Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Optimization of the Refolding Process for Recombinant Anti-EGFR Immunotoxin Produced in the *Escherichia coli*

Akbari Bahman[1*]

[1]Dept of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 08 June 2021
Revised: 26 June 2021
Accepted: 21 September 2021

**** Correspondence to:***
Bahman Akbari
Dept of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
Email: ba1389@yahoo.com

A B S T R A C T

Introduction: Overexpression of the EGFR is associated with carcinogenesis, and it is observed in more than 70% of head and neck cancers. The expression of an immunotoxin against EGFR designed as an alternative to full antibody led to the production of aggregated protein in the form of inclusion bodies. This study aimed to investigate the 8M urea and 6M guanidine hydrochloride approaches for obtaining the immunotoxin as the soluble and effective form with correct folding.
Material & Methods: The BL21 (DE3) cells containing the pET28a-huimmunotoxin construct were induced by 1 mM IPTG at 37°C for 24 h, and the amount of expression was checked by SDS-PAGE. This immunotoxin was in the form of inclusion bodies and was solubilized individually in 8 M urea and 6 M guanidine hydrochloride and then purified by Ni-NTA affinity chromatography, which was observed as a single band in SDS-PAGE analysis. To correctly refold the obtained immunotoxin, the purified samples were poured into a dialysis bag, and denaturing agents were removed in a multi-step process called stepwise dialysis. The reactivity assessment of the purified and refold immunotoxin was assessed by ELISA technique using A431 cell lysate.
Findings: The immunotoxin (17 mg/ml) was expressed using the bacteria cells in the form of inclusion bodies. The refolded humanized immunotoxin had a high reactivity with A431 cells, indicating the suitable folding of the purified immunotoxin. The 50% binding activity rates of humanized immunotoxin obtained from urea and guanidine hydrochloride approaches were 0.8 and 1.7 µg/ml, respectively.
Discussion & Conclusion: The results of this study revealed that the urea approach was very effective in solubilizing and proper refolding of immunotoxins that were expressed in bacteria cells as inclusion bodies.

Keywords: Guanidine hydrochloride, Inclusion body, Refolding, Single chain antibody, Urea

➢ **How to cite this paper**

Akbari B. Optimization of the Refolding Process for Recombinant Anti-EGFR Immunotoxin Produced in the *Escherichia coli*. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(5): 63-74.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / ۱۴۰۰، دوره ۲۹، شماره ۵، ۷۴-

بهینه‌سازی فرایند رفولدینگ ایمونوتوکسین ضد گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی تولید شده در باکتری اشریشیاکلای

بهمن اکبری[1*]

[1] گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۸
تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۳۰

نویسنده مسئول:
بهمن اکبری
گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
Email: ba1389@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بیان بیش‌ازحد EGFR با سرطان‌زایی همراه است و در بیش از ۷۰ درصد سرطان‌های سر و گردن دیده می‌شود. بیان ایمونوتوکسین ضد EGFR که به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بادی کامل طراحی‌شده است، به تولید پروتئین تجمع‌یافته موسوم به اینکلوژن‌بادی منجر می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی دو روش اورهٔ ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار برای به دست آوردن ایمونوتوکسین به‌عنوان فرم محلول و با تاشدگی صحیح بود.

مواد و روش ها: سلول‌های BL21 (DE3) حاوی وکتور pET28a-huimmunotoxin توسط ۱ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت القا شد و میزان بیان توسط SDS-PAGE بررسی گردید. ایمونوتوکسین به‌دست‌آمده که به‌صورت اینکلوژن‌بادی بود، جداگانه در اورهٔ ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار حل شد و سپس با کروماتوگرافی Ni-NTA خالص گردید که به‌صورت تک باند در SDS-PAGE دیده شد. برای ریفولد مناسب ایمونوتوکسین به‌دست‌آمده، نمونه‌های حاصل از تخلیص در کیسهٔ دیالیز ریخته و طی یک فرایند چندمرحله‌ای موسوم به stepwise dialysis، عوامل دناتوره‌کننده حذف گردیدند. واکنش‌پذیری ایمونوتوکسین تخلیص‌شدهٔ ریفولدشده توسط تکنیک الایزا با استفاده از لایزت سلولی A431 ارزیابی گشت.

یافته‌ها: ایمونوتوکسین به مقدار 17mg/ml توسط باکتری به‌صورت اینکلوژن‌بادی بیان شد. ایمونوتوکسین انسانی ریفولدشده با سلول‌های A431 واکنش‌پذیری بالایی داشت که نشان‌دهندهٔ تاشدگی مناسب ایمونوتوکسین خالص‌شده بود. فعالیت اتصالی ۵۰ درصد ایمونوتوکسین انسانی‌شدهٔ به‌دست‌آمده از روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید، به‌ترتیب ۰/۸ و ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش اوره، روش مؤثری در محلول‌سازی و ایجاد فولدینگ مناسب در ایمونوتوکسین‌هایی است که در باکتری به‌صورت اینکلوژن‌بادی تولید می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اوره، ایمونوتوکسین، اینکلوژن‌بادی، گوانیدین هیدروکلراید، رفولدینگ

استناد: اکبری، بهمن. بهینه‌سازی فرایند رفولدینگ ایمونوتوکسین ضد گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی تولید شده در باکتری اشریشیاکلای. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۰؛۲۹(۵): ۷۴-۶۳.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

حق‌مؤلف © نویسندگان

ناشر: دانشگاه علوم پزشکی ایلام

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

مقدمه

سرطان‌های جامد ازجمله سرطان‌های کلورکتال، سر و گردن، ریه و سینه از عوامل بزرگ مرگ‌ومیر در دنیا هستند. روش‌های مرسوم درمان این دسته از بیماری‌ها شامل جراحی، شیمی‌درمانی، هورمون‌درمانی، رادیوتراپی و ایمونوتراپی است (۲، ۱). علاوه بر این، روش‌های دیگری نیز وجود دارند که در دو دهۀ اخیر به‌عنوان روش‌های نویدبخش در درمان سرطان ظاهر شده‌اند و تحت عنوان Targeted therapies شناخته می‌شوند (۳). گیرندۀ فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) که به‌طور غیرعادی در اقسام مختلفی از سرطان‌های جامد انسانی به مقدار فراوان بیان می‌گردد، هدف مناسبی برای درمان هدفمند سرطان است (۴). می‌توان با استفاده از ایمونوتوکسین انسانی‌شدۀ ضد این گیرنده، کارایی درمان را بالا برد. تولید ایمونوتوکسین انسانی‌شده در E.coli عمدتاً به‌صورت اینکلوژن‌بادی است؛ درنتیجه، ضرورت یافتن روش مناسبی برای تبدیل اینکلوژن‌بادی تولیدشده به ایمونوتوکسین با فولدینگ مناسب احساس می‌شود که میل اتصال و تمایل بالایی به آنتی‌ژن هدف داشته باشد.

