Comparison of different methods of osmotic shocks for extraction of Human Granulocyte Colony Stimulating Factor produced in periplasm

Sharareh Peymanfar *
PhD student of Microbiology, Biology department, Faculty of sciences, University of Isfahan, Iran, sharareh_peymanfar@yahoo.com
Rasoul Roghanian
Associate professor of Immunology, Biology department, Faculty of sciences, University of Isfahan, Iran, rasoul_roghanian@yahoo.co.uk
Kamran Ghaedi
Associate professor of Genetics and Post-PhD in Molecular Biology, Biology department, Faculty of sciences, University of Isfahan, Iran, kamranghaedi@sci.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: In the recent years, a growing interest for the production of secretary recombinant proteins is seen. This is due to the advantages of recombinant protein production in the periplasm compared to the cytoplasm. However, signal peptides have a critical role in protein secretion as well as the applied technique for the extraction of the protein. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) is a type of colony stimulating factor that causes motivating of proliferation, differentiation and survival of neutrophiles and progenitor cells of these cells and are used to promote decreased neutrophils in some cancers after chemotherapy. The aim of this study was to evaluate the usage of different osmotic shock assays in order to achieve the highest amount of granulocyte colony stimulating factor (GCSF) in BL21 strain of *E.coli*.

Materials and methods: The *E.coli* which contained pET22b- GCSF2- Intein2 expression vector was cultured in 4YT medium and was induced with IPTG 1Mm for protein production. It is necessary to mention that the pET22b has a pelB signal peptide that directs proteins to the periplasmic space. In the next step, three different methods of osmotic shocks were applied for the extraction of the obtained human recombinant protein. Finally, the isolated proteins were analyzed by SDS-PAGE and western blot techniques.

Results: The results of this investigation indicated that GCSF was produced in both of the cytoplasmic and periplasmic spaces and the best method of osmotic shock for protein extraction is using Tris buffer and $MgSO_4$.

Discussion and conclusion: Regarding the results, it is concluded that the $MgSO_4$ with Tris buffer create a good osmotic pressure and accordingly is a more effective way for G-CSF protein extraction. As a result, this method could be used for production and simple separation of recombinant drug proteins.

Key words: *E.coli, G-CSF*, pET22b, intein, pelB, Osmotic shock

* Corresponding author
Received: April 19, 2017 / **Accepted:** September 18, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۶، تابستان ۱۳۹۷، ۵۰- ۴۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۷

مقایسه روش‌های مختلف شوک اسمزی در استحصال فاکتور محرک رشد کلونی گرانولوسیت انسانی تولیدشده در پری‌پلاسم

شراره پیمانفر*: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، shareareh_peymanfar@yahoo.com
رسول روغنیان: دانشیار ایمنولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، rasoul_roghanian@yahoo.co.uk
کامران قائدی: دانشیار ژنتیک و پسا دکترای بیولوژی مولکولی، دانشگاه اصفهان، ایران، kamranghaedi@sci.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر، علاقه به تولید پروتئین‌های ترشحی به علت فواید گوناگون تولید پروتئین نوترکیب در فضای پری‌پلاسمی نسبت به سیتوپلاسم افزایش یافته است. در این میان، پپتیدهای نشانه نقش حیاتی در ترشح پروتئین دارند و نوع روش استفاده‌شده در میزان پروتئین ترشحی استخراج‌شده مهم است. فاکتور محرک رشد کلونی گرانولوسیتی (GCSF) نوعی سیتوکین، هورمون و فاکتور محرک کلونی است که باعث تحریک تکثیر، تمایز و تداوم بقای نوتروفیل‌ها و پیش‌سازهای این سلول‌ها می‌شود و در برخی سرطان‌ها، برای بهبود تعداد نوتروفیل‌های کاهش‌یافته پس از شیمی‌درمانی استفاده می‌شود. هدف مطالعه حاضر، ارزیابی روش‌های مختلف شوک اسمزی برای دستیابی به بیشترین میزان پروتئین GCSF تولیدی در باکتری *E.coli* سویه BL21 است.

