



Purification of Recombinant Fusion Peptide Containing Hydroxyapatite Affinity Tag Using Ceramic Chromatography Column

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Bahri M.¹ MSc,
Hasannia S.^{*1} PhD,
Dabirmanesh B.¹ PhD,
Zadeh H.H.² PhD

How to cite this article

Bahri M, Hasannia S, Dabirmanesh B, Zadeh H.H. Purification of Recombinant Fusion Peptide Containing Hydroxyapatite Affinity Tag Using Ceramic Chromatography Column. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):655-664.

ABSTRACT

Introduction Nowadays, bone tissue repair with increasing bone disorders and injuries have special importance. Bone tissue engineering provided specific solutions to these problems. The present study was conducted with the aim of purification of recombinant fusion peptide containing hydroxyapatite affinity tag using the ceramic chromatography column.

Material & methods In this study, a fusion peptide was designed which at one side comprised the heparin-binding domain sequence, which can be attached to various types of growth factors involved in tissue repair and entrap these factors at the site of the lesion. On the other side, it contained a tag, which included a sequence derived from a laboratory study based on phage expression. The reason for keeping the sequence of this tag is to attach the peptide to the scaffold containing hydroxyapatite and purifying the recombinant peptide by the hydroxyapatite column. Therefore, the gene sequence was optimized and synthesized for expression in the prokaryotic host of E.coli strain BL21. Then the gene sequence was subcloned by double digestion with the SacI and BamHI enzymes into the expression vector of pET-21a(+). The expression of the recombinant peptide was investigated by SDS-PAGE and western blot. In order to optimize the purification conditions, two-step purification was carried out by applying fundamental changes in the main work method of the manufacturer company and was purified with acceptable purity. Finally, the existence of peptide assemblies was investigated by the SLD method.

Finding The results of PCR cloning, enzymatic digestion using SacI and BamHI enzymes and sequencing indicated the accuracy of the cloning process. On the other hand, expression of the fusion peptide was confirmed by SDS-PAGE and Western blot techniques, and its migration onto the gel resulted in a band cleavage of about 12 kDa. Changes made to the manufacturer's workflow allowed the purification process to be optimized and the results of the DLS method showed the purity of the purified peptide.

Conclusion The results indicate the desirable expression and remarkable purity of the fusion peptide designed in this study.

Keywords Peptide; Fusion; Hydroxyapatite; Heparin Binding Domain; DLS

CITATION LINKS

[1] Three-dimensional microfluidic tissue-engineering scaffolds ... [2] Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road ... [3] Bone tissue ... [4] Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation ... [5] Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro; Morphology ... [6] Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral ... [7] Heparin-binding domain of fibrin (ogen) binds growth factors and ... [8] Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of ... [9] Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous ... [10] Advances in affinity ligand-functionalized nanomaterials ... [11] New trends and affinity tag designs for recombinant ... [12] Protein chromatography on hydroxyapatite ... [13] Working with a powerful and robust mixed-mode ... [14] Identification of a highly specific hydroxyapatite-binding peptide using ... [15] Laemmli-sds ... [16] Bradford protein ... [17] CHT™ ceramic hydroxyapatite: A new dimension in ... [18] Theory of chromatography on hydroxyapatite columns ... [19] Hydroxyapatite as a liquid chromatographic ... [20] Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating ... [21] Bone engineering by controlled delivery of ... [22] Controlled release strategies for bone, cartilage, and ... [23] Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue ... [24] Composite polymer-bioceramic scaffolds with drug ... [25] Chemically-conjugated bone morphogenetic protein-2 on ... [26] A novel strategy for the purification of a ... [27] Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid ...

¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Laboratory for Immunoregulation & Tissue Engineering, Dentistry Faculty, University of Southern California, Los Angeles, USA

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884744
Fax: +98 (21) 82884717
hasannia@modares.ac.ir

Article History

Received: April 20, 2019

Accepted: July 24, 2019

ePublished: December 21, 2019

تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب حاوی تگ تمایلی به هیدروکسی آپاتیت با کمک ستون کروماتوگرافی سرامیکی

مینا بحری MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

صادق حسن‌نیا* PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

بهاره دبیرمنش PhD

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

همایون حسین‌زاده PhD

آزمایشگاه تنظیمات ایمنی و مهندسی بافت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه کالیفرنیا جنوبی، لس‌آنجلس، ایالات متحده

چکیده

مقدمه: امروزه ترمیم بافت استخوانی با افزایش اختلالات و آسیب‌های استخوانی از اهمیت خاصی برخوردار است. مهندسی بافت استخوان، راهکارهای ویژه‌ای را برای رفع این مشکلات فراهم کرده است. مطالعه حاضر با هدف تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب حاوی تگ تمایلی به هیدروکسی آپاتیت با کمک ستون کروماتوگرافی سرامیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، نوعی پپتید فیوژن طراحی شد که از یک سو حاوی توالی دمین اتصالی به هیپارین بود که می‌تواند به انواع مختلفی از فاکتورهای رشد دخیل در ترمیم بافت متصل و باعث به‌دام‌انداختن این فاکتورها در محل ضایعه شود و از سوی دیگر حاوی یک تگ بود که شامل توالی به‌دست‌آمده از یک مطالعه آزمایشگاهی مبتنی بر بیان فازی است. علت قراردادن این تگ، اتصال پپتید به داربست حاوی هیدروکسی آپاتیت و تخلیص پپتید نوترکیب توسط ستون هیدروکسی آپاتیت بود. بنابراین توالی ژن برای بیان در میزبان پروکاریوتی *E. coli* سویه BL21 بهینه‌سازی و سنتز شد. سپس توسط هضم دوگانه با آنزیم‌های SmaI و BamHI در وکتور بیانی pET-21a(+) ساب‌کلون شد. بیان پپتید نوترکیب از طریق روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات بررسی شد. برای بهینه‌کردن شرایط تخلیص، با اعمال تغییرات اساسی در روش کار اصلی شرکت سازنده، تخلیص دو مرحله‌ای انجام شد. این پپتید با تمایل بالایی به ستون متصل و با خلوص قابل قبولی تخلیص شد. در نهایت وجود تجمعات پپتیدی از طریق روش DLS بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج کلونی PCR، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های SmaI و BamHI و تعیین توالی حاکی از صحت فرآیند کلونینگ بود. از طرفی بیان پپتید فیوژن توسط روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات تایید و مهاجرت آن روی ژل باعث ظاهر شدن باندی در حدود ۱۲ کیلودالتون شد. تغییرات ایجادشده در روش کار شرکت سازنده باعث شد فرآیند تخلیص به‌صورت مطلوبی انجام شود و در نهایت نتایج روش DLS هم خلوص پپتید تخلیص شده را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان‌دهنده بیان مطلوب و خلوص قابل توجه پپتید فیوژن طراحی‌شده در این مطالعه است.