با توسعۀ فناوری پروتئین نوترکیب، بیان ژن‌های خارجی در میزبان‌های سلولی امکان‌پذیر شد. این توانایی به پیشرفت شگرفی در تولید داروهای پروتئینی نوترکیب موسوم به زیست‌داروها منجر گشت. اصطلاح زیست‌دارو، نخستین بار در دهۀ هشتاد میلادی، برای توصیف دسته‌ای از پروتئین‌های دارویی تولیدشده با استفاده از روش‌های نوترکیب استفاده شد. زیست‌دارو تقریباً یک‌سوم داروهای درحال‌توسعه را تشکیل می‌دهد. فناوری DNA نوترکیب سرآغاز عصر جدیدی در علوم دارویی شد. انسولین انسانی اولین زیست‌داروی تولیدشده بود.

اشریشیاکلای اولین میزبان و مهم‌ترین سامانۀ بیانی استفاده‌شده در تولید داروهای نوترکیب است. زمان کوتاه تولید پروتئین خارجی، سادگی کار، دانش وسیع تخمیر و درنهایت، ظرفیت بالای تجمع پروتئین‌های خارجی تا بیش از ۲۰ درصد محتوای پروتئین سلولی، اشریشیاکلای را پرکاربردترین سازوارۀ پروکاریوتی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب کرده است (۵).

علی‌رغم این پتانسیل‌ها، پروتئین‌های نوترکیب مانند ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره‌ای وقتی‌که توسط میزبان باکتریایی بیان شده باشند، تمایل بسیاری به درهم فرورفتن و تشکیل اینکلوژن‌بادی دارند (۵). اگرچه تشکیل اینکلوژن‌بادی نامطلوب به نظر می‌رسد؛ اما تشکیل آن‌ها می‌تواند مزایایی چون مقاومت پروتئین بیان‌شده در برابر تجزیۀ درون‌سلولی و سطوح بیانی بالا تا ۳۰ درصد مجموع پروتئین‌های سلولی را داشته باشد(۶).

ایجاد پروتئین فعال از اینکلوژن‌بادی با استفاده از عوامل دناتوره‌کننده‌ای از قبیل اوره و گوانیدین هیدروکلراید و سپس حذف این عوامل به‌صورت تدریجی امکان‌پذیر است (۹-۷)؛ درنتیجه، اگر یک روش ارزان، کارا و با بازدهی فراوان برای ریفولدینگ اینکلوژن‌بادی ایمونوتوکسین معرفی گردد، تولید آن توسط سیستم باکتریایی گسترش بیشتری خواهد یافت. برای بسیاری از پروتئین‌های دارویی، تشکیل صحیح پیوند دی‌سولفیدی برای داشتن فعالیت زیستی در ساختار فضایی سه‌بعدی ضروری است.

اینکلوژن‌بادی‌ها پروتئین‌های متراکم، کروی و جمع‌شده‌ای هستند که بیشتر در سیتوپلاسم پروکاریوت‌ها به علت بیان بیش‌ازحد پروتئین‌های با منشأ خارجی یا هترولوگ تشکیل می‌شوند (۱۰). پس از تخریب دیوارۀ سلولی، اینکلوژن‌بادی از سایر بقایای سلولی توسط سانتریفوژ جدا می‌شود (۱۱). این تودۀ پروتئینی ناخالص با استفاده از غلظت‌های بالای عوامل دناتوره‌کننده مانند اوره، گوانیدین هیدروکلرید، شوینده‌هایی مانند سدیم دودسیل سولفات و عوامل کاهندۀ اضافی مانند دی‌تیوتریتول حل می‌شود. پروتئین‌های حل‌شده طی حذف همین عوامل، شکل و ساختار خود را به‌دست می‌آورند و فرایند ریفولدینگ رخ می‌دهد (۱۲). تشکیل نادرست پیوندهای دی‌سولفیدی می‌تواند باعث فولدینگ

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / ۱۴۰۰، دوره ۲۹، شماره ۵، ۷۴-

نامناسب پروتئین و تشکیل توده شود و موجب تأثیر منفی بر زیست فعالی پروتئین دارویی گردد. تبدیل اینکلوژن بادی‌های نامحلول و غیرفعال به پروتئین محلول با صورت‌بندی صحیح و زیست فعال چالش اصلی در این موارد است.

بازیابی فراوان محصول از اینکلوژن‌بادی، در فرایندهای پایین‌دستی تولید پروتئین نوترکیب، زمانی محقق خواهد شد که بتوان بازده فرایند ریفولدینگ (تغییر شکل پروتئین از حالت دناتوره به پروتئین با ساختار سوم صحیح) را برای تبدیل حداکثر پروتئین‌های حل‌شده به پروتئین‌های فعال زیستی افزایش داد. فرایند ریفولدینگ پروتئین‌ها موردتوجه صنایع داروسازی است. از اواخر دهۀ ۸۰ میلادی، پژوهش دربارۀ فرایند ریفولدینگ آغاز شد (۱۳-۱۶). در بسیاری از پروتئین‌های دارویی، تشکیل صحیح پیوند دی‌سولفیدی برای داشتن فعالیت زیستی در ساختار فضایی سه‌بعدی ضروری است. تشکیل نادرست این پیوند، سبب فولدینگ نامناسب پروتئین می‌شود و موجب تأثیر منفی بر فعالیت زیستی دارو می‌گردد، به‌ویژه دربارۀ پروتئین‌های بیان‌شده در اشریشیاکلای این امر صادق است (۱۶).

سازوکار ریفولدینگ پروتئین‌ها به‌طور دقیق مشخص نشده است؛ اما به نظر می‌رسد که پروتئین‌ها ابتدا به صورت‌بندی‌ها و ساختارهای واسطی درمی‌آیند و سپس به ساختار طبیعی می‌رسند. صورت‌بندی پروتئین مشخصه‌ای از شکل سه‌بعدی و فعالیت آن است (۱۷). فرایند ریفولدینگ آسان نیست و اغلب نیازمند انجام آزمایش‌هایی همراه با حدس و خطا است (۱۸). مرحلۀ ریفولدینگ مهم‌ترین مرحله برای به‌دست آوردن پروتئینی فعال از نظر زیستی است (۱۱). به علت فعالیت نداشتن ایمونوتوکسین در حالت اینکلوژن‌بادی و نیاز به یافتن روش مناسبی برای تبدیل ایمونوتوکسین‌های تولیدشده به فرم اینکلوژن‌بادی به‌صورت فعال از نظر فعالیت زیستی، هدف از انجام این تحقیق، معرفی و بهینه‌سازی روشی مناسب، کارا و باصرفۀ اقتصادی برای ایجاد فولدینگ و تاخوردگی صحیح در پروتئین‌های نوترکیب مانند ایمونوتوکسین بود که در باکتری E.coli به‌صورت اینکلوژن‌بادی بیان شده‌اند.