مواد و روش‌ها: باکتری *E.coli* دارای وکتور بیانی pET22b–GCSF2–Intein2 در محیط کشت 4YT کشت و سپس، بیان پروتئین با کمک IPTG ۱ میلی‌مولار القا شد. وکتور pET22b دارای توالی پپتید نشانه pelB برای جهت‌دهی پروتئین‌ها به فضای پری‌پلاسمی است. در مرحله بعد، از سه روش متفاوت شوک اسمزی برای جداسازی پروتئین نوترکیب انسانی تولیدشده استفاده شد. سپس پروتئین‌های جداسازی‌شده با روش‌های SDS Page و وسترن بلات تحلیل شد.

نتایج: نتایج بررسی حاضر نشان دادند که پروتئین GCSF در هر دو فضای سیتوپلاسمی و پری‌پلاسمی تولید می‌شود و استفاده از بافر تریس و سولفات‌منیزیم، بهترین روش شوک اسمزی برای استخراج پروتئین است.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، استفاده از سولفات‌منیزیم در کنار بافر تریس فشار اسمزی بیشتری ایجاد می‌کند و روش مؤثرتری برای استحصال پروتئین GCSF است. در نتیجه، این روش برای تولید و جداسازی آسان محصولات دارویی نوترکیب استفاده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *E. coli*، GCSF، pET22b، intein، pelB، شوک اسمزی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

