

Cloning, Expression, and Purification of α , βa , and βb Subunits of Human Inhibin Protein in *Escherichia coli*

Mohammad Ataei^{1*}, Elaheh Motevaseli^{2*}, Mohammad Hossein Modarressi², Esmail Sadroddiny¹, Gholamreza Tavoosidana²

¹Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

²Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Elaheh Motevaseli;

²Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
mataei3@gmail.com

Received: 9 Jul, 2017

Accepted: 29 Aug, 2017

Abstract

Background and Objectives: Inhibin is a glycoprotein hormone commonly found in the circulation, but its level increases in some diseases, and its measurement by serological method using anti-inhibin monoclonal antibodies, can help in diagnosis of some genetic diseases. This study was performed with the objective of cloning, expression, and purification of α , βa , and βb subunits of human inhibin protein in *Escherichia coli*.

Methods: For each Inhibin subunit gene, a primer pair was designed. Then, the gene sequence of each of the subunits, was obtained from human genomic DNA using polymerase chain reaction (PCR) method, and then was cloned into pET22b vector after enzymatic digestion. Recombinant vector associated with each subunit, was transferred to the host cell *E. coli* (strain BL21). The transformed cells were cultured in LB culture medium containing ampicillin, and positive colonies were isolated for mass production of recombinant protein. After mass culture and induction of transformed strains by isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), the produced recombinant protein, was isolated using nickel column chromatography.

Results: The inhibin hormone subunit genes, was correctly cloned in pET22b vector and its expression in *E. coli*, was considerably high. The results of the expression of inhibin hormone also showed that in the absence of codon optimization, the inhibin expression in the prokaryote host increases significantly. The protein subunits α , βa , and βb of inhibin hormone, were purified, respectively, with molecular weights of 13.7, 12, and 12 kDa.

Conclusion: protein subunits of inhibin hormone, can be expressed in the prokaryotic host due to their small size, short gene sequence, and minor post-transcriptional modifications.

Keywords: Inhibins; Recombinant proteins; *Escherichia coli*.

کلونینگ، بیان و خالص سازی زیرواحدهای α ، βa و βb پروتئین اینهبین انسانی در اشرشیاکلی

محمد عطائی^۱، الهه متوسلی^{۲*}، محمدحسین مدرسی^۲، اسماعیل صدرالدینی^۱، غلامرضا طاوسی دانا^۲

چکیده

زمینه و هدف: اینهبین، یک هورمون گلیکوپروتئینی است که به طور معمول در گردش خون وجود دارد، اما در برخی بیماری‌ها میزان آن افزایش می‌یابد و اندازه گیری آن به روش سرولوژی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه آن نیز می‌تواند به تشخیص برخی بیماری‌های ژنتیکی کمک کند. این مطالعه با هدف کلونینگ، بیان و خالص سازی زیرواحدهای α ، βa و βb پروتئین اینهبین انسانی در اشرشیاکلی انجام شد.

روش بررسی: برای ژن هر کدام از زیرواحدهای اینهبین، یک جفت پرایمر طراحی گردید، سپس توالی ژنی هریک از زیرواحدهای اینهبین به روش PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) از DNA (دزوکسی ریبونوکلوئید اسید) ژنومی انسان به دست آمد و پس از هضم آنزیمی در وکتور pET22b کلون شد. وکتور نو ترکیب مربوط به هریک از زیرواحدها، به میزبان اشرشیاکلی (سویه BL21) انتقال یافت. سلول‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند، سپس کلنی‌های مثبت جهت تولید انبوه پروتئین نو ترکیب جداسازی گردید. پس از کشت انبوه و القای سویه‌های ترانسفورم شده با IPTG (ایزوپروپیل بتا دی تیو گالاکتوپیرانوزید)، پروتئین نو ترکیب تولید شده به کمک روش کروماتوگرافی میل ترکیبی ستون نیکل جداسازی شد.

یافته‌ها: ژن زیرواحدهای هورمون اینهبین به درستی در وکتور pET22b کلون و بیان آن در اشرشیاکلی، به طور قابل ملاحظه‌ای بالا بود. نتایج حاصل از بیان هورمون اینهبین نشان داد در صورت عدم انجام بهینه سازی کدونی، بیان اینهبین در میزبان پروکاریوت به طور قابل توجهی بالا می‌رود. زیرواحدهای پروتئینی α ، βa و βb هورمون اینهبین به ترتیب با اوزان مولکولی ۱۳/۷، ۱۲ و ۱۲ کیلودالتون خالص سازی شدند.