مواد و روش ها

الف. کلون و بیان توالی کدکنندۀ ایمونوتوکسین انسانی‌شده در E.coli

به‌منظور کلون و بیان توالی ایمونوتوکسین انسانی‌شدۀ ضد گیرندۀ فاکتور رشد اپیدرمی، از پلاسمید pET-28a و باکتری E.Coil سویۀ BL21-DE3 استفاده شد. وکتور pET-28a که واجد توالی ایمونوتوکسین انسانی‌شدۀ ضد EGFR بود، به درون باکتری E.coli سویۀ BL21-DE3 ترانسفورم گشته در دمای ۳۷ درجۀ سانتی‌گراد در محیط کشت LB حاوی کانامایسین کشت گردید. برای القای بیان پروتئین، ایزوپروپیل دی-تیوگالاکتوپیرانوزید تیوگالاکتوپیرانوزید(IPTG) (Merck, Germany) با غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه شد. به‌منظور یافتن بهترین زمان انکوباسیون پس از القا، انکوباسیون در زمان‌های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶ ساعت و یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجۀ سانتی‌گراد انجام شد و نتایج آن‌ها توسط SDS-PAGE آنالیز گردید.

پس از تأیید بیان ایمونوتوکسین توسط میزبان، تولید ایمونوتوکسین در مقیاس بزرگ (۲۰۰ میلی‌لیتر) انجام شد و کل پلت سلولی حاصل در ۶ میلی‌لیتر بافر لیزکنندۀ سلول 50mM (Merck), EDTA 2 mM (Carol Erba) (Tris-HCl) (pH 8.0) حل گردید؛ سپس محلول سلولی تحت فرایند سونیکاسیون (۲۰ بار، هر بار ۳۰ پالس همراه با ۳۰ ثانیه توقف) قرار گرفت. در ادامه، MgSO4 (Thermo) 20 mM (Sigma-Aldrich), 20µg/ml DNase به محلول سونیکه‌شده اضافه گشت. پس از سونیکه کردن سلول‌ها، محلول حاصل سانتریفیوژ (۲۰۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) شد تا اینکلوژن‌بادی‌ها از پروتئین‌های محلول جدا شوند؛ سپس سوپرناتانت و پلت به‌دست‌آمده توسط SDS-PAGE بررسی شد تا مشخص گردد که ایمونوتوکسین به‌صورت

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

محلول بیان شده یا به‌صورت اینکلوژن‌بادی.

ب. حل کردن ایمونوتوکسین بیان‌شده به‌صورت اینکلوژن‌بادی در محلول اورۀ ۸ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل‌شده و درنهایت، حذف تدریجی اوره از مجاورت ایمونوتوکسین

پس از تأیید بیان شدن ایمونوتوکسین به‌صورت اینکلوژن‌بادی، ابتدا اینکلوژن‌بادی (پلت) حاصل از ۲۰۰ میلی‌لیتر کشت باکتری در ۵ میلی‌لیتر بافر حل‌کنندۀ اینکلوژن‌بادی ریخته شد که محتوی (Merck) NaH2po4(100mM) و Tris-Hcl(10mM) و اورۀ ۸ مولار (Merck) بود؛ سپس با ورتکس کردن، پلت کاملاً در این محلول حل و محلول حاضر به مدت یک شبانه‌روز در یخچال انکوبه گردید؛ پس از آن، با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ناخالصی‌ها حذف شوند؛ سپس سوپرناتانت حاصل برای تخلیص توسط ستون نیکل استفاده گردید، بدین‌صورت که سوپرناتانت به‌آرامی به ستون تخلیص اضافه شد. فراکسیون به‌دست‌آمده از زیر ستون (Flow through) جمع‌آوری و برای بررسی بعدی توسط ژل SDS-PAGE، در دمای °C 4 نگه‌داری گردید؛ سپس دوباره ستون با 17ml بافر رفولدینگ حاوی اورۀ ۸ مولار شسته شد و فراکسیون به‌دست‌آمده از زیر ستون در دمای °C 4 نگه‌داری گردید (First Wash). آنگاه ستون با 17 ml بافر رفولدینگ حاوی ایمیدازول 25 mM برای جدا شدن پروتئین‌هایی که به‌طور غیراختصاصی به ستون چسبیده‌اند، شسته شد(Second Wash) . در انتها، ستون با 5 mlبافر رفولدینگ حاوی ایمیدازول (Elution Buffer) 275 mM برای جدا کردن ایمونوتوکسین‌هایی که از طریق His-tag خود به ستون متصل بودند، شستشو داده شد و محلول حاصل در فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری و در یخچال نگه‌داری گردید.

پس از فرایند تخلیص، ۲۰ میکرولیتر از هریک از نمونه‌های تخلیص‌شدۀ موجود در فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری در چاهک‌های ژل SDS-PAGE ریخته شدند تا وجود ایمونوتوکسین در آن‌ها اثبات شود؛ سپس فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری واجد ایمونوتوکسین درون کیسۀ دیالیز ریخته شدند تا طی یک فرایند چندمرحله‌ای موسوم به روش Stepwise dialysis، به‌تدریج اوره از کیسه خارج گردد، به‌طوری‌که بر فولدینگ ایمونوتوکسین اثر منفی نگذارد، به این صورت که هر ۲۴ ساعت، از میزان اورۀ محلول اطراف کیسۀ دیالیز کاسته شد تا به صفر رسید (0M، 0.5M، 1M، 2M، 3M، 6M). همۀ بافرها pH=8 داشتند.

البته در مرحلۀ 1M، برای ایجاد پیوند دی‌سولفیدی مناسب در ایمونوتوکسین و ایجاد فولد صحیح در آن، علاوه بر بافر رفولدینگ محتوی 1 M urea , (Tris-Hcl(10 mM), NaH2po4(100 mM)، دو مادۀ 400 mM L-Argenin (Merck) و 375 µM (Merck) Oxidized glutathione(GSSG) نیز به محلول خارج از کیسه اضافه شدند؛ سپس فالکون حاوی کیسۀ دیالیز به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه انکوبه گردید. درنهایت، پس از مرحلۀ 0M اوره، بافر درون فالکون حاوی کیسۀ دیالیز دور ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS یک درصد که محتوی {NaH2po4(100 mM)(Merck) و Nacl (137 mM) (Merck) و Kcl (2.7 mM)(Merck) و KH2po4(2 mM)(Merck) } بود، به درون فالکون ریخته و مجموعۀ فوق به مدت یک شبانه‌روز در یخچال انکوبه گردید. در پایان، محلول حاوی ایمونوتوکسین رفولدشده از کیسه خارج و غلظت آن با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد؛ سپس نمونۀ مدنظر در فریزر ۲۰- نگهداری گردید تا از آن در مرحلۀ بعدی برای واکنش الیزا استفاده شود.

