجه نهایی وسترن بلات در شکل ۵ آمده است.



شکل ۵: نتیجه نهائی وسترن بلات. ستون ۱، پروتئین مارکر، ستون ۲، باند تایید بیان پروتئین

بحث

در حال حاضر هورمون رشد مورد نیاز کشور از طریق واردات تامین می‌شود. بنابر گزارش وزارت بهداشت در سال ۸۲ بیش از سه میلیون دلار صرف واردات هورمون رشد شده است که این مقدار نیز جوابگوی نیاز داخل نبود. همچنین در سال ۹۲ مبلغ ۸۰ میلیارد تومان صرف واردات هورمون رشد شده است. مطابق لیست نیازمندی‌های وزارت بهداشت در سال۱۳۹۴، داروی هورمون رشد یا سوماتوتروپین، در اولویت تولید داخل کشور قرار گرفته است.

از آنجاکه تولید این هورمون در بدن با افزایش سن به‌طور شدید کاهش می‌یابد. لذا امروزه تولیدآن از اهمیت زیادی برخوردار است و فرد می‌تواند اثراتی مانند افزایش حجم ماهیچه‌های بدن بدون ورزش، کاهش توده چربی بدون رژیم غذایی، افزایش استحکام استخوان‌ها، رفع چین و چروک پوست، بهبود عملکرد قلب، کلیه و کبد، افزایش

قدرت جنسی و بهبود وضعیت کلسترول و فشار خون را با مصرف بهینه هورمون رشد تجربه کند.

این هورمون توسط شرکت‌های داروسازی مختلف تولید می‌شود. بیشتر به‌صورت انکلوزیون بادی می‌باشد و در حالت تخلیص ایجاد مشکل می‌نماید و یا تولید به‌صورت پری پلاسمی می‌باشد که میزان بیان آن در هر میلی‌لیتر محیط کشت بسیارکم می‌باشد.

در سال ۱۹۸۱ یک شرکت آمریکائی به‌نام Genetech آزمایش‌های وسیعی را برای تولید هورمون رشد سنتتیک با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب شروع کرد (۱۶).

اولین کار مهمی که در زمینه ساخت هورمون رشد نوترکیب صورت گرفت توسط ژئودل و همکاران (۱۷) انجام شد که از یک ساختار ترکیبی متشکل از cDNA به‌دست آمده از mRNA هیپوفیز پیشین و قطعه‌ای DNA که به‌طور شیمیایی ساخته شده بود استفاده کردند.

از آنجاکه بسیاری از پروتئین‌های باکتریایی فاقد متیونین اولیه هستند، دانشمندان تصور می‌کردند که این اسیدآمینه اضافی نیز ممکن است با مکانیسمی مشابه حذف شود، ولی این اتفاق نیفتاد. هر چند که فعالیت بیولوژیکی این پروتئین در شرایط درون شیشه‌ای به اثبات رسیده است، ولی مطالعات بعدی نشان می‌دهد که حضور این متیونین می‌تواند سبب تشکیل آنتی بادی بر علیه هورمون رشد متیونین دار در بیمارانی شود که با این پروتئین تیمار شده اند (۱۸ و ۱۹). این موضوع توجه گروه تحقیقاتی را به‌سمت روش‌هایی همچون استفاده از هدفمند سازی پروتئین به‌سمت یک بخش خاص با به‌کارگیری توالی‌های نشانه جلب کرد که بتواند هورمون رشد را صحیح و بی نقص تولید کند.

اولین فرم نوترکیب هورمون رشد، پروتروپن از شرکت Genetech بود که برای اولین بار در سال ۱۹۸۵ وارد بازار شد. با افزایش تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب این هورمون در بیماران با نقص و کمبود هورمون رشد مورد استفاده قرار گرفت. امروزه از میان سیستم‌های بیان کننده پروتوئین نوترکیب، سیستم بیانی باکتری اشرشیاکلی مورد توجه می‌باشد (۱۷).

هورمون‌های رشد سنتتیک قابل دسترس و تولید کنندگان آن شامل Nutropin (Genetech), Humatrope (Liily), Gentropin (Pfizer), Tev-tropin (Teva), Saizen (Serono) همه‌ی این موارد به‌صورت پری پلاسمی تهیه می‌شوند و Norditropin (NoVo) به‌حالت سیتوپلاسمی می‌باشد. این فراورده ها از نظر ترکیب، اثر و قیمت یکسان هستند و مهم‌ترین تفاوت آن‌ها در فرمولاسیون و سیستم آزادسازی می‌باشد(۲۰).

تیوردوکسین در جلوگیری از تجمع و رسوب پروتئین‌های نوپای فیوژ شده، نقش دارد. در نتیجه، به آن‌ها فرصت زیادی برای آداپته شدن با فولدینگ‌شان می‌دهد. تیوردوکسین دارای ویژگی‌هایی است که آن را به‌عنوان شریک فیوژن مناسب به‌حساب می آورد. اندازه کوچک، ترجمه زیاد و ساختار سوم آن نشان می‌دهد که هر دو انتهای آمینو و کربوکسیل آن برای اتصال به مولکول‌های دیگر در دسترس هستند (۲۱).