کلیدواژه‌ها: پپتید، فیوژن، هیدروکسی آپاتیت، دمین اتصالی به هیپارین، پراکندگی نور دینامیکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۲

*نویسنده مسئول: hasannia@modares.ac.ir

مقدمه

هر ساله، میلیون‌ها عمل جراحی برای التیام یا ترمیم یک بافت انجام می‌شود. طی دو دهه اخیر، مهندسی بافت جایگزین بسیار امیدوارکننده‌ای را برای ازمیان‌برداشتن محدودیت‌های مربوط به روش‌های مرسوم مانند اتوگرافت و آلوگرافت به علت داشتن معایبی از قبیل کمبود منابع استخوان، تهاجمی بودن روش برداشت از بافت میزبان، احتمال انتقال بیماری‌ها، تحریک سیستم ایمنی و امکان پس‌زدن استخوان پیوندی ایجاد کرده است^[1]. از آغاز ظهور مهندسی بافت تاکنون، بافت استخوانی به دلیل قابلیت بسیار بالای بازسازی از اهمیت قابل توجهی برخوردار بوده است و در سال‌های اخیر، روش‌های جدیدی را برای تشکیل بافت اسکلتی ارایه کرده است که از طریق آنها، ترمیم یا بازسازی نقایص استخوانی ممکن شده است^[2-4].

در مهندسی بافت، فاکتورهای رشد از اهمیت خاصی برخوردار هستند و می‌توانند به روش‌های مختلفی در اختیار سلول قرار بگیرند. استفاده مستقیم از فاکتورهای رشد موجود در محل ضایعه، استفاده از روش‌های PRP (پلاکت‌درمانی) به‌عنوان منبع فاکتورهای رشد، انتقال ژن کدکننده فاکتور رشد و بیان آنها در سلول میزبان، اتصال فاکتور رشد به داربست و رهایش کنترل‌شده آن در هنگام تجزیه داربست، استفاده از داربست‌هایی که در ترکیب ذاتی‌شان فاکتور رشد قرار داده شده است، کشت سلول‌ها در حضور فاکتور رشد و استفاده از ترکیبات ماتریکس با تمایل اختصاصی به فاکتورهای رشد از انواع این روش‌ها است که در همه موارد ذکر شده محدودیت‌هایی وجود دارد^[5, 6]. بنابراین به‌منظور رفع این محدودیت‌ها و کاهش هزینه‌های تولید نوترکیب فاکتورهای رشد، در توالی سازه نوترکیب توالی دمین متصل‌شونده به هیپارین قرار داده شد که توانایی اتصال به انواع مختلفی از فاکتورهای رشد را داشته و می‌تواند بازه وسیعی از فاکتورهای رشد مانند فاکتورهای رشد خانواده BMP را به محل آسیب جذب کرده، غلظت موضعی آنها را افزایش و رهایش آنها را کنترل کند. از سوی دیگر وجود دمین اتصالی به هیپارین می‌تواند نسبت فاکتورهای رشد لازم برای بازسازی بافت استخوانی را در محل ترمیم به شرایط طبیعی نزدیک‌تر کند^[7]. مساله مهم دیگری که در طراحی سازه نوترکیب مورد توجه قرار می‌گیرد، فرآیند تخلیص است که در این راستا انتخاب نوع کروماتوگرافی و تگ مناسب با آن اهمیت خاصی دارد. تولید پروتئین‌های نوترکیب به‌صورت بسیار خالص، همواره مورد توجه پژوهشگران و صنایع مختلف به‌ویژه صنایع داروسازی بوده است. بنابراین یکی از اهداف اصلی این پروژه، دستیابی فیوژن پپتید خالص با راندمان بالا است. به‌عبارتی فرآیند تخلیص باید یک روش قدرتمند، قابل اعتماد و قادر به حذف ناخالصی‌های مختلف باشد تا از ایمنی محصول اطمینان حاصل شده و به‌سادگی در مقیاس بالا نیز قابل انجام باشد. بنابراین میزان خلوص، سرعت انجام فرآیند و بازده قابل توجه محصول نهایی تعدادی از پارامترهای کلیدی هستند

ایالات متحده)، ایزوپروپیل‌بتادی‌اتیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) (Fermentas؛ ایالات متحده)، آنتی‌بادی اولیه شامل آنتی‌بادی IgG پلی‌کلونال خرگوشی علیه باقیمانده‌های ۱۵ تا ۳۰۰ انتهای N-ترمینال زنجیره β فیبرونوژن (Santa Cruz Biotechnology؛ ایالات متحده)، آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti-Rabbit HRP (DNA Biotech؛ ایران)، رزین هیدروکسی‌آپاتیت (CHT ceramic Hydroxyapatite Type II) (Bio-Rad؛ ایالات متحده) و سایر مواد شیمیایی (Merck؛ آلمان، Sigma-Aldrich؛ ایالات متحده) استفاده شد.

طراحی سازه نوترکیب

یک فیوژن پپتید حاوی ۷۴ باقیمانده و دارای سه ناحیه مشخص طراحی شد. بخش اول این سازه مربوط به دمین اتصال به هپارین و شامل توالی ۱۵ تا ۶۵ ناحیه N-ترمینال زنجیره β پروتئین فیبرونوژن، بخش دوم شامل یک لینکر قابل انعطاف بوده که از دو توالی لینکر عمومی G4S تشکیل شده و بخش سوم نیز ۱۲ باقیمانده داشت که شامل ناحیه اتصال به بستر سرامیکی هیدروکسی‌آپاتیت و دارای توالی به‌دست‌آمده از یک مطالعه آزمایشگاهی مبتنی بر بیان فاژ به توالی SVSVGMKPSRP بود^[14].

با توجه به اینکه از سیستم بیان پروکاریوتی برای ادامه فرآیند استفاده شد، سازه طراحی‌شده براساس ارجحیت کدونی برای درج در وکتور پروکاریوتی (+) pET21a (Invitrogen؛ ایالات متحده) و تولید پپتید توسط سیستم بیانی باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) (Novagen؛ ایالات متحده) بهینه شد. سپس این سازه در بین جایگاه‌های برشی آنزیم‌های محدودالتر BamHI در انتهای ۵' و SacI در انتهای ۳' طراحی شد و برای سنتز سفارش داده شد (Biomatic International؛ کره‌جنوبی) از آنجایی که سازه نوترکیب در داخل وکتور pUC57 سنتز شده بود، برای ادامه روند کار باید ژن نوترکیب در داخل وکتور (+) pET21a به‌عنوان وکتور بیانی درج و کلون می‌شد. بنابراین ابتدا پلاسمید pUC57 حاوی ژن نوترکیب استخراج شد. سپس توسط آنزیم‌های محدودالتر BamHI و SacI مورد هضم دوگانه قرار گرفت. وکتور (+) pET21a نیز همزمان با این دو آنزیم به‌صورت دوگانه هضم شد. سپس قطعه ژنی و پلاسمید حاصل از هضم آنزیمی برای انجام واکنش الحاق توسط DNA T4 لیگاز به کار برده شد. پلاسمید نوترکیب به میزبان مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5 α (Invitrogen؛ ایالات متحده) با روش شوک حرارتی منتقل شد. برای تایید کلونینگ سازه مورد نظر در وکتور (+) pET21a از روش کلونی PCR استفاده شد. سپس به‌منظور تایید نهایی از کلونی‌های تاییدشده استخراج پلاسمید انجام و برای تعیین توالی ارسال شد. نتیجه تعیین توالی حضور ژن و توالی صحیح آن را نشان داد. برای انجام کلونی PCR از توالی GCC CGC TGG ATA AAA AAC به‌عنوان پرایمر پیشرو و توالی TTA TGC TAG TTA TTG CTC به‌عنوان پرایمر معکوس استفاده شد.