نتیجه گیری: زیرواحدهای پروتئینی هورمون اینهبین به دلیل اندازه کوچک و توالی کوتاه ژن، همچنین تغییرات بعد از ترجمه‌ای اندک، در میزبان پروکاریوتی قابل بیان هستند.

کلید واژه‌ها: اینهبین‌ها؛ پروتئین‌های نو ترکیب؛ اشرشیاکلی.

^۱دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

^۲گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

الهه متوسلی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

mataei3@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۷

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Ataei M, Motevaseli E, Hossein Modarressi M, Sadroddiny E, Tavoosidana Gh. Cloning, expression, and purification of α , βa , and βb subunits of human inhibin protein in *Escherichia coli*. Qom Univ Med Sci J 2018;12(5):44-52. [Full Text in Persian]

مقدمه

اینهیین، یک هورمون گلیکوپروتئینی است که در مردان از سلول‌های سرتولی بیضه و در زنان از جفت، جسم زرد، گنادها و غده هیپوفیز، تولید و ترشح می‌شود. مهم‌ترین عملکرد فیزیولوژیکی این پروتئین، مهار تولید هورمون محرک فولیکولی (FSH) به‌طور پسنورد از غده هیپوفیز است (۱-۳). همه اینهیین‌ها، کمپلکس‌های پروتئینی دایمری هستند و در ساختار آنها سه زیرواحد پروتئینی α ، βa و βb دیده می‌شود (۱). از کنار هم قرار گرفتن این زیرواحدها، اینهیین A (α و βa) و اینهیین B (α و βb) به‌صورت دایمر تشکیل می‌گردد. mRNA زیرواحد α دارای دو اگزون، βa و βb به‌ترتیب ۲ و ۳ اگزون دارند که طی فرآیند پردازش، اینترون‌ها حذف شده و در نهایت، صرف‌نظر از مناطق ۵'، ۳' UTR و poly A، یک ناحیه CDS (توالی کدکننده) که در واقع کدکننده زنجیره پلی‌پپتید است باقی می‌ماند. ژن زیرواحد α و βa به‌ترتیب در ناحیه q35 و q14.2 کروموزوم ۲ و ژن زیرواحد βb نیز در ناحیه p14.1 کروموزوم ۷ قرار گرفته است.

mRNA زیرواحدها پس از ترجمه به‌صورت پیش‌سازهای درآمده که به‌صورت دایمر با پیوند دی‌سولفیدی به‌هم متصل می‌شوند؛ بدین ترتیب که ابتدا زیرواحد α به‌صورت یک پیش‌ساز ۳۶۶ اسیدآمینهای ساخته می‌شود، سپس با پیش‌ساز زیرواحد β (a یا b) از طریق یک باند دی‌سولفیدی به‌هم متصل می‌شوند. هرکدام از پیش‌سازها متشکل از نواحی sig-peptide، propeptide، ناحیه N-terminal و ناحیه C-terminal می‌باشند. ناحیه N-terminal فقط در پیش‌ساز زیرواحد α دیده می‌شود و ناحیه C-terminal نیز همان زنجیره اصلی موجود در فرم دایمر پروتئین است. این نواحی به‌وسیله مناطقی به‌نام Cleavage Site از هم جدا می‌شوند (۴). این جایگاه در واقع فاصله بین دو اسید آمینه بوده که در آن زنجیره پیش‌ساز شکسته می‌شود. در ساختار زیرواحدهای α ، βa و βb به ترتیب ۴، ۵ و ۵ باند دی‌سولفید وجود دارد که یکی از آنها دارای نقش Interchain بوده و در اتصال دو زیرواحد و تشکیل فرم دایمر، نقشی اساسی ایفا می‌کند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات آمینواسیدی و تغییرات پس از ترجمه زیرواحدهای اینهیین

Signal Peptide (aa)		Propeptide (Aa)	N-ter (aa)	C-ter (aa)	Cleavage site	S-S count	M/W (KDa)	Glycosylation
α	18	43	171	134	61-62 232-233	4	18	3
βa	20	290	—	116	20-21 310-311	5	14	1
βb	28	264	—	115	28-29 292-293	5	14	1