ج. حل کردن ایمونوتوکسین بیان‌شده به‌صورت اینکلوژن‌بادی در گوانیدین هیدروکلراید ٦ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل‌شده و درنهایت، حذف تدریجی گوانیدین هیدروکلراید از مجاورت ایمونوتوکسین

پس از تأیید بیان شدن ایمونوتوکسین به‌صورت اینکلوژن‌بادی، ابتدا اینکلوژن‌بادی (پلت) حاصل از ۲۰۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

میلی‌لیتر کشت باکتری در ۵ میلی‌لیتر بافر حل‌کننده ریخته شد که محتوی 6 M guanidine hydrochloride (Merck),200 mM Nacl, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA at pH=8.3 بود؛ سپس با ورتکس کردن، پلت کاملاً در این محلول حل گردید. آنگاه به آن محلول 10 mM mercaptoethanol (Merck) اضافه شد تا فرایند محلول شدن اینکلوژن‌بادی‌ها کامل گردد؛ سپس مجموعهٔ حاضر به مدت ۱ شبانه‌روز در یخچال انکوبه شد. درنهایت، محلول مدنظر سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه) گردید تا هر نوع مادهٔ محلول‌نشده‌ای حذف شود.

پس از سانتریفیوژ، از محلول رویی که حاوی ایمونوتوکسین حل‌شده بود، برای تخلیص در ستون Ni-NTA که حاوی ۲ میلی‌لیتر رزین-نیکل بود، استفاده گردید، به این صورت که این محلول رویی، به درون ستون نیکل ریخته شد. فراکسیون به‌دست‌آمده از زیر ستون (Flow through) جمع‌آوری و برای بررسی توسط SDS-PAGE در دمای 4 C° نگه‌داری گردید؛ سپس دوباره ستون با 17 ml بافر رفولدینگ شسته شد و فراکسیون به‌دست‌آمده از زیر ستون در دمای 4 C° نگه‌داری گردید (First Wash). آنگاه ستون با 17 ml بافر رفولدینگ حاوی ایمیدازول 25 mM برای جدا کردن پروتئین‌هایی شسته شد که به‌طور غیراختصاصی به ستون چسبیده‌اند (Second Wash). در پایان، ستون با 5 ml بافر رفولدینگ حاوی ایمیدازول 275 mM (Elution Buffer) شستشو داده شد تا ایمونوتوکسین‌هایی که از طریق His-tag خود به ستون متصل بودند، جدا و از ستون خارج شوند و در فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری و در یخچال نگه‌داری گردیدند.

پس از فرایند تخلیص، ۲۰ میکرولیتر از هریک از نمونه‌های تخلیص‌شدهٔ موجود در فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری در چاهک‌های ژل SDS-PAGE ریخته شدند تا وجود ایمونوتوکسین در آن‌ها اثبات گردد؛ سپس فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری واجد ایمونوتوکسین درون کیسهٔ دیالیز ریخته شدند تا طی یک فرایند چندمرحله‌ای موسوم به روش Stepwise dialysis، به‌تدریج گوانیدین هیدروکلراید از کیسه خارج شود، به‌طوری‌که بر فولدینگ ایمونوتوکسین اثر منفی نگذارد، به این صورت که هر ۲۴ ساعت، از میزان گوانیدین هیدروکلراید موجود در محلول اطراف کیسهٔ دیالیز کاسته شد تا به صفر رسید (6M، 3M، 2M، 1M، 0.5M، 0M).

البته در مرحلهٔ 1M، برای ایجاد پیوند دی‌سولفیدی مناسب در ایمونوتوکسین و ایجاد فولد صحیح در آن، علاوه بر بافر رفولدینگ (1 M Guanidine hydrochloride، 200 mM Nacl، 100 mM Tris-HCl، 1 mM EDTA at pH 8.3)، دو مادهٔ L-Argenin 400 mM و ۳۷۵ µM Oxidized glutathione(GSSG) به محلول خارج از کیسه اضافه شدند؛ سپس فالکون حاوی کیسهٔ دیالیز به مدت ۱ شبانه‌روز در دمای ۴ درجه انکوبه گردید. درنهایت، پس از مرحلهٔ 0M گوانیدین هیدروکلراید، بافر درون فالکون حاوی کیسهٔ دیالیز دور ریخته شد و ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS یک درصد که محتوی (NaH2po4(100 mM و Nacl (137 mM) و Kcl (2.7 mM) و KH2Po4(2 mM)) بود، به درون فالکون ریخته شد و مجموعهٔ فوق به مدت یک شبانه‌روز در یخچال انکوبه گردید. در پایان، محلول حاوی ایمونوتوکسین رفولدشده از کیسهٔ دیالیز خارج و غلظت ایمونوتوکسین با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد؛ سپس نمونهٔ مدنظر در فریزر نگهداری گردید تا از آن در مرحلهٔ بعدی برای واکنش الیزا استفاده شود.

د. اندازه‌گیری واکنش‌پذیری و اختصاصیت ایمونوتوکسین ریفولدشدهٔ حاصل از روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید با تکنیک الیزای نسبی

میزان میل ترکیبی و واکنش‌پذیری ایمونوتوکسین ریفولدشده از هر دو روش، بر روی سلول‌های توموری A431 که به مقدار فراوانی EGFR را بیان می‌کنند، تعیین گردید، به این ترتیب که ابتدا این سلول‌های توموری در محیط کشت RPMI حاوی پنی‌سیلین/استرپتومایسین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

کشت داده شدند؛ سپس از سلول‌های کشت‌شده به میزان ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت الیزا ریخته شد؛ پس از آن، پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور انکوبه گردید تا سلول‌ها به‌خوبی به کف چاهک‌ها بچسبند و رشد کنند و گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی را در سطح خود به میزان مناسب تولید نمایند؛ سپس همهٔ چاهک‌ها با محلول بلاکینگ (BSA 3%) بلاک گردیدند (انکوباسیون به مدت ۱ ساعت)؛ پس از آن، نمونهٔ ایمونوتوکسین ریفولدشده با روش اورهٔ ۸ مولار و نمونهٔ ایمونوتوکسین ریفولدشده با روش گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار، در رقت‌های مختلف درون آن چاهک‌ها ریخته شد. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، محلول درون چاهک‌ها دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ثانویه (Thermo) اضافه گردید که در اینجا، پروتئین anti-His-Tag کونژوگه آنتی‌بادی ثانویه بود (انکوباسیون به مدت ۱ ساعت). آنگاه محلول درون چاهک‌ها دور ریخته شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا (Thermo) (TMB) اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک متوقف شد و درنهایت، میزان جذب هر چاهک در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. به‌منظور مقایسهٔ میزان میل اتصالی و اختصاصیت آنتی‌بادی رفولدشده با هریک از روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید، از نرم‌افزار Sigma plot vol.14 برای رسم نمودار و محاسبهٔ OD50% استفاده گردید.

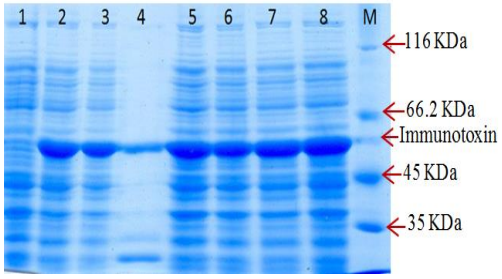
یافته ها

کلون و بیان توالی کدکنندهٔ ایمونوتوکسین تک‌زنجیرهٔ انسانی‌شده در E.coli: وکتور pET-28a که واجد توالی ایمونوتوکسین انسانی‌شدهٔ ضد EGFR بود (شکل شمارهٔ ۱)، به‌خوبی درون باکتری E.Coil سویهٔ BL21-DE3 ترانسفورم شد.