که در طول توسعه فرآیندهای پایین‌دستی در نظر گرفته می‌شوند^[8]. به‌منظور دستیابی به شدت خلوص مورد نیاز صنعت داروهای زیستی که گاهی فراتر از ۹۹٪ است، مراحل مختلف کروماتوگرافی لازم است. تکنیک کروماتوگرافی امکان تفکیک بالای مواد را فراهم کرده و معمولاً بخش پرکار تخلیص پروتئین است^[9, 10]. با این حال کروماتوگرافی یکی از پرهزینه‌ترین مراحل در فرآیند تخلیص به حساب می‌آید که عمدتاً علت آن هزینه محیط و زمان‌بر بودن مراحل است. به‌علاوه صنعت داروهای زیستی هنوز از نظر میزان محصول خروجی و قابلیت افزایش مقیاس محدودیت‌هایی دارد^[8]. درواقع کروماتوگرافی یک تکنیک بسیار موثر با کاربردهای وسیع صنعتی است که در حال حاضر به‌دلیل ظرفیت تفکیک بالا، انتخاب مطلوبی به شمار می‌آید^[10].

در این راستا نکته مهم دیگر، وجود تگ‌های تخلیص موجود در پروتئین‌های مهندسی شده است. این تگ‌ها موجب تسهیل فرآیند و بازدهی و خلوص بالا طی چند مرحله می‌شوند. در طول سال‌ها، تعداد زیادی از تگ‌های تخلیص توسعه یافته‌اند که شامل پپتیدهای کوتاه، اپی‌توب‌ها، دمین‌های تاخورد پروتئینی، تگ‌های غیرکروماتوگرافیک و اخیراً نیز تگ‌های چندعملکردی ترکیبی با توانایی بهینه‌سازی هستند. تگ‌ها معمولاً به انتهای آمینی یا کربوکسیلی پروتئین هدف متصل می‌شوند و اغلب به پروتئین مربوطه امکان می‌دهند که به‌صورت اختصاصی به ستون تمایلی مورد نظر متصل و از سایر پروتئین‌ها جدا شود^[11]. همچنین گاهی تگ‌ها ممکن است باعث تسهیل شناسایی پروتئین هدف و یا بهبود حلالیت آن شوند.

امروزه استفاده از هیدروکسی‌آپاتیت در ستون‌های کروماتوگرافی تخلیص پروتئین، عمدتاً به‌دلیل افزایش استفاده از آن در تخلیص پروتئین‌های نوترکیب، به‌طور چشمگیری نسبت به گذشته افزایش یافته است^[12]. توانایی اتصال این سرامیک به انواع پروتئین‌های میزبان، پروتئین A، دایمرها، تجمع‌ات آنتی‌بادی، اسیدهای نوکلئیک و ویروس‌ها، امکان استفاده از آن در همه مراحل تخلیص شامل جذب اولیه محصول تا ظرفیت‌کاری‌های نهایی را فراهم کرده است. پیشرفت‌های اخیر در درک ویژگی‌های این سرامیک منجر به توسعه روش‌های تخلیص براساس آن شده و این موضوع به‌طور قابل توجهی قدرت این روش را در مقیاس‌های تولیدی افزایش داده است^[13].

مطالعه حاضر با هدف تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب حاوی تگ تمایلی به هیدروکسی‌آپاتیت با کمک ستون کروماتوگرافی سرامیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد

در این مطالعه از کیت استخراج پلاسمید (GeneAll؛ کره جنوبی)، کیت استخراج DNA از ژل (GeneAll؛ کره جنوبی)، آنزیم‌های محدودکننده (Fermentas؛ ایالات متحده)، لیگاز (Fermentas؛

بافر دوم (Na_2HPO_4) به کمک بافر اول ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) تنظیم و تمام بافرها به $\text{pH}=7/3$ رسانده شد.

مراحل تخلیص پپتید با ستون هیدروکسی آپاتیت

به منظور اتصال فیوژن پپتید به ستون، سوپرویی لیز باکتری با حجم برابری از بافر اتصال (Na_2HPO_4) با غلظت ۵ میلی مولار به حجم رسانده و به ستون حاوی رزین هیدروکسی آپاتیت اضافه شد. مرحله اتصال به صورت شبانه روزی در دمای 4°C انجام گرفت. سپس ستون دو بار با بافر شست و شوی مرحله اول (بافر Na_2HPO_4) با غلظت ۲۰ میلی مولار شسته شد. برای مرحله جدا شدن پروتئین ها از ستون نیز از بافر جداکننده مرحله اول (بافر Na_2HPO_4) با غلظت ۲۰۰ میلی مولار استفاده شد. در این مرحله در مخلوط پروتئینی خارج شده از ستون، علاوه بر پپتید مورد نظر، پروتئین های دیگری نیز وجود داشت. بنابراین به منظور خلوص بیشتر، مرحله دوم تخلیص انجام شد. به این ترتیب که محلول به دست آمده از مرحله اول برای تعویض بافر و رساندن بافر فسفات سدیم ۲۰۰ میلی مولار به بافر فسفات سدیم ۵ میلی مولار به وسیله سنتریکون عمل دیالیز و پس از آن فرایند تغلیظ محلول انجام شد و برای اتصال مجدد، با حجم برابری از بافر اتصال (بافر فسفات سدیم) با غلظت ۵ میلی مولار به حجم رسانده و به ستون حاوی رزین هیدروکسی آپاتیت اضافه شد. مرحله اتصال به مدت ۳ ساعت در دمای 4°C انجام گرفت. در این مرحله برای شست و شوی ستون به جای بافر شست و شوی مرحله اول از محلول کلرید سدیم با غلظت ۲۵۰ میلی مولار استفاده شد و برای بافر خروج دوم نیز محلول کلرید سدیم با غلظت ۱۶۰ میلی مولار به کار برده شد. فرایند دیالیز برای پپتید به دست آمده از مرحله دوم با استفاده از کیسه دیالیز با اندازه منفذ ۳ کیلودالتون در محلول PBS با $\text{pH}=7/3$ انجام گرفت. سپس فیوژن پپتید خالص با استفاده از روش برادفورد تعیین غلظت شده [16] و برای بررسی میزان خلوص آن، از ژل SDS-PAGE، ۱۵٪ احیایی مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت برای ادامه کار، پپتید خالص شده در 20°C نگهداری شد.

وسترن بلات

برای تایید بیان فیوژن پپتید از روش وسترن بلات نیز استفاده شد. در این روش پس از جداسازی مخلوط پروتئینی براساس اندازه در ژل SDS-PAGE، طبق روش کار شرکت Bio-Rad طی ۲ ساعت و با ولتاژ ۱۰۰ میلی آمپر به کاغذ نیتروسولوز انتقال داده شد. بافر انتقال شامل تریس باز ۲۴ میلی مولار، گلیسین ۲۰ میلی مولار و متانول ۲۰٪ بود. پس از انتقال، عمل بلاکینگ با آلومین سرم گاوی ۵٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و ۳ ساعت در 4°C همراه با شیک انجام شد. در مرحله بعد غشای نیتروسولوز با آنتی بادی اولیه با رقت ۱:۲۰۰۰ که شامل آنتی بادی IgG پلی کلونال خرگوشی علیه باقیمانده های ۱۵ تا ۳۰۰ انتهای N- ترمینال زنجیره β فیبرونوژن بود، به صورت شبانه گذاشته و پس از شست و شو با آنتی بادی ثانویه (Goat Anti-Rabbit HRP) با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. سپس غشا با بافر PBST (بافر نمکی فسفات حاوی غلظت ۰/۵٪ از توئین