سطح سرمی اینهیین در بسیاری از ناهنجاری‌های کروموزومی و بیماری‌های ژنتیکی، از قبیل سندرم داون و سرطان تخمدان به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. سنجش میزان اینهیین به کمک آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این زیرواحدها، روشی مؤثر در تشخیص این بیماری‌ها می‌باشد (۷، ۸). یکی از روش‌های تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این هورمون، تکنیک هیبریدوما است. به‌دست آوردن آنتی‌بادی مونوکلونال با این روش، نیازمند مقادیر زیادی از این پروتئین جهت تزریق به موش نیز می‌باشد. از طرفی، به‌دلیل شباهت‌های زیاد این هورمون در انسان و موش، مقدار تزریق‌شده باید به اندازه‌ای باشد که بتواند سیستم ایمنی جانور را تحریک کند. تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه این هورمون نیز نیازمند زیرواحدهای پروتئینی خالص است (۴).

در زنان، میزان غلظت اینهیین A در طول دوره بارداری افزایش می‌یابد و می‌توان استنباط کرد این هورمون از جفت و جنین تولید می‌شود و تقریباً در هفته‌های ۸-۶، افزایش آن را به‌خوبی می‌توان مشاهده کرد؛ از این‌رو جهت بررسی میزان اثربخشی و موفقیت IVF استفاده می‌شود (۵). نکته قابل‌توجه اینکه در زنان دارای جنین چند قلو، میزان اینهیین A به‌طور قابل‌توجهی نسبت به جنین تک‌قلو افزایش می‌یابد (۶). در روش انتقال جنین، به‌علت اینکه تعدادی از زیگوت‌ها در همان ابتدای بارداری از بین می‌روند و این موضوع با روش‌های سونوگرافی و βhCG قابل‌شناسایی نبوده و تنها با اندازه‌گیری اینهیین A می‌توان به سلامت جنین پی برد؛ بنابراین اینهیین A یک مارکر عالی برای مانیتورینگ IVF محسوب می‌شود (۵).

از آنجایی که جداسازی و تخلیص این زیرواحدها از سرم بسیار پرهزینه و ناکارآمد است (۹)، لذا استفاده از تکنیک کلونینگ و بیان پروتئین نو ترکیب می تواند روشی مؤثر برای تهیه زیرواحدهای پروتئینی این هورمون باشد (۱۰). این مطالعه با هدف کلونینگ، بیان و تخلیص زیرواحدهای پروتئینی هورمون اینهیین انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه، توالی کدکننده نواحی مورد نظر هریک از زیرواحدها، از بانک اطلاعاتی استخراج و برای هر کدام یک جفت پرایمر طراحی گردید. توالی کدکننده فقط شامل یک اگزون بود که در نتیجه برای تکثیر آن از DNA ژنومی استفاده شد (۱۱).

جایگاه آنزیم های محدود کننده EcoRI و XhoI به ترتیب در ۳' و ۵' پرایمرها با استفاده از نرم افزار SnapGene V2.3 طراحی شدند. در انتهای ۵' هریک از پرایمرها قبل از توالی مربوط به سایت آنزیمی، سه نوکلئوتید جهت اتصال صحیح آنزیم به رشته الیگونوکلئوتید اضافه شد. طول پرایمرهای طراحی شده بین ۲۷-۳۰ نوکلئوتید بود و هریک از پرایمرها با استفاده از نرم افزار Oligo V12.0 از نظر وجود پرایمر دایمر و لوپ بررسی شدند. در تمامی پرایمرها لوپ هایی وجود داشت که دمای تشکیل آنها کمتر از دمای مرحله اتصال بود، سپس برای جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از پایگاه اطلاعاتی بیوتکنولوژی (NCBI)، بلاست انجام گرفت و اختصاصیت آنها تأیید گردید، پس از تأیید صحت پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: لیست و جزئیات پرایمرهای طراحی شده

جهت	طول (نوکلئوتید)	باز اضافه	آنزیم محدود کننده	سایت برش	سایت اتصال پرایمر	نام پرایمر	ژن
F	۳۰	CGC	EcoRI	GAATTC	TCAACTCCCCTGATGTCCTGG	E1/A	INHA
R	۳۰	CCG	XhoI	CTCGAG	GATACAAGCACAGTGCTGCGT	X1/A	INHA
F	۳۰	CGC	EcoRI	GAATTC	GGCTTGGAGTGTGATGGCAAG	E1/BA	INHBa
R	۳۰	CCG	XhoI	CTCGAG	TGAGCACCCACACTCCTCCAC	X1/BA	INHBa
F	۲۷	CGC	EcoRI	GAATTC	GGCCTGGAGTGCGATGGC	E1/BB	INHBb
R	۲۹	CCG	XhoI	CTCGAG	GGAGCAGCCGCACTCCTCCA	X1/BB	INHBb