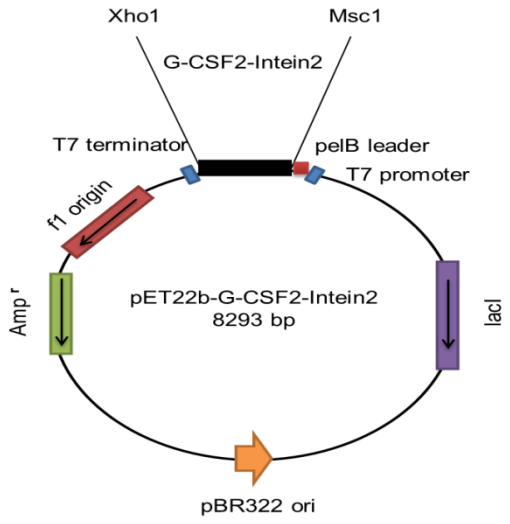
مقدمه

سلول‌های اندوتلیوم، ماکروفاژها و برخی دیگر از سلول‌های سیستم ایمنی، فاکتور محرک رشد کلونی گرانولوسیت (GCSF) را تولید و این فاکتور، تولید گرانولوسیت‌ها را تحریک می‌کند (۱ و ۲). به علت نیاز روزافزون به این پروتئین، امروزه از روش DNA نوترکیب برای تولید این نوع پروتئین در میزبان‌های مختلف استفاده می‌شود (۳-۶). ترشح پروتئین‌ها در فضای پری‌پلاسمی راهکار مطلوبی است که علاوه بر تسهیل فرآیندهای پایین‌دست، سبب تقویت ساختار پروتئین و محافظت در برابر تجزیه پروتئولیتیکی می‌شود. همچنین، تولید پروتئین نوترکیب در پری‌پلاسم سبب افزایش فعالیت زیستی، پایداری و حلالیت بیشتر پروتئین و افزایش اطمینان از توالی صحیح آمینواسیدهای انتهای آمینی می‌شود (۷ و ۸). از سوی دیگر، تولید پروتئین‌ها در سیتوپلاسم به‌شکل اجسام گنجیدگی سبب محافظت پروتئین‌ها در برابر پروتئولیز و مهار اثر پروتئین‌های سمی مانند پروتئازها در سلول می‌شود (۹ و ۱۰). هنگامی که از وکتورهای دارای توالی‌های پپتید نشانه ompT، pelB، CBD یا DsbA/C استفاده شود، پروتئین‌های هدف ممکن است به فضای پری‌پلاسمی راه یابند؛ هرچند پپتید نشانه برای جهت‌دهی پری‌پلاسمی کافی نیست و دمای گرماگذاری پس از القا نیز اهمیت دارد و دماهای کمتر باعث جهت‌دهی بهتر پروتئین به فضای پری‌پلاسمی می‌شوند (۳ و ۱۱). انتخاب روش استخراج پروتئین و میزان پروتئین جداسازی‌شده نیز مهم هستند؛ به علت ساختار متخلخل غشای خارجی باکتری، پروتئین‌ها به‌آسانی و با شوک اسمزی استخراج می‌شوند. شوک اسمزی یا تنش اسمزی نوعی تخریب عملکرد فیزیولوژیکی است که بر اثر تغییر ناگهانی در غلظت ماده حل‌شده در اطراف سلول ایجاد می‌شود. در زمان مواجهه سلول‌ها با شوک اسمزی، پروتئین‌های پری‌پلاسمی، متابولیت‌ها و برخی پروتئین‌های سیتوپلاسمی از سلول‌های *E.coli* آزاد می‌شوند (۱۲). بافر تریس (TES[1]) یکی از معمول‌ترین بافرهایی است که برای استخراج پروتئین‌ها در فرآیند شوک اسمزی استفاده می‌شود و دارای EDTA است. EDTA، سبب افزایش نفوذپذیری غشای خارجی باکتری‌ها و آسان‌شدن استخراج پروتئین‌ها می‌شود. یون‌های دوظرفیتی منیزیم و کلسیم، ترکیبات دیگری هستند که در فرآیند شوک اسمزی استفاده می‌شوند و از تأثیر EDTA روی غشای داخلی باکتری و تخریب آن جلوگیری می‌کنند. میزان زیاد EDTA سبب آسیب به غشای سیتوپلاسمی و آزادشدن پروتئین‌های سیتوپلاسمی و DNA می‌شود (۱۳). در مطالعه‌های انجام‌شده، شوک اسمزی با کمک EDTA و بدون استفاده از ساکارز سبب آزادسازی مؤثر پروتئین‌ها نمی‌شود. از سوی دیگر، مطالعه‌های انجام‌شده روی ریزموجودات مختلف نشان داده‌اند که EDTAاستفاده‌شده در بافر شوک اسمزی، آثار متفاوتی روی غشای ریزموجودات رشدکرده در دماهای زیاد (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و کم (۱۵ درجه سانتی‌گراد) دارد و EDTA در دمای کم، تأثیر بیشتری بر نفوذپذیری غشای سلول‌های رشدکرده در دماهای کم دارد. هدف پژوهش حاضر، استفاده از سه روش متفاوت شوک اسمزی برای استحصال پروتئین GCSF تولیدشده در فضای پری‌پلاسمی است تا پس از ارزیابی، بهترین روش انتخاب شود (۱۴ و ۱۵).

مواد و روش‌ها

سویه باکتری، حامل بیانی و محیط کشت‌های استفاده‌شده: *E.coli* BL21، سویه میزبان برای تولید پروتئین نوترکیب بود که از گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان تهیه شد. pET22b، حامل بیانی بود که از گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان تهیه و کلونینگ توالی ژن در آن انجام شد. محیط کشت‌های 4YT و LB آگار برای تولید پروتئین نوترکیب از شرکت مرک تهیه شدند (۱۶).

توالی ژنی استفاده‌شده برای تولید پروتئین نوترکیب: توالی ژن g-csf (Accession number: NM-000759.30) از بانک ژنی NCBI دریافت و با کمک ابزار Codon Optimization Tool (https://www.idtdna.com/CodonOpt) برای تولید پروتئین G-CSF در باکتری *E.coli* بهینه شد. سپس، دو نسخه از توالی ژنی g-csf بهینه‌شده به‌ترتیب در بالادست توالی ژنی اینتئین MxeGyrA و پایین‌دست توالی اینتئین SspDnaB قرار گرفت. توالی این دو اینتئین از وکتور pTWIN1 استخراج شد. توالی *g-csf–intein2* (*g-csf-MxeGryA-CBD*) دقیق پس از توالی بینابینی اپران تریپتوفان (بین ژن‌های *TrpB* و *TrpC*) قرار گرفت. توالی بینابینی نیز دقیق پس از توالی *g-csf-intein1* (SspDnaB-CBD) قرار گرفت و دو توالی ژنی *g-csf-intein* را از یکدیگر جدا کرد. توالی پپتید نشانه pelB از وکتور برای تولید پروتئین GCSF در فضای پری‌پلاسمی pET22b استخراج و دقیقاً پس از توالی بینابینی و پیش از g-csf-intein2 قرار داده شد. حامل بیانی pET22B دارای توالی پپتید نشانه pelB است (شکل ۱).