پس از اینکه وکتور pET21a(+) حاوی سازه نوترکیب به باکتری مستعد *E. coli* سویه BL21 ترانسفورم شد، برای به دست آوردن کلونی های تک، در محیط LB جامد (Merck؛ آلمان) حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C کشت داده شد. سپس برای تهیه پیش کشت یک کلونی برداشته و در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای 37°C کشت داده شد و از این کشت ۱۶ ساعته برای تلقیح محیط LB مایع جدید حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) استفاده و محیط ذکر شده در انکوباتور با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. زمانی که OD (جذب نور) محیط در طول موج ۶۰۰ نانومتر به حدود ۰/۸ رسید، بیان پپتید نوترکیب با استفاده از یک میلی مولار IPTG القا شد. به منظور به دست آوردن بهترین شرایط بیان برای ایجاد مقادیر بالایی از پپتید محلول و فعال، بعد از بررسی شرایط مختلف بیان، در نهایت غلظت ۱/۵ میلی مولار IPTG، دمای 25°C ، سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و زمان ۳ ساعت به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. پس از این زمان، محتویات هر ارلن در فالتکون ها تقسیم و با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه، زمان ۶ دقیقه و دمای 4°C سانتریفیوژ و رسوب باکتری برای مطالعات بعدی جمع آوری شد. در مرحله بعد، رسوب حاصل در بافر PBS ($\text{pH}=7/4$) دو بار شست و شو داده شد تا باقیمانده محیط کشت از آن حذف شود. پس از حل کردن رسوب باکتری با بافر فسفات سدیم ۵ میلی مولار، سوسپانسیون حاصل روی یخ طی ۲۰ سیکل (هر سیکل ۲۰ ثانیه) با توان ۱۵۰ وات سونیکیت شد. مخلوط پروتئینی حاصل از سلول های شکسته شده با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 4°C سانتریفیوژ شد و برای مطالعات بعدی سوپرویی جدا و نگهداری شد. در نهایت نمونه های قبل و بعد از القا با IPTG با روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید سدیم دودسیل سولفات) مورد ارزیابی قرار گرفت.

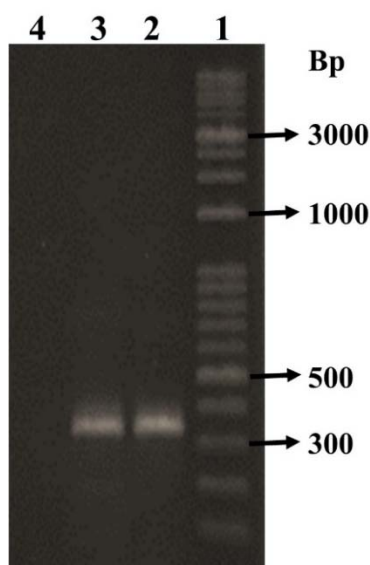
آنالیز SDS-PAGE

به منظور آنالیز SDS-PAGE نمونه ها براساس پروتکل استاندارد، روی ژل ۱۵٪ پلی اکریل آمید تحت شرایط احیایی بارگذاری و در نهایت توسط رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شدند [15].

خالص سازی فیوژن پپتید با ستون هیدروکسی آپاتیت

فیوژن پپتید در انتهای کربوکسیلی خود دارای تگ اتصالی به هیدروکسی آپاتیت است. بنابراین تخلیص پپتید نوترکیب با استفاده از ستون حاوی رزین هیدروکسی آپاتیت همراه با مقداری تغییرات در روش کار اصلی شرکت سازنده در دو مرحله انجام شد. در این روش تنها از بافر تعادل سازی براساس روش کار شرکت سازنده استفاده شد و به منظور بهینه سازی فرایند تخلیص، بقیه بافرها و مراحل تغییر کردند. روش جدید از چهار مرحله تعادل سازی، اتصال، شست و شو و جدا شدن فیوژن پپتید از ستون تشکیل شد. در همه مراحل برای تهیه بافر فسفات سدیم به این صورت عمل شد که pH

کلون شد. برای تایید حضور ژن مورد نظر در وکتور، از روش کلونی PCR استفاده شد. با روش کلونی PCR و با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده که توالی پرایمر پیشرو مربوط به ابتدای ژن و توالی پرایمر معکوس مربوط به شماره ۱۹۰ بدنه وکتور است که باعث می شود حدود ۱۲۵ جفت نوکلئوتید به توالی مورد نظر افزوده شود، یک توالی حدود ۳۴۷ جفت نوکلئوتیدی تکثیر شد. با توجه به کنترل منفی، کلونی های انتخاب شده مثبت و دارای باند ژن مورد نظر بودند (شکل ۲). سپس از کلونی های تایید شده، استخراج پلاسمید انجام و به منظور تایید نهایی برای تعیین توالی ارسال شد که حضور ژن مورد نظر به طور ۱۰۰٪ مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۲) نتیجه ژل آگارز داده های حاصل از روش کلونی PCR که وجود قطعه ای حدود ۳۴۷ جفت بازی با توجه به پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، کلونی های مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب را تایید کرد. (۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- کلونی مثبت، ۳- کلونی مثبت، ۴- پلاسمید pET21a(+) فاقد ژن به عنوان کنترل منفی)

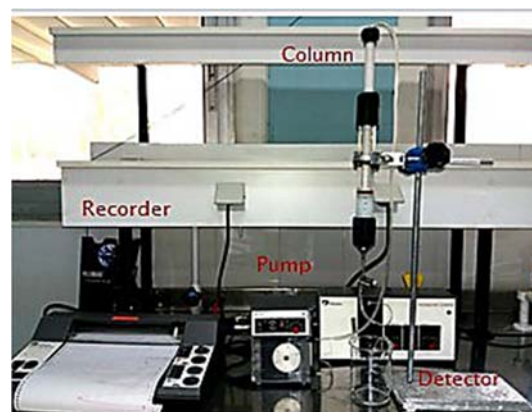
آنالیز SDS-PAGE

پس از تایید نهایی صحت کلونینگ، پلاسمیدهای نوترکیب pET21a(+) به میزبان *E. coli* سویه BL21 (DE3) برای بیان فیوژن پپتید به روش شوک حرارتی ترانسفورم شدند. با بررسی شرایط مختلف بیان، در نهایت غلظت ۱/۵ میلی مولار IPTG، دمای ۲۵°C، سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و زمان ۳ ساعت به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد. سلول های باکتری بعد از سونیکیت با سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴°C ته نشین شدند. محلول رویی لیز باکتری قبل و بعد از القا با ترکیب IPTG با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ و تحت شرایط احیایی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۳). براساس محاسبات تئوری تخمین وزن فیوژن پپتید در حدود ۱۰ کیلودالتون بود، اما مهاجرت آن روی ژل باعث شد که باند مربوط به بیان پپتید نوترکیب نسبت به کنترل منفی در حدود ۱۲ کیلودالتون مشاهده شود. نتایج حاصل نشان دهنده بیان پپتید نوترکیب بود (شکل ۳).

۲۰) شست و شو داده شد. در نهایت کاغذ نیتروسلولز با سوبسترای محلول کمی لومینسانس از کیت ECL (سیتومتین ژن؛ ایران) تحت شرایط استاندارد مجاور شده و باندهای فلورسنت روی غشا ظاهر و از این طریق حضور فیوژن پپتید مورد تایید قرار گرفت.