واکنش PCR برای ژن هریک از زیرواحدها به صورت جداگانه انجام گرفت و محصول هر واکنش پس از تفکیک روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت استخراج از ژل تخلیص شد. هضم آنزیمی محصول PCR هریک از ژن ها، همچنین وکتور pET22b به وسیله آنزیم های محدود کننده EcoRI و XhoI انجام شد و واکنش لیگاسیون با نسبت ۳:۱ اینسرت/ وکتور با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase طبق پروتکل کارخانه صورت گرفت و پلاسمیدهای نو ترکیب pET22b-INHA، pET22b-INHBa و pET22b-INHBb به دست آمد.

در ادامه، کشت سلولی از اشرشیا کلی (سویه BL21) تهیه گردید، سپس به ۵۰ میلی لیتر محیط LB Broth منتقل و مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار (با دور ۲۵۰rpm) انکوبه شد.

پس از رسیدن به $OD_{600}=0.4$ ، به کمک سانتریفوژ (با ۲۷۰۰ دور در دقیقه) رسوب سلولی جدا شد. سلول های مستعد با استفاده از ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلرید تهیه گردید، سپس پلاسمیدهای نو ترکیب با کمک شوک حرارتی به سلول های مستعد ترانسفورم شدند. سلول های ترانسفورم شده روی محیط LB agar حاوی آمپی سیلین کشت داده شده و در مراحل بعدی کلنی های ترانسفورم شده از نظر وجود پلاسمید نو ترکیب غربالگری شدند. از کلنی های حاصل روی محیط کشت LB agar حاوی آمپی سیلین، ۷ کلنی انتخاب و روی آنها Colony PCR انجام گرفت. در این مرحله کلنی های انتخاب شده از نظر اندازه، متوسط بودند و بیشترین فاصله را از هم داشتند. در این فرآیند از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator طراحی شده روی وکتور استفاده گردید (۱۲).

در مرحله بعد، از سلول‌های ترانسفورم شده با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، پلاسمیدهای نو ترکیب استخراج و با استفاده از دو آنزیم محدود کننده EcoRI و XhoI، هضم دوگانه آنزیمی در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت، سپس محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ برده شد. پس از تفکیک روی ژل برای هر کدام از نمونه‌ها دو باند به دست آمد که به ترتیب قطعه بزرگتر مربوط به پلاسمید خطی و قطعه کوچکتر مربوط به اینسرت بود. پلاسمیدهای نو ترکیب تکثیر یافته در سلول‌های ترانسفورم استخراج و برای تعیین توالی به شرکت سیناکلون فرستاده شدند که پس از توالی‌یابی، وجود اینسرت در آن مورد تأیید قرار گرفت.

سلول‌های ترانسفورم شده (بیان کننده هریک از زیرواحدهای اینهیین)، در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth به طور جداگانه کشت داده شده و در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. پس از رسیدن به $OD_{600}=0.4$ با IPTG (1Mm) القا شدند، سپس نمونه‌های ۲ میلی‌لیتری در ساعت‌های ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القا، از نمونه اصلی تهیه و پس از سونیکاسیون از نظر بیان پروتئین نو ترکیب روی ژل SDS-PAGE 15٪ بررسی شدند.