نتیجهٔ کشت باکتری E.Coil سویهٔ BL21-DE3 حامل وکتور واجد ژن ایمونوتوکسین در زمان‌های مختلف ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۶ ساعت و یک شبانه‌روز نشان داد که انکوباسیون به مدت یک شبانه‌روز بهترین نتیجه را در پی دارد (شکل شمارهٔ ۲).

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSYGMGWFRQAPGQGLEAVAGISWRGDSTGYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCAAAAGSTWYGTLYEYDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDYVMGWFRQAPGQG
LEAVAAISRNGLTTRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANSAGTYVSPRSREYDYWGQGTLVTVSSKASGGR
HRQPRGWEQLPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQAHAQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRAASQDLAAIWAG
FYIAGDPALAYGYAQDQEPDAAGRIRNGALLRVYVPASSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLALDAITGPEEEGGRLETIL
GWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGKPPKDEL

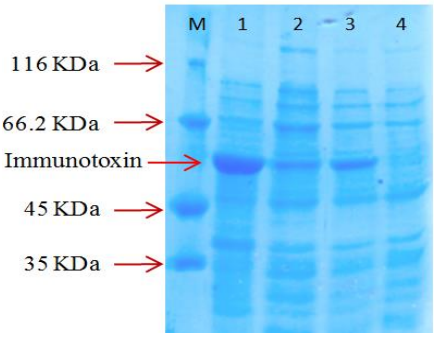
شکل شمارهٔ ۱. توالی ایمونوتوکسین انسانی‌شدهٔ ضد گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی؛ آمینواسیدهای سیاه‌رنگ: توالی نانوبادی‌های انسانی‌شدهٔ ضد گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی؛ آمینواسیدهای آبی‌رنگ: توالی لینکرها؛ آمینواسیدهای قرمزرنگ: توالی اگزوتوکسین A اصلاح‌شدهٔ سودوموناس آئروژینوزا (PE).



شکل شمارهٔ ۲. سنجش بیان ایمونوتوکسین به کمک ژل SDS-PAGE 12% حاصل از کشت باکتری در زمان‌های مختلف؛ ستون ۱. نمونه پیش از القا؛ ستون ۲. نمونه ۲ ساعت پس از القا؛ ستون ۳. نمونه ۴ ساعت پس از القا؛ ستون ۴. نمونهٔ mAb (دارای اندازهٔ مشخص به‌عنوان راهنمای اندازهٔ پروتئین)؛ ستون۵. نمونه ۶ ساعت پس از القا؛ ستون ۶. نمونه ۸ ساعت پس از القا؛ ستون ۷. نمونه ۱۶ ساعت پس از القا؛ ستون ۸. نمونه یک شبانه‌روز پس از القا؛ M: راهنمای اندازهٔ پروتئین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / ۱۴۰۰، دوره ۲۹، شماره ۵، ۷۴-

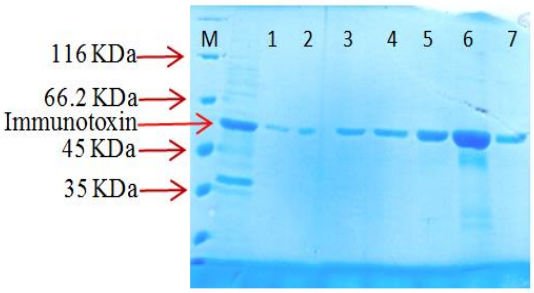


شکل شمارهٔ ۳. سنجش بیان پروتئین نوترکیب به کمک ژل SDS-PAGE 12%؛ ستون ۱. نمونهٔ پلت ۲۴ ساعت پس از القا (القا با 1mM IPTG)؛ ستون ۲. نمونهٔ سوپ ۲۴ ساعت پس از القا (القا با 1mM IPTG)؛ ستون ۳. نمونه ۲۴ ساعت بعد (القا با 1mM IPTG)؛ ستون ۴. نمونه پیش از القا؛ M. راهنمای اندازهٔ پروتئین

پس از انجام SDS-PAGE مشخص شد که ایمونوتوکسین عمدتاً به‌صورت اینکلوژن‌بادی و به مقدار بسیار ناچیز به شکل محلول در باکتری تولیدشده است (شکل شمارهٔ ۳).

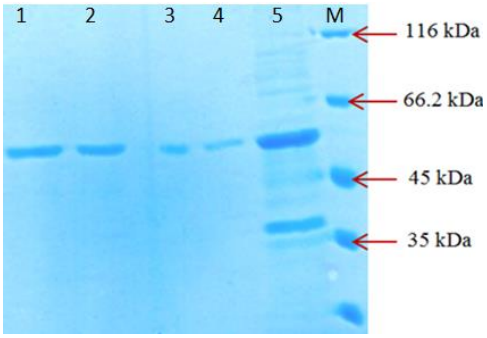
حل کردن ایمونوتوکسین بیان‌شده به‌صورت اینکلوژن‌بادی در محلول اورهٔ ۸ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل‌شده و درنهایت، حذف تدریجی اوره از مجاورت ایمونوتوکسین بدون اثر منفی بر فولدینگ: نتیجهٔ تخلیص در ژل SDS-PAGE 10% ریخته شد تا صحت تخلیص تأیید گردد (شکل شمارهٔ ۴). همان‌طور که در ژل نیز مشاهده می‌شود، ستون نیکل توانسته است ایمونوتوکسین را که برچسب هیستیدینی داشت، به‌خوبی تخلیص کند. در همهٔ فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری حاصل از تخلیص ایمونوتوکسین حل‌شده با روش اورهٔ ۸ مولار، ایمونوتوکسین وجود داشت (شکل شمارهٔ ۴)؛ درنتیجه، همهٔ محتویات تیوب‌های تخلیص ۱ الی ۶ درون کیسهٔ دیالیز ریخته شدند و کار حذف تدریجی مواد دناتوره‌کننده (اورهٔ ۸ مولار) صورت گرفت، به‌طوری‌که فولدینگ مناسب در ایمونوتوکسین ایجاد گردد و دوباره اینکلوژن‌بادی تشکیل نشود. در پایان، محلول درون کیسهٔ دیالیز خارج و به کمک دستگاه نانودراپ، غلظت ایمونوتوکسین حاصل اندازه‌گیری شد که میزان آن 95g/mlµ بود؛ همچنین نمونهٔ خارج‌شده از کیسهٔ دیالیز برای انجام تست الیزا، در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