شکل ۱- نقشه وکتور بیانی pET22b-GCSF2-Intein2

ساب‌کلونینگ و ترانسفورماسیون: توالی ژنی حاصل، توالی ۲۸۰۰ جفت بازی بود که توسط شرکت GENESCRIPT ساخته و در حامل pUC57 کلون شده بود. این حامل با کمک آنزیم‌های دارای اثر محدود MscI و Xho1 برش خورد و توالی ژنی به حامل بیانی pET22b ساب‌کلون شد (۱۷ و ۱۸).

Colony PCR: وکتور pET22b-gcsf-intein با شوک سرما-گرما به سلول‌های مستعد *E.coli* وارد شد. تأیید ترانسفورماسیون سلول‌ها با کشت روی محیط کشت LB آگارحاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میلی‌مولار) انجام و Colony PCR برای اطمینان از واردشدن وکتور به سلول‌ها با پرایمرهای ویژه ژن (توالی پرایمرها R: GCTGGTGAGTGAGTGTGCC (TM=63.2)F: AAGGCCGCTATGGAGTTG (TM=63))، انجام شد (۱۹).

بیان پروتئین نوترکیب: برای تولید پروتئین نوترکیب، باکتری‌ها روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی‌سیلین کشت شدند و سپس از کلونی‌های رشدکرده، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شبانه در

محیط کشت LB براث کشت داده شد (۱۹). سوسپانسیون سلولی رشدکرده به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰rpm گرماگذاری شد. هنگامی که OD کشت به ۰/۴ تا ۰/۷ رسید، IPTG با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به این محیط کشت اضافه شد و گرماگذاری در شرایط پیشین ادامه یافت. ۲۴ ساعت پس از اضافه‌شدن IPTG، کشت باکتریایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ و برای دستیابی به بیشترین پروتئین تولیدشده در فضای پری‌پلاسمی، از سه روش متفاوت شوک اسمزی استفاده شد (۱۴، ۱۶، ۲۰ و ۲۱).

شوک اسمزی: در روش اول، یاخته‌های حاصل درون بافر پری‌پلاسمیک بافر لیز سرد (TES 30 mMTris-HCl, 60 µl 0.5 MEDTA, 20% sucrose pH 8)، با حجمی معادل ۲ درصد حجم اولیه محیط کشت باکتریایی سوسپانسیون و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. مخلوط حاصل هر چند دقیقه یک‌بار به آرامی تکان داده شد تا سرما مانع فعالیت پروتئازهای رهاشده از شوک اسمزی شود. سپس، حجمی معادل ۳ درصد حجم اولیه محیط کشت باکتریایی، بافر لیز سرد به حجم پیشین اضافه و برای مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد. سپس، $MgSO_4$ با غلظت نهایی ۵۰ میلی‌مولار به مجموعه بافر و رسوب باکتری اضافه و سانتریفیوژ در دور زیاد (۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد تا پروتئین‌ها در محلول رویی جدا شوند (۲۲)

در روش دوم، یاخته‌های حاصل درون بافر لیز سرد (30 Mm Tris-HCl, 60 µl 0.5M EDTA, 20% sucrose pH 8)، با حجمی معادل ۳ درصد حجم اولیه محیط کشت باکتریایی سوسپانسیون و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. مخلوط حاصل چند دقیقه یک‌بار به آرامی تکان داده شد تا سرما مانع فعالیت پروتئازهای رهاشده از شوک اسمزی شود. سپس آب مقطر استریل سرد با حجمی معادل ۳ درصد حجم اولیه محیط کشت به مجموعه بافر و رسوب باکتری اضافه و سانتریفیوژ در دور زیاد (۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد تا پروتئین ها در محلول رویی جدا شوند (۲۳).