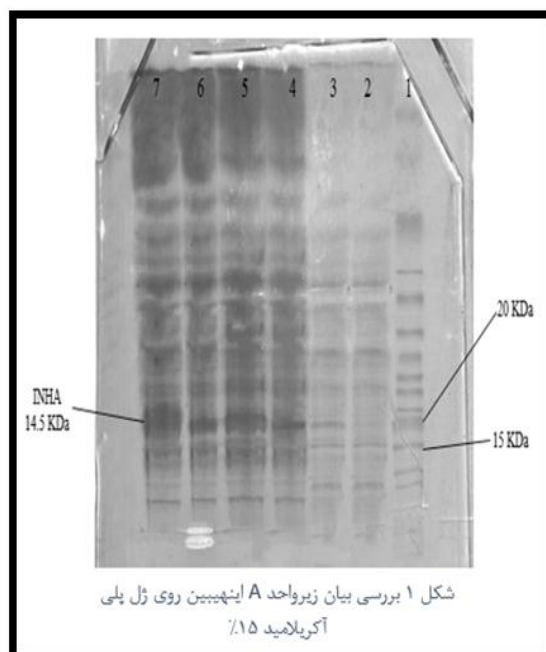
پس از بررسی نمونه‌های ترانسفورم شده از نظر بیان پروتئین نو ترکیب، بهترین نمونه انتخاب و در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB Broth کشت داده شد و ۱۶ ساعت انکوبه گردید، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از نمونه اول به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع اضافه و در انکوباتور شیکردار (با دور ۲۵۰rpm) انکوبه شد. پس از رسیدن به $OD_{600}=0.4$ با IPTG (1Mm) القا و یک Overnight انکوبه گردید، سپس توده سلولی به وسیله سانتریفوژ (با دور ۲۷۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) تهیه شد. زیرواحدهای پروتئینی با استفاده از روش کروماتوگرافی میل ترکیبی Ni-NTI طبق پروتکل کارخانه، استخراج و تخلیص شدند. در ادامه، پس از بررسی نمونه‌ها و تفکیک آنها در ژل پلی‌آکرلامید، باندهای پروتئینی به غشای PVDF منتقل شدند (۱۳)؛ که بدین منظور از بافر انتقال (بیس - تریس، متانول و گلیسین) استفاده شد، سپس غشا در محلول بلوکه کننده (شیر ۳٪ چربی) قرار گرفت و به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار (با دور ۱۰۰rpm) انکوبه شد.

در مرحله بعد، His-Tag آنتی‌بادی موشی به آن اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور (با دور ۱۰۰rpm) قرار داده شد. پس از این مراحل، آنتی‌بادی ثانویه به نمونه افزوده شد. پس از گذشت یک ساعت انکوباسیون (در نتیجه واکنش H_2O_2 و دی‌آمینوبنزدین)، باندهای پروتئینی ظاهر شدند (۱۴).

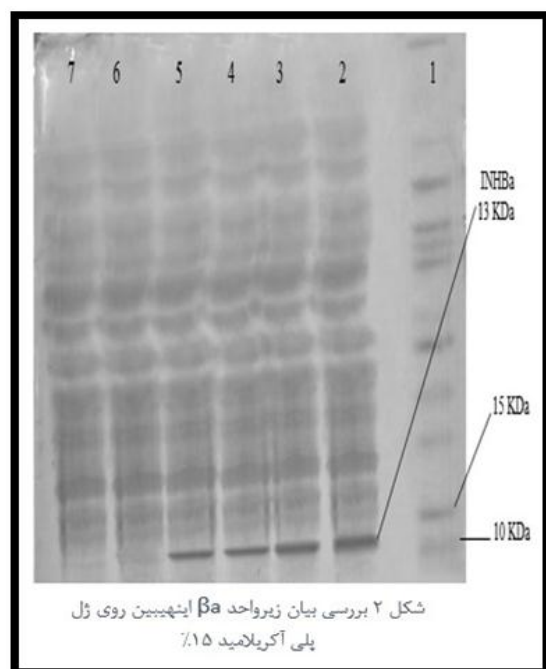
توده سلولی حاصل، از ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تهیه گردید و به آن ۲۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده اضافه و به خوبی پیتاژ شد. طی یک برنامه سونیکاسیون ۶ مرحله‌ای، نمونه‌ها روی یخ سونیکه شدند. مایع رویی نمونه‌ها با استفاده از سانتریفوژ (با دور ۱۲۰۰۰rpm) جمع‌آوری شد، سپس ۲۰ میلی‌گرم از بیدهای نیکل به نمونه اضافه و پس از یک ساعت قرار گرفتن در دمای ۴ درجه، سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. مراحل شست‌وشو با بافر شست‌وشو، ۳ مرتبه تکرار گردید و در نهایت، به رسوب حاصل از آخرین مرحله شست‌وشو، ۳۰۰ میکرولیتر بافر الوشن افزوده و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه در شیکر قرار گرفت، سپس نمونه‌ها (با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه) سانتریفوژ شدند. مایع رویی (حاوی زیرواحدهای پروتئینی نو ترکیب) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۵).