از چالش‌های موجود در بیان پروکاریوتی پروتئین‌های نوترکیب ایجاد اینکلوژن بادی در داخل سلول میزبان است که با افزودن مراحل پائین دستی در فولدینگ و اوره زدائی و سپس تخلیص نهایی علاوه بر افزایش هزینه‌های تولید باعث از دست رفتن مقادیر زیادی از پروتئین طی این مراحل شده که با بیان محلول پروتئین می‌توان تا حدود زیادی از این مشکلات جلوگیری کرد. لذا با استفاده از تیوردوکسین این پروتئین را می‌توان به‌صورت محلول تولید نمود. از تیوردوکسین برای تولید پروتئین‌های دیگر مانند تری پاراتید هم استفاده شده است و بیان قابل توجهی نیز داشته است (۲۲).

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه صنعتی مالک اشتر جهت انجام این پژوهش تشکر نمایند.

منابع

1. Fuh G, Mulkerrin M, Bass S, McFarland N, et al. The human growth hormone receptor. Secretion from Escherichia coli and disulfide bonding pattern of the extracellular binding domain. Journal of Biological Chemistry. 1990; 265(6):31.

2. Møller N, Jørgensen JOL. Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. Endocrine reviews. 2009; 30(2): 152-77.

3. Bidlingmaier M, Freda PU. Measurement of human growth hormone by immunoassays:

current status ,unsolved problems and clinical consequences. Growth Hormone & IGF Research. 2010; 20(1): 19-25.

4. Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. Biotechnology letters. 2007; 29(5): 677-84.

5. Doran PM. Foreign protein production in plant tissue cultures. Current Opinion in Biotechnology. 2000; 11(2): 199-204.

6. Chu L, Robinson DK. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. Current Opinion in Biotechnology. 2001; 12(2): 180-7.

7. Agrawal V, Bal M. Strategies for rapid production of therapeutic proteins in mammalian cells. Bioprocess Int. 2012; 10(4): 32-46.

8. Panda AK. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of Escherichia coli. Biotechnology in India II: Springer; 2003.85: 43-93.

9. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. Journal of biotechnology. 2005; 115(2): 113-28.

10. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Current Opinion in Biotechnology. 2002; 13(2): 117-23.

11. Filikov AV, Hayes RJ, Luo P, Stark DM, et al. Computational stabilization of human growth hormone. Protein science. 2002; 11(6): 1452-61.

12. Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Perera RL, et al. Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression. BMC biotechnology. 2004; 4(1): 1.

13. LaVallie ER, Lu Z, Diblasio-Smith EA, Collins-Racie LA, et al. Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in Escherichia coli. Methods in enzymology. 2000; 326:322.

14. Bayer M, Bayer M, Lunn C, Pigiet V. Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in Escherichia coli. Journal of bacteriology. 1987; 169(6): 2659-66.

15. Chen EY, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldaña HA,et al. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. Genomics. 1989; 4(4):479-97.

16. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, et al. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from Escherichia coli. Protein expression and purification. 2000; 18(2): 182-92.

Ribela MTC, Gout PW, Bartolini P. Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones. Journal .of Chromatography B. 2003; 790(1): 285-316

17. Segura J, Gutiérrez-Gallego R, Ventura R, Pascual JA, et al. Growth hormone in sport: beyond Beijing 2008. Therapeutic drug monitoring. 2009; 31(1): 3-13.

18. Saboury A, Atri M, Sanati M, Moosavi-Movahedi A, et al. Effects of calcium binding on the structure and stability of human growth hormone. International journal of biological macromolecules. 2005; 36(5): 305-9.

19. Kelly PA. Hormones: from molecules to disease: Springer Science & Business Media, Azar 9, 1369 AP - Medical - 697 pages.

20. Schmidt SR. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges: John Wiley & Sons; April 2013. 680 pages

21. Hamedifar H, Salamat F, Saffarion M, Ghiasi M, et al. A novel approach for high level expression of soluble recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34) in Escherichia coli .Avicenna journal of medical biotechnology. 2017; 5(3): 193.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2017; 7(4)

Original Article

Cloning and expression of human growth hormone gene by thioredoxin tag

Rouhani Nejad H, Ph.D*, Yari S, M.Sc, Deldar AA, Ph.D, Hamidi AA, M.Sc.

- Department of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of technology, Tehran, Iran.
* Email corresponding author: rohaninejhad@gmail.com

Received: 8 Oct. 2016 Accepted: 15 Nov. 2016

Abstract

Aim: In this century, the production of recombinant drugs such as growth hormone has increased. Different problems existed in the expressions of cytoplasmic and Periplasmic types of growth hormone. Therefore, finding a way to optimize expression is very necessary. In this study, we optimized expression of growth hormone in the form of solution state by trx-tag method. This method increase protein expression (Periplasmic problem) and also prevents formation of inclusion body (problem cytoplasmic).

Material and methods: Gene synthesis and gene cassette was done in pET 32a expression vector. Gene cassette contains trx tag for protein solubilization, His tag for purification and enterokinase for separate rHgh from previous tags.

Results: After cloning the gene in vector, its expression was confirmed by Western blot technique. The results showed that the expression of fusion protein was done well.

Conclusion: the obtained finding proved that protein can be soluble by Trx-tag and increased its expression levels. Moreover, better results can be achieved in the fermentation and downstream processing.

Keywords: Growth hormone، Protein solubilization، Thioredoxin tag