در روش سوم، یاخته‌های حاصل درون بافر لیز سرد، (0.2 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 0.5 mM sucrose pH 8) با حجمی معادل ۱ درصد حجم اولیه محیط کشت باکتریایی سوسپانسیون و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. مخلوط حاصل هر دو دقیقه یک‌بار به آرامی تکان داده شد. سپس، آب مقطر استریل سرد با حجمی معادل ۶ درصد حجم اولیه محیط کشت به مجموعه بافر و رسوب باکتری اضافه شد و تکان روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه دیگر ادامه یافت. سپس سانتریفیوژ در دور زیاد (۱۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه به مدت ۲۰ دقیقه) انجام شد تا پروتئین‌ها در محلول رویی جدا شوند. به محلول پروتئینی حاصل، ۱۲ درصد حجم نهایی تری‌کلرواستیک‌اسید اضافه و مخلوط در ۱۴۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۵).

تحلیل پروتئین با کمک SDS-PAGE و وسترن بلات: تحلیل SDS PAGE با کمک ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای بررسی پروتئین تولیدشده انجام شد. نمونه‌های پروتئینی حاصل از شوک اسمزی در مقدار کافی بافر نمونه حل و پس از گرمادهی در ۹۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در چاهک‌های ژل

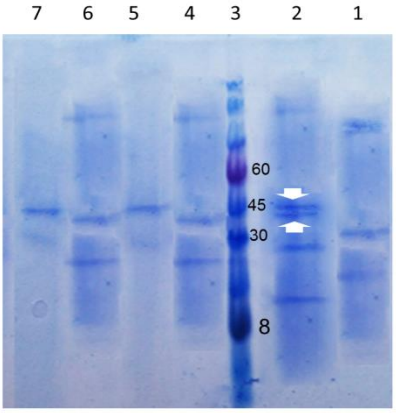
آکریل‌آمید اضافه شدند و در نهایت، ژل با کوماسی‌بلو رنگ‌آمیزی شد (۲۲). برای اطمینان از نتایج SDS-PAGE، تولید پروتئین نوترکیب با روش وسترن بلات و با کمک آنتی‌بادی‌های Rabbit Anti-GCSF و goat Anti-rabbit IgG بررسی و در نهایت، از ۴-کلر-آلفانفتل برای ظاهرسازی باندها استفاده شد (۱۹).

نتایج

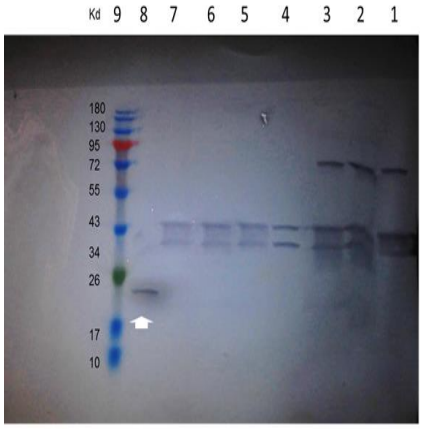
توالی ۲۸۰۰ جفت بازی شامل ۲ نسخه از ژن g-csf، ۲ توالی اینتئین متفاوت از وکتور pTWIN1، توالی پپتید نشانه pelB و توالی بینابینی اپران تریپتوفان که شرکت Genescript ساخته است، در وکتور pET22b کلون و درون باکتری ترانسفورم شد. نتایج Colony PCR نشان دادند که وکتور pET22b-gcsf2-intein2 با موفقیت به درون باکتری *E.coli* BL21 ترانسفورم شده است (نتایج نشان داده نشده‌اند).