یافته‌ها

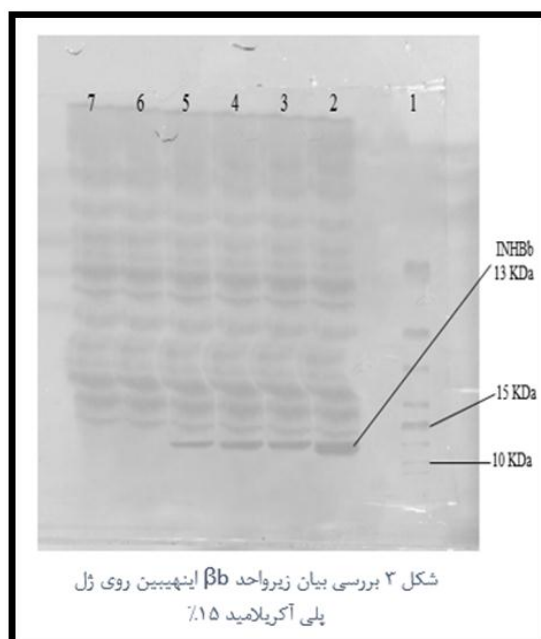
نتایج حاصل از PCR ژن زیرواحدهای اینهیین نشان داد تکثیر این ژن در دمای ۶۳ و ۶۴ درجه به خوبی انجام شده است و این دمای بالا می‌تواند به علت وجود لوپ در ساختار پرایمرها باشد. همچنین تخلیص فرآورده PCR ژن زیرواحدهای اینهیین با کیت استخراج از ژل به درستی انجام گرفت و باندهای ۴۱۲، ۳۶۳ و ۳۶۰ کیلوپازی به ترتیب مربوط به زیرواحدهای α ، β a و β b به دست آمد. تأیید فرآیند کلونینگ به روش هضم دوگانه آنزیمی با آنزیم‌های EcoRI و XhoI به درستی صورت گرفت که در این فرآیند قطعه بزرگتر مربوط به پلاسمید خطی شده و قطعه کوچکتر مربوط به اینسرت بود. شکل شماره ۱، ۲ و ۳ به ترتیب نشان‌دهنده بررسی بیان زیرواحدهای α ، β a و β b اینهیین در روش SDS-PAGE می‌باشند.



شکل شماره ۱: بررسی بیان زیرواحد α اینهیبین روی ژل پلی آکریلامید ۱۵٪.
به ترتیب از راست به چپ: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۲ نمونه کنترل منفی و ستون های ۳-۷ نمونه های القاشده با PTG(1Mm) در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ بعد از القا می باشد



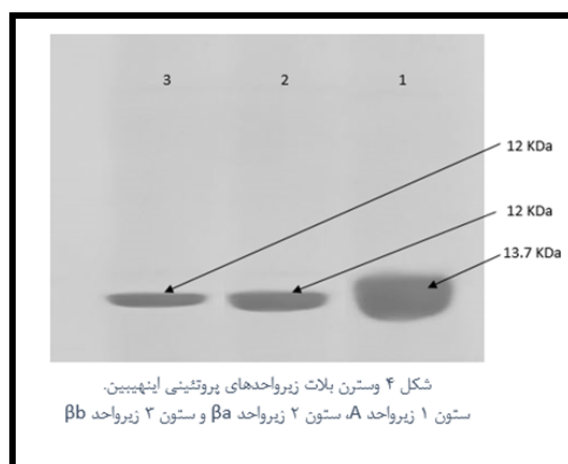
شکل شماره ۲: نتایج بررسی بیان زیرواحد βa روی ژل پلی آکریلامید ۱۵٪.
به ترتیب از راست به چپ: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۲ نشان دهنده نمونه کنترل منفی و ستون های ۳-۷ بیان پروتئین نو ترکیب را پس از القای با PTG(1Mm) به ترتیب در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القا نشان می دهد



شکل شماره ۳: بیان زیر واحد β b اینهیبین روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪.

به ترتیب: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۷ نمونه کنترل منفی و ستون های ۶-۲ بیان پروتئین نوترکیب در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القای با IPTG(1Mm) را نشان می دهد

همان طور که در این شکل ها مشاهده می شود، زیرواحدهای اینهیبین به ترتیب با اوزان مولکولی ۱۴/۷، ۱۳ و ۱۳ کیلو دالتون بیان شده اند.