حل کردن ایمونوتوکسین بیان‌شده به‌صورت اینکلوژن‌بادی در محلول گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار، تخلیص ایمونوتوکسین حل‌شده و درنهایت، حذف تدریجی گوانیدین هیدروکلراید از مجاورت ایمونوتوکسین، بدون اثر منفی بر فولدینگ آن: نتیجهٔ تخلیص در ژل SDS-PAGE 10% لود شد تا صحت تخلیص تأیید گردد (شکل شمارهٔ ۵). در فراکسیون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ حاصل از تخلیص، ایمونوتوکسین محلول‌شده موجود است



شکل شمارهٔ ٤. ژل SDS-PAGE 10٪ نمونه‌های تخلیص شدهٔ ایمونوتوکسین حل‌شده با روش اوره‌ی ۸ مولار؛ ستون ۱. تیوب تخلیص ۱؛ ستون ۲. تیوب تخلیص ۲؛ ستون ۳. تیوب تخلیص ۳؛ ستون ۴. تیوب تخلیص ۴؛ ستون۵. تیوب تخلیص ۵؛ ستون ۶. تیوب تخلیص ۶؛ ستون۷. تیوب تخلیص۷؛ ستون ۸. نمونه پلت محلول‌شده؛ M. راهنمای اندازهٔ پروتئین

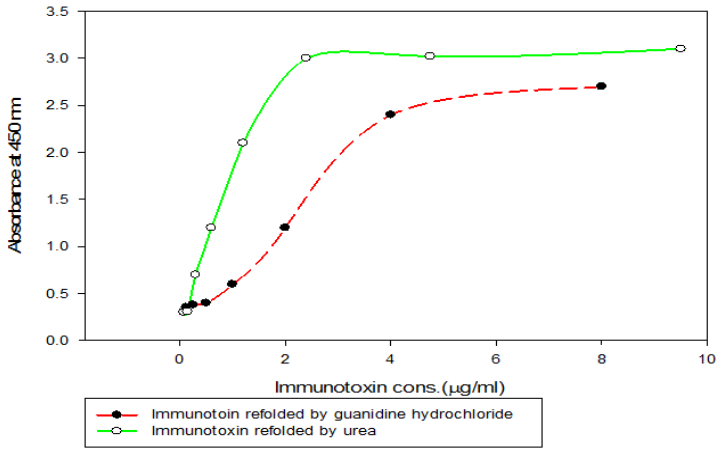
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]



شکل شمارهٔ ۵. ژل تخلیص ایمونوتوکسین حاصل از انحلال اینکلوژن‌بادی بیان‌شده توسط باکتری (BL21(DE3، با روش گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار؛ ستون ۱. فراکسیون تخلیص ۱؛ ستون ۲. فراکسیون تخلیص ۲؛ ستون ۳. فراکسیون تخلیص ۳؛ ستون ۴. فراکسیون تخلیص ۴؛ ستون ۵. نمونه پلت محلول‌شده؛ M. راهنمای اندازهٔ پروتئین

(شکل شمارهٔ ۵)؛ درنتیجه، همهٔ فراکسیون‌های ۱ میلی‌لیتری ۱، ۲، ۳ و ۴ درون کیسهٔ دیالیز ریخته شدند و کار حذف تدریجی عامل دناتوره‌کنندهٔ (گوانیدین هیدروکلراید) صورت گرفت، به‌طوری‌که فولدینگ مناسب در ایمونوتوکسین ایجاد گردد و دوباره اینکلوژن‌بادی تشکیل نشود. در پایان، محلول از درون کیسهٔ دیالیز خارج و به کمک دستگاه نانودراپ (TM 2000, USA)، غلظت ایمونوتوکسین حاصل اندازه‌گیری شد که میزان آن µ۵۵g/ml بود. در مقایسه با مقدار ایمونوتوکسین حل‌شده توسط روش اوره، مقدار کمتری ایمونوتوکسین با روش گوانیدین هیدروکلراید به‌دست آمد (حدود ۶۰ درصد). نمونهٔ خارج‌شده از کیسهٔ دیالیز، برای انجام تست الیزا روی آن در مراحل بعدی، در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

اندازه‌گیری واکنش‌پذیری و اختصاصیت ایمونوتوکسین ریفولدشدهٔ حاصل از اوره و گوانیدین هیدروکلراید با روش الیزای نسبی بر سلول‌های توموری A431: میزان میل اتصالی و واکنش‌پذیری ایمونوتوکسین ریفولدشده با روش‌های اوره و گوانیدین هیدروکلراید بر روی سلول‌های توموری A431 با روش الیزای نسبی صورت گرفت که نتیجهٔ حاصل در شکل شمارهٔ ۶ نشان داده‌شده است. میزان میل اتصالی ایمونوتوکسین حاصل از روش اوره به‌مراتب بهتر و بیشتر از ایمونوتوکسین حاصل از روش گوانیدین هیدروکلراید بود، به‌طوری‌که میزان OD 50% ایمونوتوکسین ریفولدشده با روش اوره و روش گوانیدین هیدروکلراید، به‌ترتیب برابر µ۸/۰g/ml و µ۷/۱g/ml بود. درواقع، میزان میل اتصالی ایمونوتوکسین حاصل از روش اوره در مقایسه با ایمونوتوکسین حاصل از روش گوانیدین هیدروکلراید، حدود دو برابر بیشتر بود.



شکل شمارهٔ ٦. میل اتصالی ایمونوتوکسین ریفولدشده با دو روش اوره و گوانیدین هیدروکلراید روی سلول‌های توموری A431 (تهیه‌شده با نرم‌افزار Sigma plot vol.14)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / ۱۴۰۰، دوره ۲۹، شماره ۵، ۷۴-

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با هدف معرفی و بهینه‌سازی روشی مناسب، کارا و باصرفهٔ اقتصادی برای ایجاد فولدینگ و تاخوردگی صحیح در پروتئین‌های نوترکیب مانند ایمونوتوکسین صورت گرفت که در باکتری E.coli به‌صورت اینکلوژن‌بادی بیان شده‌اند. به علت سهولت کار با سیستم‌های بیانی باکتریایی و میزان بیان بالای پروتئین نوترکیب توسط آن‌ها، این‌گونه میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب غیرگلیکوزیله موردتوجه قرار گرفته‌اند (۲۰، ۱۹). اگرچه سیستم باکتریایی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب غیرگلیکوزیله به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود، تولید محصول فعال به سبب ترشح ناکارآمد محدودشده و بیش از ۹۰ درصد از پروتئین‌های نوترکیب تولیدشده داخل سلول باقی می‌مانند (۲۰). تجمع پروتئین در محیط احیای سیتوپلاسمی باعث ایجاد تجمعات پروتئینی نامحلول موسوم به اینکلوژن‌بادی می‌شود (۱۹). اینکلوژن‌بادی‌ها معمولاً در اثر بیش‌بیانی، تاخوردگی جزئی و ناکارآمد پروتئین نوترکیب و دسترسی نداشتن به چاپرون‌های مولکولی به وجود می‌آیند (۲۲، ۲۱). اینکلوژن‌بادی‌ها از واسطه‌های پروتئینی با فولد ناقص تشکیل می‌شوند و تجمعاتی از پلی‌پپتیدهای یک نوع را در برمی‌گیرند. پروتئین‌های درون تجمعات انکلوژن‌بادی‌ها ساختار ثانویه‌ای مشابه پروتئین اصلی دارند. در بیشتر موارد، حدود ۲۷-۱۵ درصد پروتئین کل به‌صورت پروتئین فعال از نظر بیولوژیکی، از اینکلوژن‌بادی‌ها به‌دست می‌آید و در تولید پروتئین نوترکیب از E.coli موجب هزینهٔ فراوانی می‌شود (۱۱).