پس از ترانسفورماسیون، بیان پروتئین GCSF در محیط کشت 4YT، دمای ۲۳ درجه و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG بررسی و از سه روش متفاوت شوک اسمزی برای دستیابی به بهترین غلظت پروتئین نوترکیب استفاده شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار و شدت باندهای مدنظر (۴۷ و ۵۷ کیلودالتونی) در نمونه‌های مختلف بررسی شد. نتایج بررسی‌ها با کمک روش SDS-PAGE نشان دادند که بهترین غلظت پروتئین GCSF با روش شوک اسمزی اوسوبل و همکاران (۱۹۸۹) حاصل می‌شود (شکل ۲).

از روش وسترن بلات برای تأیید نتایج مشاهده‌شده در روش SDS-PAGE استفاده شد. نتایج نشان دادند که روش شوک اسمزی اوسوبل و همکاران (۱۹۸۹) بهترین روش برای دستیابی به غلظت بیشتری از پروتئین‌هاست (شکل ۳).



شکل ۲- تحلیل SDS-PAGE (ژل ۱۰ درصد): باندهای مشخص‌شده با پیکان، پروتئین‌های استخراج‌شده Intein1-GCSF و GCSF-Intein2 را نشان می‌دهند. چاهک ۱: پروتئین‌های موجود در رسوب سلولی (شوک اسمزی اوسوبل و همکاران، ۱۹۸۹)، چاهک ۲: پروتئین‌های پری‌پلاسمی (شوک اسمزی اوسوبل، ۱۹۸۹)، چاهک ۳: نشانگر پروتئینی، چاهک ۴: پروتئین‌های موجود در رسوب سلولی (شوک اسمزی لیبی[۲]، ۱۹۸۷)، چاهک ۵: پروتئین‌های پری‌پلاسمی (شوک اسمزی لیبی، ۱۹۸۷)، چاهک ۶: پروتئین‌های موجود در رسوب سلولی (شوک اسمزی قنبریان[۳]، ۲۰۰۴)، چاهک ۷: پروتئین‌های پری‌پلاسمی (شوک اسمزی قنبریان، ۲۰۰۴).



شکل ۳-تحلیل وسترن بلات G-CSF نوترکیب در برابر استاندارد. چاهک‌های ۱ تا ۳: پروتئین‌های رسوب سلولی Intein1-GCSF و GCSF-Intein2 (شوک اسمزی اوسوبل، ۱۹۸۹)، چاهک‌های ۴ تا ۷: پروتئین‌های پری‌پلاسمی Intein1-GCSF و GCSF-Intein2 (شوک اسمزی اوسوبل، ۱۹۸۹)، چاهک ۸: نمونه G-CSF استاندارد (PDgrastim)، چاهک ۹: نشانگر پروتئینی