شکل شماره ۴: بیان زیر واحد β b اینهیبین روی ژل پلی آکرلامید ۱۵٪.

به ترتیب: ستون ۱ نشانگر پروتئینی، ستون ۷ نمونه کنترل منفی و ستون های ۶-۲ بیان پروتئین نوترکیب در ساعات ۲، ۴، ۶، ۱۰ و ۱۶ پس از القا با PTG (1Mm) را نشان می دهد

بحث

امروزه، هورمون اینهیبین به عنوان مارکری در تشخیص بیماری های ژنتیکی و ناهنجاری های جنینی شناخته شده است (۱۶)، و سنجش دقیق آن در تشخیص بسیاری از این بیماری ها نقش مؤثری دارد (۱۷).

در بررسی بیان زیرواحدهای اینهیبین به روش وسترن بلات باندهای پروتئینی زیرواحدهای اینهیبین روی غشای PVDF قابل ردیابی هستند (شکل شماره ۴).

پروتئین کامل اینهبین دارای ۲ جایگاه گلیکوزیل و ۱ پیوند دی سولفیدی است، ولی به نظر می رسد با توجه به مطالعات گذشته، وجود یا عدم وجود این موارد در ساخت آنتی بادی تأثیری نداشته و می توان از میزبان های پروکاریوتی نیز به این منظور استفاده کرد. در مطالعه حاضر، قطعات ۱۳۴، ۱۱۶ و ۱۱۵ آمینواسیدی به ترتیب برای زیرواحدهای α ، βa و βb جهت کلونینگ در نظر گرفته شدند و پس از کلون سازی در/شرشیاکلی، تولید و تخلیص شدند. در این طرح از میزبان /شرشیاکلی (سویه BL21) استفاده گردید که رشد سریعی داشته و می تواند مقادیر زیادی پروتئین نو ترکیب تولید کند (۱۹). همچنین با استفاده از وکتور pET22b به عنوان وکتور بیانی، توالی ژنی کد کننده هریک از زیرواحدهای پروتئین اینهبین در آن کلون شد. مقادیر پروتئین نو ترکیب تولید شده در این طرح به طور قابل توجهی زیاد بود و محصول آن توانست در مطالعات دیگر برای ساخت آنتی بادی مونوکلونال استفاده گردد.

نتیجه گیری

هورمون اینهبین با وجود داشتن ساختار گلیکوپروتئینی و باندهای دی سولفیدی، در میزبان پروکاریوتی قابل تولید است و با توجه به نتایج، /شرشیاکلی (سویه BL21)، میزبان مناسبی برای کلونینگ و تولید هورمون اینهبین نو ترکیب می باشد. به این ترتیب هورمون اینهبین نو ترکیب تولید شده در این فرآیند به دلیل داشتن نواحی آنتی ژنیک هورمون بالغ، کاربردهای فراوانی جهت ساخت آنتی بادی مونوکلونال علیه اینهبین خواهد داشت. همچنین کلون سازی هریک از زیرواحدهای اینهبین در میزبان مجزا، امکان تخلیص هریک از آنها را به طور خالص فراهم کرده که این امر جهت ساخت آنتی بادی اختصاصی مناسب تر خواهد بود.

مهم ترین بیماری مرتبط با اینهبین، سندرم داون است؛ به طوری که سطح سرمی آن در مادران با جنین مبتلا، افزایش معنی داری نشان می دهد. اندازه گیری اینهبین در کنار سایر هورمون ها؛ از قبیل آلفا فیتوپروتئین، گنادوتروپین جفتی و استروژن غیرکونژوگه در تأیید سندرم داون انجام می شود (۱۸). علاوه بر این، سنجش میزان اینهبین در خون زنان می تواند به عنوان مارکری برای تشخیص سرطان تخمدان استفاده گردد. در مردان نیز میزان اینهبین نشان دهنده عملکرد اسپرماتوژنز و باروری است. در میان روش هایی که تاکنون برای سنجش میزان اینهبین مورد استفاده قرار گرفته، روش های مبتنی بر آنتی بادی مونوکلونال از حساسیت بیشتری برخوردارند. در این روش ها با استفاده از آنتی بادی ساخته شده علیه زیرواحدهای اینهبین می توان مقدار آن را به صورت کیفی (و سترن بلات) و یا کمی (الایزا) اندازه گیری کرد. روش های مبتنی بر آنتی بادی مونوکلونال مانند و سترن بلات و الایزا نسبت به سایر روش ها در سنجش میزان اینهبین دقت بالایی دارند (۶). در بسیاری از این تست ها از آنتی بادی علیه سه زیرواحد اینهبین استفاده می شود. زیرواحد α در هر دو اینهبین A و B وجود دارد و آنتی بادی علیه آن می تواند برای اندازه گیری آنها استفاده گردد. آنتی بادی علیه زیرواحدهای β نیز در افتراق اینهبین A و B می تواند مورد استفاده قرار گیرد. بخش هایی از زیرواحدهای اینهبین که در پروتئین کامل در گردش خون وجود دارند می توانند به عنوان اهدافی برای تولید آنتی بادی مونوکلونال استفاده شوند. ساخت آنتی بادی علیه اینهبین نیازمند پروتئین سالم، خالص و فراوان بوده که می توان به این منظور از تکنیک کلونینگ، بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب در میزبان پروکاریوتی استفاده کرد.