تاکنون پروتکل‌های متعددی برای محلول کردن دوبارهٔ اینکلوژن‌بادی‌ها و به‌دست آوردن پروتئین فعال در آزمایشگاه ارائه‌شده است که در اغلب آن‌ها، اینکلوژن‌بادی به‌دست‌آمده در محلول دناتوره‌کننده حل می‌گردد و سپس دوباره ریفولد می‌شود (۲۳، ۱۱). روش‌های مرسوم برای فولدینگ دوبارهٔ پروتئین‌های نوترکیب نامحلول شامل Dialysis یا Dilution در حجم فراوانی از بافر رفولدینگ یا کروماتوگرافی است. داده‌هایی که از مقالات مختلف دربارهٔ افزایش فولدینگ مجدد از اینکلوژن‌بادی به‌دست‌آمده، بیانگر این است که اضافه کردن موادی با وزن مولکولی پایین به کاهش تجمع پروتئین‌ها کمک می‌کند. سورفاکتانت‌ها و دترجنت‌ها می‌توانند به ریفولدینگ دوبارهٔ پروتئین‌ها کمک کنند (۲۴). نتایج الیزای مطالعهٔ ما نیز این موضوع را تأیید کرد که اضافه کردن موادی مانند Oxidized glutathione و آرژنین و استفاده از مواد دترجنت مانند اوره، تریس و سدیم دودسیل سولفات در تسهیل فرایند ریفولدینگ پروتئین نوترکیبی که به‌صورت اینکلوژن‌بادی تولیدشده است، تأثیر مثبتی دارد؛ زیرا محصول نهایی به‌خوبی آنتی‌ژن هدف خود را بر روی سلول هدف شناسایی کرد.

در مطالعهٔ حاضر، از دو روش اورهٔ ۸ مولار و گوانیدین هیدروکلراید ۶ مولار برای محلول‌سازی و ایجاد فولدینگ صحیح ایمونوتوکسین انسانی شده‌ای استفاده گردید که به‌صورت اینکلوژن‌بادی در باکتری E.coli تولیدشده بود.

هرچه میل اتصالی ایمونوتوکسین ایجادشده از یک روش رفولدینگ بیشتر باشد، به این معنی است که ایمونوتوکسین ریفولدشده ساختار و فولد صحیح‌تر دارد؛ درنتیجه می‌توان با تست الیزا، کارایی روش‌های رفولدینگ متفاوت را باهم مقایسه کرد (۲۵). نتایج الیزای ایمونوتوکسین حاصل از فرایند رفولدینگ نشان داد که میزان فعالیت اتصالی ۵۰ درصد ایمونوتوکسین حاصل از روش اوره، ۲ برابر کمتر از ایمونوتوکسین حاصل از روش گوانیدین هیدروکلراید بود. درواقع، این نتایج کارایی بیشتر روش اوره در ایجاد فولدینگ صحیح برای ایمونوتوکسین‌های انسانی‌شده را نشان داد که به‌صورت اینکلوژن‌بادی در میزبان باکتریایی بیان‌شده بودند.

همان‌طور که گفته شد، در مطالعهٔ ما، ایمونوتوکسین به مقدار ۱۷mg/ml در میزبان باکتریایی به‌صورت اینکلوژن‌بادی بیان شد و روش اوره عملکرد خوبی در ایجاد فولدینگ مناسب در این اینکلوژن‌بادی‌ها داشت، به‌طوری‌که میزان میل اتصالی ایمونوتوکسین ریفولدشده با

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

روش اوره تقریباً دو برابر ایمونوتوکسینی بود که با روش گوانیدین ریفولد شده بود. مشابه چنین نتیجه‌ای در چندین مطالعه به‌دست‌آمده است. در یک مطالعه، سان و همکاران در سال ۲۰۱۴ توانستند مقدار فراوانی آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای را که به‌صورت اینکلوژن‌بادی در باکتری بیان شده بود با روش اوره، ریفولد کرده و آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای با افینیتی بالا در مقیاس mg ایجاد کنند (۲۶)؛ همچنین منزز و همکاران در سال ۲۰۱۱، یک آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای ضد اینتیمین (anti-intimin scFv) را طراحی و در باکتری E.coli بیان کردند. ازآنجاکه عمدهٔ پروتئین بیان‌شده به‌صورت اینکلوژن‌بادی بود، این گروه با استفاده از روش اوره توانستند آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای با فولدینگ صحیح و افینیتی بالا را از این اینکلوژن‌بادی‌ها به‌دست آورند(۹).

همچنین پولیمنیدو و همکاران در سال ۲۰۰۸، در مطالعه‌ای برای تولید آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای (POM2 scFv) از روش اوره جهت ریفولد اینکلوژن‌بادی‌هایی استفاده کردند که طی بیان این آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای در باکتری E.coli Rosetta pLysS ایجادشده بود. نتایج نشان داد که آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای ریفولدشده کارایی مناسبی در شناخت آنتی‌ژن هدف خود داشت. اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۷، ایمونوتوکسین ضد گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی را به‌صورت اینکلوژن‌بادی در میزبان باکتریایی بیان نمودند؛ سپس با استفاده از روش اوره و دیالیز مرحله‌به‌مرحله، اینکلوژن‌بادی‌ها را به ایمونوتوکسین فعال تبدیل کردند، به‌طوری‌که نتایج الیزای نسبی نشان از میل اتصالی قابل‌قبول ایمونوتوکسین ریفولدشده در مقایسه با آنتی‌بادی مرجع داشت (۲۷)؛ همچنین اکبری و همکاران در سال ۲۰۱۶، آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای انسانی‌شدهٔ ضد گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمی را که به‌صورت اینکلوژن‌بادی در باکتری بیان شده بود، با روش اوره و دیالیز مرحله‌به‌مرحله ریفولد کردند و آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای با میل اتصالی قابل‌قبول در مقیاس µg را به دست آوردند. در این مطالعه نیز از الیزای نسبی استفاده‌شده بود (۲۸).