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از مهم‌ترین کاربردهای درمانی G-CSF انسانی، درمان کاهش تعداد نوتروفیل‌های خون در بیماران خاص است. کاهش تعداد نوتروفیل‌ها در افرادی با نقص‌های ژنتیکی، سرکوب مغز استخوان و بیماران سرطانی دیده می‌شود و از این رو، تولید این پروتئین ضروری به نظر می‌رسد. تولید پروتئین‌های نوترکیب در فضای پری‌پلاسمی، فرآیندی ساده، کم‌هزینه و با کارایی بسیار است. با وجود نیاز به توالی‌های پپتید نشانه برای ترشح پروتئین‌های نوترکیب به فضای پری‌پلاسمی، این توالی‌ها کافی نیستند و دمای القا و گرماگذاری باکتری‌ها و ناحیه شناسایی‌شونده پروتئین توسط چپرون‌های انتقال‌دهنده غشایی نیز مهم هستند (۳ و ۱۸). به این منظور، توالی حاوی ژن g-csf به درون باکتری *E.coli* وارد و رشد و القا توسط IPTG انجام شد. از سه روش متفاوت شوک اسمزی برای استخراج پروتئین‌های تولیدشده در پری‌پلاسم استفاده شد (۱۵، ۲۲ و ۲۳) و نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که بیشترین میزان پروتئین استخراج‌شده با کمک بافر لیز TES و غلظت ۵۰ میلی‌مولار سولفات منیزیم است. اگرچه نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه‌های اوسوبل و همکاران (۱۹۸۹) درباره استفاده از بافر TES و سولفات‌منیزیم مطابقت دارد، با نتایج مطالعه‌های لیبی و همکاران (۱۹۸۷) و قنبریان و همکاران (۲۰۰۴) درباره استفاده از TES و آب سرد مطابقت ندارد. نتایج این روش در استفاده از شوک اسمزی برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب از فضای پری‌پلاسمی باکتری با روش استفاده‌شده جلالی‌فرد (۲۰۱۳) نیز مطابقت ندارد زیرا در روش یادشده از ترکیبات شیمیایی بجای شوک اسمزی استفاده و مشخص شده است که استفاده از مواد شیمیایی مانند EDTA و ایزوآمیل‌الکل به‌طور مؤثرتری سبب آزادسازی پروتئین‌های آلفاآمیلاز و Fab D1.3 می‌شوند (۲۴). در پژوهش حاضر، با کمک نقشه ژنی تهیه‌شده از ژن g-csf و اینتئین، پروتئین G-CSF به‌شکل متصل به اینتئین در فضای پری‌پلاسمی تولید و استخراج شد. اینتئین‌های متصل به پروتئین با کمک بیدهای کیتینی برای خالص‌سازی یک مرحله‌ای پروتئین G-CSF استفاده می‌شوند. شرکت‌های دارویی می‌توانند از نتایج مطالعه حاضر برای تولید راحت‌تر و مقرون‌به‌صرفه‌تر پروتئین‌های دارویی استفاده کنند. از سوی دیگر، مطالعه‌های انجام‌شده روی ریزموجودات مختلف نشان داده‌اند که EDTA استفاده‌شده در بافر شوک اسمزی، آثار متفاوتی روی غشای ریزموجودات رشدکرده در دماهای مختلف دارد و سبب افزایش نفوذپذیری غشای سلول‌ها در دماهای کم می‌شود (۲۵ و ۲۶)؛ نتایج مطالعه‌های یادشده با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارند. نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که می‌توان از پپتیدهای نشانه پری‌پلاسمی برای تولید پروتئین‌های دارویی نوترکیب استفاده و با شوک اسمزی دارای یون‌های منیزیم به‌طور مؤثری پروتئین‌های تولیدشده در فضای پری‌پلاسمی باکتری‌های *اشریشیا کلی* را جداسازی کرد. همچنین پیشنهاد می‌شود که تولید این پروتئین با کمک پپتیدهای نشانه دیگر و سایر باکتری‌ها بررسی و از روش‌های شوک اسمزی دیگر برای دستیابی به میزان زیادی از پروتئین نوترکیب استفاده شود.

References

(1) Thomas J., Liu F., Link DC. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Current Opinion Hematology* 2002; 9(3): 183-189.

(2) Pessach I., Shimoni A., NaglerA. Granulocyte-colony stimulating factor for hematopoietic stem cell donation from healthy female donors during pregnancy and lactation: what do we know? *Human Reproduction Update* 2013; 19(3): 259-267.

(3) Jin H., Cantin GT., Maki S., Chew LC., Resnick SM., Ngai J., Retallack DM. Soluble periplasmic production of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression Purification* 2011; 78: 69-77.

(4) Hosoi S., Murosumi K., Sasaki K., Satoh M., Miyaji H., Hasegawa M., et al. Optimization of cell culture conditions for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) production by genetically engineered Namalwa KJM-1 cells. *Cytotechnology* 1991; 7: 25-32.

(5) Bahrami A., Shoja Alsadati SA., Khalilzadeh R., Saeidi Nia AR., VasheghaniFaraahani E., Mohammadian Mousa Abadi J. Production of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor by *Pichia pastoris*. *Iranian Journal of Biotechnology* 2005; 5(3): 162-169.