References:

1. Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK. Molecular biology of inhibin action. *Semin Reprod Med* 2004;22(3):269-76. PubMed
2. Kim YI, Park SW, Kwon HS, Yang HS, Cho SY, Kim YJ, et al. Inhibin- α gene mutations and mRNA levels in human lymphoid and myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2017;50(4):1403-12.
3. Aitken DA, Wallace EM, Crossley JA, Swanston IA, van Pareren Y, van Maarle M, et al. Dimeric inhibin A as a marker for Down's syndrome in early pregnancy. *N Engl J Med* 1996;334(19):1231-6. PubMed

4. Pangas S, Woodruff T. Production and purification of recombinant human inhibin and activin. *J Endocrinol* 2002;172(1):199-210. PubMed
5. Hall JE, Weltand CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 1999;14(2):409-15. PubMed
6. Maymon R, Cuckle H, Herman A. Maternal serum inhibin levels in twin and singleton pregnancies conceived by assisted reproduction. *Hum Reprod* 2006;21(5):1305-8. PubMed
7. Ahmad I, Jagtap DD, Kumar CS, Balasinor NH, Rani AB, Agarwal D, et al. Molecular characterization of inhibin-A: Structure and expression analysis in *Clarias batrachus*. *General and comparative endocrinology*. 2018;261:104-14.
8. Schwartz NB, Channing CP. Evidence for ovarian "inhibin": Suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by injection of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5721-4. PubMed
9. Good T, Weber P, Ireland J, Pulaski J, Padmanabhan V, Schneyer A, et al. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. *Biol Reprod* 1995;53(6):1478-88. PubMed
10. Forage RG, Ring JM, Brown RW, McInerney BV, Cobon GS, Gregson RP, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5721-4. PubMed
11. Esch F, Shimasaki S, Cooksey K, Mercado M, Mason A, Ying S-Y, et al. Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibins. *Mol Endocrinol* 1987;1(5):388-96. PubMed
12. Leversha L, Robertson D, De Vos F, Morgan F, Hearn M, Wettenhall R, et al. Isolation of inhibin from ovine follicular fluid. *J Endocrinol* 1987;113(2):213-21. PubMed
13. Boributh S, Chanachai A, Jiratananon R. Modification of PVDF membrane by chitosan solution for reducing protein fouling. *J Membrane Sci* 2009;342(1-2):97-104.
14. Mayo KE, Cerelli GM, Spiess J, Rivier J, Rosenfeld MG, Evans RM, et al. Inhibin A-subunit cDNAs from porcine ovary and human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(16):5849-53. PubMed
15. Ramasharma K, Murthy HS, Moudgal N. A rapid bioassay for measuring inhibin activity. *Biol Reprod* 1979;20(4):831-5. Link
16. Davis S, Krozowski Z, McLachlan R, Burger H. Inhibin gene expression in the human corpus luteum. *J Endo* 1987;115(3):R21-R3. [PubMed](#)
17. Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, Boracchi P, Biganzoli EM, Panteghini M. Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: A systematic review. *J Clin Pathol* 2013;66(4):273-81. [PubMed](#)
18. Sonek JD, Nicolaides KH. Prenatal ultrasonographic diagnosis of nasal bone abnormalities in three fetuses with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186(1):139-41. [PubMed](#)
19. Chen H, Wang B, Wang JX, Chen Q. Expression of epitopes of human inhibin subunits and preparation of its antibodies. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing. Natural Sci* 2009;12:18. Link