کروماتوگرام تخلیص فیوژن پپتید

برای بررسی مراحل تخلیص، نمودار کروماتوگرام با استفاده از دستگاه پمپ پریستالتیک (Pharmacia؛ ایالات متحده) که به آشکارساز نور فرابنفش متصل است، رسم شد (شکل ۱). طی انجام مراحل تخلیص، دستگاه ثبت کننده مراحل را به صورت نمودار ثبت می کند. به طوری که ابتدا نمودار نمونه ورودی، سپس نمودار مربوط به مرحله جداسدن پپتید از ستون را نشان می دهد که در این نمودارها محور طول پارامتر زمان و محور عرض میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر را نشان می دهد. سرعت جریان این دستگاه در حدود ۵۰۰ میکرولیتر در دقیقه است.



شکل ۱) سیستم کروماتوگرافی ستون هیدروکسی آپاتیت حاوی پمپ پریستالتیک، آشکارساز نور فرابنفش و یک ثبت کننده

آنالیز DLS مربوط به فیوژن پپتید خالص

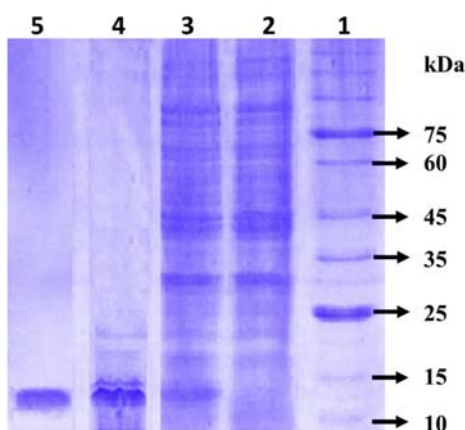
آنالیز DLS مربوط به فیوژن پپتید تخلیص شده توسط عبور آن از دستگاه مالورن زتاسایزر (مالورن؛ انگلستان) انجام شد. این آنالیز به منظور بررسی پراکندگی محلول پروتئینی و محاسبه شعاع هیدرودینامیکی پپتید طبیعی در دمای ۲۰°C مورد استفاده قرار گرفت. محلول پپتید نوترکیب از یک فیلتر ۰/۲ میکرومتری گذرانده شد. محلول پپتیدی مربوط به مراحل مختلف تخلیص برای آنالیز نمونه ها به کار برده شد. نور پراکنده شده در زاویه ثابت ۹۰ درجه شناسایی و توزیع اندازه ذره با استفاده از الگوریتم های کانتین و معادله استوکس- انیشتین مورد محاسبه قرار گرفت.

یافته ها

کلونینگ سازه نوترکیب

وکتور pUC57 حاوی ژن سازه نوترکیب توسط آنزیم های محدودالثر BamHI و SacI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. ژن سازه نوترکیب برش خورده در وکتور pET-21a(+) درج و به میزبان مستعد *E. coli* سویه DH5α توسط شوک حرارتی انتقال و سپس

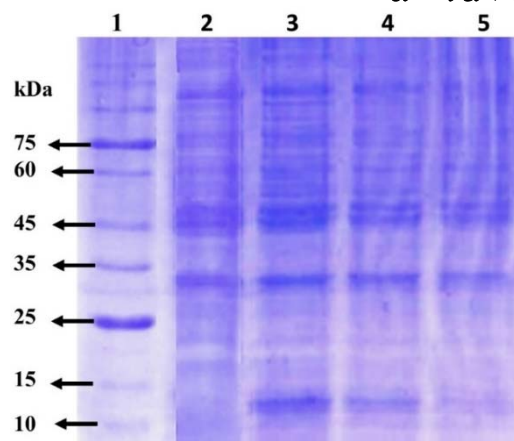
pH ایزوالکتریک (PI) محاسبه شده برای فیوژن پپتید حدود ۱۰/۷۱ بود. در این ستون، اتصال پروتئین‌های بازی با کاهش pH به دلیل افزایش بار مثبت روی پروتئین قوی‌تر می‌شود. بنابراین pH تمام بافرهای استفاده شده برای فرآیند تخلیص برابر ۷/۳ انتخاب شد که این مقدار پایین‌تر از PI فیوژن پپتید بود. درواقع به‌عنوان یک قاعده ساده، pH پایین‌تر بافر موجب قوی‌تر شدن اتصال بهتر گروه‌های آمین به جایگاه‌های P شده و استفاده از بافر فسفات سدیم با مولاریته کم به درگیری بهتر کمک کرده و باعث مهار جایگاه‌های C می‌شود (شکل ۴-ب). از طرفی بافر فسفات سدیم با مولاریته بالاتر باعث جداسازی پروتئین می‌شود. بنابراین در مرحله اول تخلیص، برای جدا شدن پپتید از ستون از بافر فسفات سدیم ۲۰۰ میلی‌مولار استفاده شد، اما محصول بافر خروج اول همچنان دارای ناخالصی بود. به‌همین دلیل مرحله دوم تخلیص انجام شد. بدین صورت که در مرحله شست‌وشوی دوم، با استفاده از محلول کلرید سدیم با غلظت ۲۵ میلی‌مولار ناخالصی‌های موجود از ستون شسته شد و جدا کردن فیوژن پپتید از ستون با استفاده از محلول کلرید سدیم با غلظت ۱۶۰ میلی‌مولار با فرآیند تعویض کاتیونی انجام شد (شکل ۴-د). در نهایت محصول خروج دوم حاوی فیوژن پپتید خالص بود (شکل ۵).



شکل ۵ بررسی بیان و تخلیص فیوژن پپتید با استفاده از ژل ۱۵% پلی‌اکریل‌آمید تحت شرایط احیایی؛ (۱- مارکر وزن مولکولی پروتئین، ۲- لیز باکتری قبل از القا با IPTG؛ ۳- محلول رویی لیز باکتری بعد از القا با IPTG، ۴- محصول خروجی ستون در مرحله اول تخلیص، ۵- محصول خروجی ستون در مرحله دوم تخلیص)

وسترن بلات

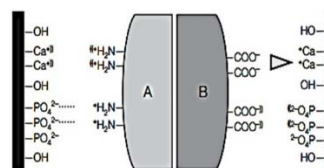
به‌دلیل اینکه آنتی‌بادی اولیه شامل آنتی‌بادی IgG پلی‌کلونال خرگوشی علیه باقیمانده‌های ۱۵ تا ۳۰۰ انتهای N- ترمینال زنجیره β فیبرونوژن به‌صورت اختصاصی متصل می‌شود، نمونه فیوژن پپتید تخلیص‌شده با آنتی‌بادی اختصاصی در کاغذ نیتروسولوز واکنش نشان داد و باند مربوط به آن در محدوده ۱۲ کیلو دالتون نسبت به مارکر وزن مولکولی پروتئین مشاهده شد. نتایج حاصل از وسترن بلات یکسان بودن پپتید تخلیص‌شده و پپتید نوترکیب مورد نظر را تایید کرد (شکل ۶).