در تضاد با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعهٔ ما که روش اوره برای ریفولدینگ اینکلوژن‌بادی مناسب‌تر بود، مطالعاتی وجود دارد که گزارش کرده‌اند روش گوانیدین عملکرد خوبی در ایجاد فولدینگ مناسب در اینکلوژن‌بادی‌های حاصل از بیان پروتئین نوترکیب در باکتری داشته است. بوچنر و همکاران در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که روش گوانیدین هیدروکلراید در ریفولد قطعات Fab آنتی‌بادی‌ها بسیار مؤثر است (۲۹). شاید علت این امر ماهیت متفاوت قطعات Fab آنتی‌بادی با ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای باشد؛ زیرا قطعاتFab بزرگ‌تر هستند و ساختار متفاوتی با ایمونوتوکسین دارند؛ همچنین کیم در سال ۲۰۰۳ گزارش کرده است که ایمونوتوکسینی متشکل از یک آنتی‌بادی تک‌زنجیره‌ای ضد Carcinoembryonic antigen (CEA) و اگزوتوکسین سودوموناس آئروژینوزا را که به‌صورت اینکلوژن‌بادی بیان‌شده بود، با روش گوانیدین هیدروکلراید به‌صورت محلول و فعال به‌دست آورده است، به‌طوری‌که میل اتصالی آن حفظ‌شده بود (۳۰).

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد که در مقایسه با روش گوانیدین هیدروکلراید، روش اوره می‌تواند به‌عنوان روش کارا و مناسبی برای محلول‌سازی و ایجاد فولدینگ صحیح در ایمونوتوکسین و آنتی‌بادی‌های تک‌زنجیره‌ای استفاده شود که به‌صورت اینکلوژن‌بادی در میزبان باکتریایی بیان می‌گردند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات عزیزانی که در نگارش این مقاله همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافعی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.KUMS.REC.1398.568

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]
[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2023-04-01]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1400.29.5.10.0]

[DOI: 10.52547/sjimu.29.5.63]

References

1. Mathew M, Verma RS. Humanized immunotoxins a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. Cancer Sci2009;100:1359-65. doi . 10.1111/j.1349-7006.2009.01192.x
2. Uribe ML, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in cancer signaling mechanisms drugs and acquired resistance. Cancers2021;13:2748. doi.10.3390/cancers13112748
3. Li YM, Hall WA. Targeted toxins in brain tumor therapy. Toxins2010;2:2645-62. doi.10.3390/ toxins2112645
4. Davies RL, Grosse VA, Kucherlapati R, Bothwell M. Genetic analysis of epidermal growth factor action: assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7. Proc NatI Acad Sci1980;77:4188-92. doi. 10.1073/pnas.77.7.4188
5. Mckenna N. Challenges in scale up of antibody production companies overcoming obstacles In production process. Genet Eng2001;21:10.
6. Li M, Su ZG, Janson JC. Invitro protein refolding by chromatographic procedures. Prot Expr Pur2004;33:1-10. doi.10.1016/j.pep.2003.08.023
7. Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, Uchikawa M, Juji T, Kumagai I. Highly efficient recovery of functional single chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in Escherichia coli by controlled introduction of oxidizing reagent application to a human single chain Fv fragment. J Immunol Meth1998;219:119-29. doi.10.1016/ s0022-1759(98)00127-6
8. Sinacola JR, Robinson AS. Rapid refolding and polishing of single chain antibodies from Escherichia coli inclusion bodies. Prot Expr Pur2002;26:301-8. doi.10.1016/s1046-5928(02)00538-7
9. Menezes MA, Aires KA, Ozaki CY, Ruiz RM, Pereira MC, Abreu PA, et al. Cloning approach and functional analysis of anti intimin single chain variable fragment. BMC Res Notes2011;4:1. doi.10.1186/1756-0500-4-30
10. Zettlmeissl G, Rudolph R, Jaenicke R. Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. Biochemistry1979;18 :5567-71. doi.10.1021/bi00592a007
11. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng2005;99:303-10. doi. 10.1263/jbb.99.303
12. Gerami SM, Farajnia S, Mahboudi F, Babaei H. Optimizing refolding condition for recombinant tissue plasminogen activator. Iran J Biotechnol 2011;9:253-9.
13. Goodman M. Market watch sales of biologics to show robust growth through to 2013. Nat Rev Drug Discov2009; 8:837. doi.10.1038/nrd3040
14. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv2009;27:297-306. doi. 10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
15. Bhopale G, Nanda R. Recombinant DNA expression products for human therapeutic use. Curr Sci2005;89:614-22.
16. Zhang L, Chou CP, Mooyoung M. Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by Escherichia coli expression system. Biotechnol Adv2011;29:923-9. doi.10.1016/j. biotechadv.2011.07.013
17. Walsh G. Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. Trend Biotechnol2005;23:553-8. doi.10.1016/j.tibtech.2005.07.005
18. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Prot Exp Pur2003;28:1-8. doi.10.1016/s1046-5928(02)00641-1
19. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv antibody: principles and clinical application. Clin Dev Immunol2012;2012. doi.10.1155/2012/980250
20. Weisser NE, Hall JC. Applications of single chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. Biotechnol Adv2009;27:502-20. doi.10.1016/j.biotechadv.2009.04.004
21. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol2004;22:1399-408. doi.10.1038/nbt1029.
22. Villaverde A, Carrio MM. Protein aggregation in recombinant bacteria biological role of inclusion bodies. Biotechnol let2003;25:1385-95. doi.10. 1023/a:1025024104862
23. Yang Z, Zhang L, Zhang Y, Zhang T, Feng Y, Lu X, et al. Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two step denaturing and refolding method. PLos One2011;6:22981. doi.10.1371/journal.pone.0022981
24. Oganesyan N, Kim SH, Kim R. On column chemical refolding of proteins. Pharmacogenomics 2004;4:22-5.
25. Goldstein NI, Giorgio NA, Jones ST, Saldanha JW. Humanized anti EGF receptor monoclonal antibody. Patents; 20062:231-6.
26. Sun H, Wu G, Chen Y, Tian Y, Yue Y, Zhang G. Expression production and renaturation of a functional single chain variable antibody fragment against human ICAM1. Braz J. Med Biol Res2014;47:540-7. doi.10.1590/1414-431x20143276
27. Akbari B, Farajnia S, Zarghami N, Mahdieh N, Rahmati M, Khosroshahi SA, et al. Construction expression and activity of a novel immunotoxin comprising a humanized antiepidermal growth factor receptor scFv and modified Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Antican Drug2017;28:263-70. doi. 10.1097/CAD.0000000000000452
28. Akbari B, Farajnia S, Zarghami N, Mahdieh N, Rahmati M, Khosroshahi SA, et al. Design expression and evaluation of a novel humanized single chain antibody against epidermal growth factor receptor. Prot Exp Pur2016;127:8-15. doi.10.1016/j.pep.2016.06.001
29. Buchner J, Rudolph R. Renaturation, purification and characterization of recombinant F ab-fragments produced in Escherichia coli. Biotechnology 1991;9(2):157-62. doi.10.1038/nbt0291-157
30. Kim SH. Expression and purification of recombinant immunotoxin a fusion protein stabilizes a single chain Fv in denaturing condition. Prot Exp Pur2003;27:85-9. doi. 10.1016/s1046-5928(02)00539