(6) Chien SF. Cloning and expression of bioactive human granulocyte colony stimulating factor in *Pichia pastoris*. *Journal of Chinese Chemical Society* 2010; 57: 850-856.

(7) Marco AD. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factory* 2009; 8(26):1-18.

(8) Fallah MJ., Akbari B., Saeedinia AR., Karimi M., Vaez M., Zeinoddini Met al. Overexpression of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in *E. coli*. *Iranian Journal of Medical Science* 2003; 28(3): 131-134.

(9) Choi JH., Jeong KJ., Kim SC., Lee SY. Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant Escherichia coli using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000; 53(6): 640.

(10) Jeong KJ., Lee SY. Secretory Production of human granulocyte colony stimulating factor in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* 2001; (23): 311-318.

(11) Rastgar Jazii F., Karkhane AA., Yakhchali B., Fatemi SS., Deezagi AA. simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. *Journal of Chromatography* 2007; 856: 214-221.

(12) Sockolosky JT., Szoka FC. Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone. *Protein Expression Purification*. 2013; 87(2): 129-135.

(13) Ghanbarian H., Zomorodipour A., Ataei F., Shojai S., Yakhchali B. The expression of human granulocyte macrophage colony stimulating factor by heat-induction in *Escherichia coli*. *Journal of Sciences* 2004; 15(3): 203-210.

(14) Tan JS., RamananAzaman SNA., Ling TC., Shuhaimi M., Ariff AB. Enhanced interferon-α2b production in periplasmic space of *Escherichia coli* through medium optimization using response surface method. *Biotechnology Journal* 2009; 3: 117-124.

(15) Babaeipour V., Khanchezar S., Mofid MR., PesaranHagi AM. Efficient process development of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh-GCSF) production in *Escherichia coli*. *Iran Biomedical Journal* 2015; 19(2): 102-110.

(16) Shahali M., Yakhchali B., Zomorodipour A., Seyedena SY. Expression and secretion of human granulocyte macrophage-colony stimulating factor using *Escherichia coli* enterotoxin I signal sequence. *Journal of Sciences* 2005; 16(4): 327-332.

(17) Vanz ALS., Renard G., Palma MS., Chies JM., Dalmora SL., Basso LA. et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning , overexpression, purification and characterization. *Microbial Cell Factory* 2008; 7(13):1-12.

(18) Do BH., Ryu HB Hoang PH., Koo BK., Choe H. Soluble prokaryotic overexpression and purification of bioactive human granulocyte colony-stimulating factor by maltose binding protein and protein disulfide isomerase. *PLOS ONE* 2014; 9(3): e89906.

(19) Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Kaziro Y., Yamazaki T., Yamamoto O., et al. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature* 1986; 319(6052):415-418.

(20) Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA. Current Protocols in Molecular Biology. Copyright © 2003 John Wiley & Sons Inc. All rights reserved. John Wiley & Sons Inc; ringbou edition. 1989; 16.1-16.8.

(21) Libby RT., Braedt G., Kronheim SR., March CJ., Urdal DL., Chiaverotti TA., et al. Expression and purification of native human granolocyte-macrophage colony stimulating factor from an *Escherichisa coli* secretion vector. *DNA* 1987; 6(3):221-229.

(22) Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259): 680-685.

(23) Patching JW., Rose AH. Effect of growth temperature on cold osmotic shock in *Escherichia coli* ML 30. *Journal of General Microbiology* 1971; 69: 429-432.

(24) Jalalirad R. Selective and efficient extraction of recombinant proteins from the periplasm of *Escherichia coli* using low concentrations of chemicals. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 2013; 40(10), 1117-1129.

(25) Wingfield PT. Overview of the purification of recombinant proteins. *Current protocols in protein science* 2015; 1-6.

(26) Wingfield PT. Overview of the purification of recombinant proteins produced in Escherichia coli. *Current protocols in protein science* 1995; 1-6.

[1]- Tris EDTA Sucrose
[2]- Libbey
[3]- Ghanbarian