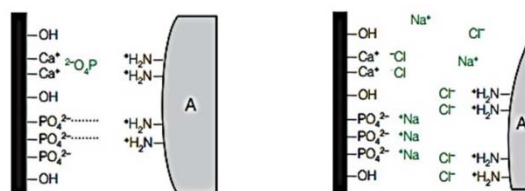
شکل ۳ بررسی بیان فیوژن پپتید با استفاده از ژل ۱۵% پلی‌اکریل‌آمید تحت شرایط احیایی؛ (۱- مارکر وزن مولکولی پروتئین، ۲- لیز سلول باکتری قبل از القا با ترکیب IPTG، ۳- بیان فیوژن پپتید بعد از القا با ترکیب IPTG بعد از سه ساعت، ۴- بیان پپتید بعد از ۶ ساعت، ۵- بیان پپتید بعد از ۱۲ ساعت)

تخلیص فیوژن پپتید

سرامیک هیدروکسی‌آپاتیت یک رزین ترکیبی با فرمول $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ است. گروه‌های فعال و دارای عملکرد این ستون شامل جفت یون‌های کلسیم دارای بار مثبت به‌عنوان جایگاه‌های C و شش اتم اکسیژن با بار منفی متصل به گروه‌های فسفات به‌عنوان جایگاه‌های P است [17-19]. گروه‌های آمینی یا دیگر گروه‌های دارای بار مثبت در سطح پروتئین‌ها یا مولکول‌های دیگر با مکانیسم کلاسیک تعویض کاتیونی به جایگاه‌های P جذب و توسط جایگاه‌های C دفع می‌شوند. این حالت برای گروه‌های کربوکسیل و فسفوریل موجود در مولکول‌های هدف به‌صورت معکوس است و با مکانیسم تمایل به فلز به ستون متصل می‌شوند (شکل ۴-الف).



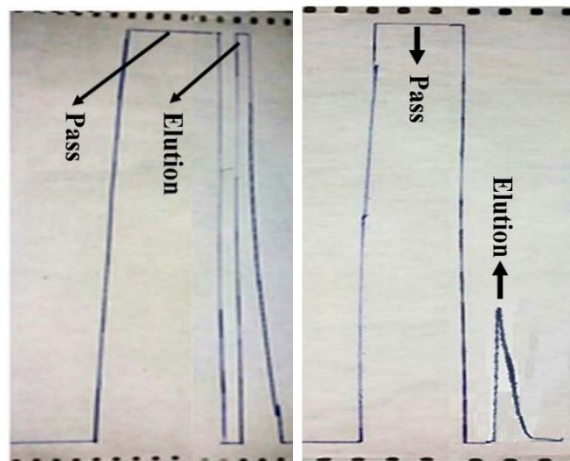
الف



ب

د

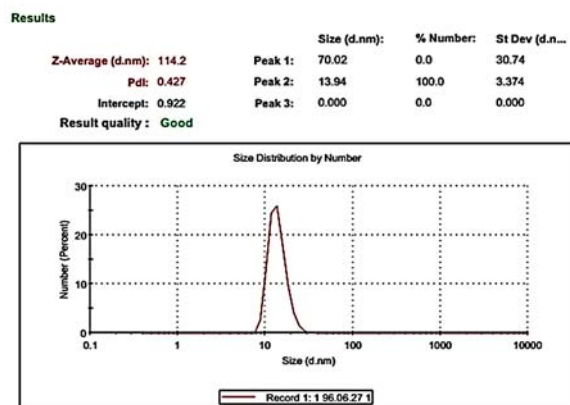
شکل ۴ نحوه اتصال پروتئین به ستون هیدروکسی‌آپاتیت؛ (الف- A: یک پروتئین بازی، B: یک پروتئین اسیدی، ب- افزایش اتصال گروه‌های آمین با مهار جایگاه‌های C، د- جدا شدن انتخابی گروه‌های آمین اتصال‌ی توسط محلول کلرید سدیم [19])



ب

الف

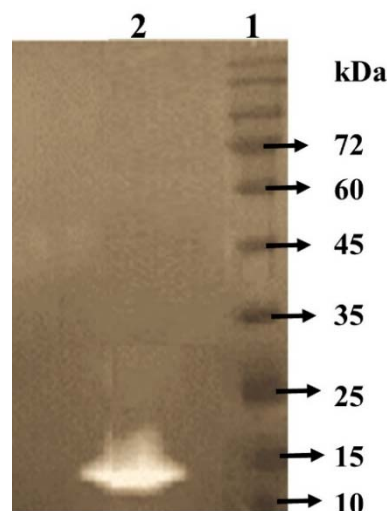
شکل ۷) نمودار کروماتوگرام مربوط به فرآیند تخلص با ستون هیدروکسی آپاتیت؛ (الف- کروماتوگرام مربوط به مرحله اول تخلص روی رزین هیدروکسی آپاتیت به حجم ۵/۵ میلی لیتر: حجم نمونه ورودی ۵ میلی لیتر و دارای حجم برابری از محلول روی لیز باکتری و بافر اتصال بود. حجم بافر شستشو و حجم بافر خروج نیز حدود ۱۰ میلی لیتر بود. ب- کروماتوگرام مربوط به مرحله دوم تخلص: نمونه ورودی شامل مخلوط پپتیدی حاصل از مرحله اول ستون بود و حجم نمونه ورودی، حجم بافر شستشو و حجم بافر خروج نیز با مرحله اول تفاوتی نداشت.) در نمودارهای حاصل محور طولها پارامتر زمان و محور عرضها میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر را نشان می دهد.



نمودار ۱) آنالیز DLS پپتید نو ترکیب تخلص شده

بحث

در مطالعه حاضر تلاش شد تا سیستمی جامع و فراگیر برای ترمیم بافت استخوانی طراحی شود که در آن کمترین میزان فرآیندهای پایین دستی و کمترین مقدار پروتئین نو ترکیب مورد نیاز باشد. یک مساله مهم در مهندسی بافت، انتقال پیام های بیوشیمیایی است که می تواند از روش های متعددی مثل روش بدون اتصال، متصل به ایمپلنت برای انتقال کنترل شده، ایجاد پوشش در سطح ایمپلنت یا بیان آنها در سلول ها از طریق مکانیسم های انتقال ژن انجام شود [20-23]. به عنوان مثال استفاده از فاکتورهای رشد بدون اتصال، امکان استفاده زیاد و حذف سریع آنها از محیط را فراهم می کند. این روش ممکن است برای تحریک کوتاه مدت اولیه مناسب باشد،



شکل ۹) آنالیز وسترن بلات نمونه فیوژن پپتید تخلص شده و مشاهده باند حدود ۱۲ دالتونی که حضور فیوژن پپتید را تایید کرد. (۱- مارکر وزن مولکولی پروتئین، ۲- نمونه فیوژن پپتید تخلص شده)

نمودار کروماتوگرام مربوط به فرآیند تخلص با ستون هیدروکسی آپاتیت

در نمودار کروماتوگرام پیک اول به نمونه ورودی مربوط بود که شامل محلول رویی لیز باکتری است که با بافر اتصال ترکیب شده است. همچنین پیک دوم مربوط به مرحله جدا شدن پپتیدهایی بود که به ستون متصل شده اند که نشان دهنده اتصال فیوژن پپتید حاوی تگ مورد نظر به صورت تمایلی به ستون هیدروکسی آپاتیت است. در مرحله دوم، در واقع نمونه ورودی آن مخلوط پپتیدی تقریباً تخلص شده مرحله اول بود که بعد از دیالیز و تغلیظ پپتید حاصل از مرحله اول و ترکیب کردن آن با بافر اتصال به ستون هیدروکسی آپاتیت اضافه شد. همچنین پیک دوم آن مربوط به محصول خروجی ستون بود که در این مرحله با تغییر بافر شستشو و بافر خروج نسبت به بافرهای مرحله اول میزان تخلص فیوژن پپتید افزایش پیدا کرد و نتایج حاصل خلوص مطلوب و قابل قبول فیوژن پپتید را نشان داد (شکل ۷).

آنالیز DLS

یکی از روش هایی که از طریق آن می توان میزان خلوص پپتید تخلص شده را بررسی کرد، استفاده از تکنیک DLS است. از این تکنیک برای بررسی پایداری، پراکنش محلول پروتئینی و همچنین تعیین شعاع هیدرودینامیکی استفاده می شود. به این منظور نمونه هایی از مراحل مختلف تخلص پپتید تهیه شد. محلول پپتیدی مرحله خروج دوم حالت مونودیسپرس را نشان داد و حالت مونودیسپرسی محلول پپتید از طریق تک پیک ثابت قابل مشاهده بود (نمودار ۱). در حالی که نمونه های مربوط به بقیه مراحل تخلص از حالت مونودیسپرسی خارج شد. از طرفی شعاع هیدرودینامیکی برای پپتید نو ترکیب حدود ۱۳/۹۵ nm محاسبه شد. به طور کلی محلول پپتید تخلص شده حالت مونودیسپرس بوده و فاقد هرگونه ناخالصی و یا اشکال غیرعادی پپتید بود (نمودار ۱).

چراکه وابسته به میزان تخریب مواد زیستی و غیر قابل پیش‌بینی است. اما اگر تحریک فاکتور رشد به‌صورت طولانی‌مدت مورد نیاز باشد، به‌دام‌انداختن آنها به‌صورت فیزیکی (استفاده از میکروسفرها، نانوسفرها و یا لیپوزوم‌ها) یا اتصال آنها با پیوند کووالان (از طریق لینکرهای برش‌پذیر آنزیمی و یا ترکیب شیمیایی) جزء روش‌های انتخابی است و از این طریق می‌توان از رهایش کنترل‌شده آنها بر حسب نیاز به فاکتور رشد یا دارو اطمینان حاصل کرد [24, 25].

در مطالعه حاضر، فیوژن پپتید مشتق از دمن اتصال به هپارین برای اولین‌بار با توالی اتصال به هیدروکسی‌آپاتیت ساخته شد و برای اولین‌بار نیز در کوپلیمر سرامیکی پلی‌کاپرولاکتون و پلی‌پروپیلن‌فومارات (PPF-PCL) غنی‌شده با هیدروکسی‌آپاتیت به‌عنوان یک داربست مورد استفاده قرار گرفت. به‌عبارتی با توجه به موارد بیان‌شده نوآوری این مطالعه شامل موارد زیر است:

(۱) فیوژن پپتید حاوی دمن اتصال به هپارین قادر است به انواع مختلفی از فاکتورهای رشد دخیل در ترمیم بافت متصل شود، در نتیجه باعث به‌دام‌انداختن این فاکتورها در محل ضایعه شده و امکان استفاده مستقیم آنها را در محل ضایعه فراهم کند. همچنین امکان جذب فاکتورهای رشد از خون و محیط اطراف محل آسیب‌دیده، امکان رهایش این فاکتورها را در آن محل کنترل کرده و نسبت فاکتورهای رشد لازم برای بازسازی بافت استخوانی را در محل ترمیم به شرایط طبیعی نزدیک‌تر می‌کند که این مورد نیز خود در ترمیم بافت از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. از طرفی نیاز به افزودن انواع فاکتورهای رشد به داربست و رهایش کنترل‌شده آنها هنگام تجزیه داربست را از بین می‌برد. بنابراین این پپتید می‌تواند یک جایگزین مناسب و کم‌هزینه در این رابطه باشد و از هزینه‌های بیشتر برای تولید و تخلیص پروتئین‌های نو ترکیب و دیگر فاکتورهای رشد جلوگیری کند.

(۲) در گام بعدی، نوعی تگ پپتیدی متصل‌شونده به داربست حاوی هیدروکسی‌آپاتیت در طراحی سازه نو ترکیب قرار داده شد که شامل توالی به‌دست‌آمده از یک مطالعه آزمایشگاهی مبتنی بر بیان فازی است و از طریق آن، علاوه بر توانایی تخلیص از طریق ستون هیدروکسی‌آپاتیت، می‌تواند رهایش انواع مختلفی از پروتئین‌ها و فاکتورهای رشد را از داربست حاوی هیدروکسی‌آپاتیت کنترل کند. توانایی و قدرت اتصال این فیوژن پپتید به داربست، تضمینی بر افزایش مدت‌زمان اتصال فیوژن پپتید به داربست بوده و رهایش آن را از داربست کنترل‌شده‌تر می‌کند. این ویژگی علاوه بر اینکه موجب جلوگیری از ایجاد عوارض جانبی می‌شود، پایداری پروتئین‌های نو ترکیب روی داربست را نیز افزایش داده، در نتیجه التیام بافت استخوانی با سرعت بیشتری صورت خواهد گرفت [14]. میزان و قدرت اتصال این فیوژن پپتید به هیدروکسی‌آپاتیت که تقلیدی از سیستم زیستی است و همچنین رهایش آن از داربست بررسی شد که در مطالعه حاضر به داده‌های حاصل از این بررسی پرداخته نشده است. (۳) طراحی چنین پپتیدی نیازمند روش تخلیص کارا و قدرتمند است. به‌عبارتی دلیل دیگر قراردادن این تگ، بررسی شرایط مختلف

و بهینه‌کردن فرآیند تخلیص و معرفی یک تگ مناسب در طراحی سازه‌های نو ترکیب در این زمینه بوده است که به این منظور، نسبت به مطالعات قبلی به جای ستون فلوروآپاتیت از کروماتوگرافی ستون هیدروکسی‌آپاتیت استفاده شد [26]. به دلیل ماهیت توالی تگ مورد نظر، فیوژن پپتید به یک پپتید بازی تبدیل شد و برای جدا کردن آن از ستون، خاصیت تعویض کاتیونی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین در مطالعه حاضر، به‌منظور تخلیص دقیق‌تر، با اعمال تغییرات اساسی در روش کار اصلی شرکت سازنده، روش تخلیص دو مرحله‌ای برای این تگ پپتیدی توسعه داده شد [12]. از جمله این تغییرات حذف کلرید سدیم از بافر فسفات‌سدیم در مرحله اول تخلیص بود که یکی از موارد نوآوری در این مطالعه است. در مرحله دوم نیز برای جدا کردن فیوژن پپتید از ستون از غلظت ۱۶۰ میلی‌مولار کلرید سدیم استفاده شد و به علت نزدیک بودن این غلظت به شرایط زیستی احتمال اثرات نامطلوب تغییرات ساختار پپتید در اثر غلظت زیاد کلرید سدیم کاهش پیدا کرد و میزان تخلیص نسبت به کار مشابه افزایش قابل توجهی نشان داد [26]. نتایج نشان داد این پپتید با تمایل بالایی به ستون متصل و با خلوص قابل قبولی تخلیص شد که در نهایت بهره‌وری و قدرت تخلیص بالای این روش می‌تواند نویدی برای کاربردهای بالینی و دارویی آن در آینده باشد. در این روش اگرچه افزایش مراحل می‌تواند موجب افزایش هزینه‌ها شود، اما خلوص نهایی پپتید و کاهش مراحل پس از خلوص، می‌تواند نقش مهمی در استفاده کاربردی از آن داشته باشد.

(۴) علاوه بر مزایای ذکر شده در مورد سازه‌های نو ترکیب حاوی تگ، محدودیت‌هایی نیز وجود دارد. مثلاً برای مصارف مختلف، بعد از انجام فرآیند تخلیص، حذف تگ‌ها فرآیندی معمول بوده و موجب پیچیدگی بیشتر و کاهش بازده فرآیند تخلیص می‌شود [11]. همچنین تعداد زیادی از تگ‌ها می‌توانند عملکرد و فعالیت‌های اضافی نامربوط برای پروتئین تخلیص‌شده ایجاد کنند [27]. در این مطالعه به‌علت اینکه یکی از اهداف بعد از فرآیند تخلیص، اتصال این تگ به قسمت هیدروکسی‌آپاتیت موجود در داربست بود، تگ مورد نظر حذف نشده و این موضوع موجب ایجاد نوآوری خلاقانه در طول چند سال اخیر شد.

(۵) در نهایت به‌دلیل کوچک بودن فیوژن پپتید و احتمالاً اثرات ایمنی پایین آن، امکان دارورسانی این پپتید از طریق سیستم گردش خون به استخوان‌ها به‌منظور درمان پوکی استخوان نیز وجود دارد. نمودار

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، در مرحله اول، مراحل کلونینگ ژن با موفقیت انجام شد و نتایج کلونی PCR، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های BamHI و SacI و تعیین توالی نشان داد که توالی مورد نظر به درون وکتور بیانی pET21a(+) به‌درستی ترانسفورم شده بود. در مرحله بعد بیان با بازده بالایی انجام و تایید آن از طریق روش‌های

factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(12):4563-8.

8- Rosa PAJ, Ferreira IF, Azevedo AM, Aires-Barros MR. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *J Chromatogr A*. 2010;1217(16):2296-305.

9- Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Raquel Aires-Barros M. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends Biotechnol*. 2009;27(4):240-7.

10- Fields C, Li P, O'Mahony JJ, Lee GU. Advances in affinity ligand-functionalized nanomaterials for biomagnetic separation. *Biotechnol Bioeng*. 2016;113(1):11-25.

11- Wood DW. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. *Curr Opin Struct Biol*. 2014;26:54-61.

12- Cummings LJ, Snyder MA, Brisack K. Protein chromatography on hydroxyapatite columns. In: Burgess RR, Deutscher MP, editors. *Guide to protein purification*. 2nd Edition. Cambridge: Academic Press; 2009.

13- Snyder MA. Working with a powerful and robust mixed-mode resin for protein purification. *BioProcess Int*. 2011;9(5):50-53.

14- Roy MD, Stanley SK, Amis EJ, Becker ML. Identification of a highly specific hydroxyapatite-binding peptide using phage display. *Adv Mater*. 2008;20(10):1830-6.

15- He F. Laemmli-sds-page. *Bio-protocol*. 2011;1(11):e80.

16- He F. Bradford protein assay. *Bio-protocol*. 2011;1(6):e45.

17- Gagnon P, Frost R, Tunón P, Ogawa T. CHT™ ceramic hydroxyapatite: A new dimension in chromatography of biological molecules [Internet]. Hercules: Bio-Rad Laboratories; 1996 [cited 2018 October 23]. Available from: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/psd/literature/Bulletin_215_6.pdf

18- Kawasaki T. Theory of chromatography on hydroxyapatite columns with small loads: V. determination of the adsorption energy of the ε-amino group of poly-L-lysine and the manner of adsorption of the molecule. *J Chromatogr A*. 1978;157:7-42.

19- Kawasaki T. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *J Chromatogr A*. 1991;544:147-84.

20- Fernandez-Yague MA, Abbah SA, McNamara L, Zeugolis DI, Pandit A, Biggs MJ. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomaterial strategies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;84:1-29.

21- Leach JK, Mooney DJ. Bone engineering by controlled delivery of osteoinductive molecules and cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2004;4(7):1015-27.

22- Santo VE, Gomes ME, Mano JF, Reis RL. Controlled release strategies for bone, cartilage, and osteochondral engineering-Part II: Challenges on the evolution from single to multiple bioactive factor delivery. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19(4):327-52.

23- Suárez-González D, Lee JS, Diggs A, Lu Y, Nemke B, Markel M, et al. Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue engineering scaffolds via designed affinity. *Tissue Eng Part A*. 2013;20(15-16):2077-87.

24- Mouriño V, Cattalini JP, Roether JA, Dubey P, Roy I, Boccaccini AR. Composite polymer-bioceramic scaffolds with drug delivery capability for bone tissue engineering.

SDS-PAGE و وسترن بلات انجام شد. فرآیند تخلیص نیز با استفاده از تغییرات ایجادشده در روش کار شرکت سازنده، کیفیت قابل قبولی داشت. در نهایت آنالیز DLS نشان داد که مخلوط پروتئینی مونودیسپرس بوده و این بیانگر آن است که پروتئین تخلیص شده از خلوص قابل قبولی برخوردار و فاقد هر گونه تجمعات و درگیری با خود است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تأیید شده است. همچنین این مطالعه در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می کنند که هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مینا بحری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیل گر آماری/نگارنده بحث (۳۵٪)، صادق حسن نیا (نویسنده دوم)، تحلیل گر آماری/روش شناس/پژوهشگر اصلی (۳۵٪)، بهاره دبیرمنش (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیل گر آماری (۲۰٪)، همایون حسین زاده (نویسنده چهارم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪).

منابع مالی: منابع مالی پژوهش حاضر از محل اعتبار پژوهشی پایان نامه نویسنده اول و همچنین حمایت های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس است.

منابع

- 1- Bettinger CJ, Weinberg EJ, Kulig KM, Vacanti JP, Wang Y, Borenstein JT, et al. Three-dimensional microfluidic tissue-engineering scaffolds using a flexible biodegradable polymer. *Adv Mater*. 2006;18(2):165-9.
- 2- Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: The road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med*. 2008;2(1):1-13.
- 3- Black CR, Goriainov V, Gibbs D, Kanczler J, Tare RS, Oreffo RO. Bone tissue engineering. *Curr Mol Biol Rep*. 2015;1(3):132-40.
- 4- Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo RO. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. 2016;83:363-82.
- 5- Malik MA, Puleo DA, Bizios R, Doremus RH. Osteoblasts on hydroxyapatite, alumina and bone surfaces in vitro; Morphology during the first 2h of attachment. *Biomaterials*. 1992;13(2):123-8.
- 6- Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater*. 2015;31(4):317-38.
- 7- Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin (ogen) binds growth

novel strategy for the purification of a recombinant protein using ceramic fluorapatite-binding peptides as affinity tags. *J Chromatogr A*. 2014;1339:26-33.

27- Walls D, Loughran ST. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. In: Walls D, Sinéad D, Loughran ST, editors. *Protein chromatography: Methods and protocols*. Totowa: Humana Press; 2011. pp. 151-75.

Expert Opin Drug Deliv. 2013;10(10):1353-65.

25- Zhang H, Migneco F, Lin CY, Hollister SJ. Chemically-conjugated bone morphogenetic protein-2 on three-dimensional polycaprolactone scaffolds stimulates osteogenic activity in bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(11):3441-8.

26- Islam T, Aguilar-Yañez JM, Simental-Martínez J, Ortiz-Alcaraz CI, Rito-Palomares M, Fernandez-Lahore M. A