

## کلونینگ و بررسی بیان ژن کد کننده BMP-2 انسانی در باکتری E. coli به منظور تولید یک داروی نو ترکیب

نژاد محمدی\*، دکتر جمشید کریمی\*\*، نوشین شهاب\*\*\*، سمانه نادری\*، دکتر رضا یادگار آذری\*\*\*\*  
دکتر مسعود سعیدی جم\*\*\*\*\*

دریافت: ۹۳/۲/۳ پذیرش: ۹۳/۶/۱۸

### چکیده:

**مقدمه و هدف:** پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی، گروهی از سایتوکاین‌های متعلق به ابرخانواده TGFβ می‌باشند. این پروتئین‌ها در تکامل بسیاری از ارگان‌ها و بافت‌ها، طی دوران جنینی و پس از آن در ترمیم و بازسازی بافت‌های استخوان و غضروف، نقش دارند. هدف از این مطالعه، کلونینگ و بررسی بیان این پروتئین در باکتری E. coli می‌باشد.  
**روش کار:** در این مطالعه تجربی توالی cDNA مربوط به پپتید بالغ پروتئین مورفوژنتیک انسانی ۲ (BMP-2) در باکتری E. coli کلون شد. پلاسمید نو ترکیب pET28a/BMP-2 پس از توالی یابی به باکتری بیانی E. coli BL21(DE3) ترانسفرم گردید. باکتری نو ترکیب در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷°C کشت داده شد. القا با IPTG صورت گرفت. بررسی بیان به کمک RT-PCR و SDS-PAGE و تأیید بیان با وسترن بلائینگ انجام شد.  
**نتایج:** توالی ژنی به کمک PCR تکثیر یافت. بعد از آماده‌سازی ژن و پلاسمید، واکنش اتصال صورت گرفت. توالی یابی، صحت کلونینگ را نشان داد. بررسی بیان با RT-PCR و SDS-PAGE نشان‌دهنده بیان پروتئین بود. وسترن بلائینگ نتایج را تأیید کرد.  
**نتیجه نهایی:** بیان بالای پروتئین نو ترکیب در سیستم پروکاریوتی حاصل شد. استفاده از غلظت‌های متفاوت القا کننده در ساعت‌های مختلف نشان داد که ۴ ساعت بعد از القا با غلظت 1mM از IPTG، بیشترین بیان را داریم.

**کلید واژه‌ها:** اشریشیاکلی / پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی / پروتئین‌های نو ترکیب

### مقدمه:

حدود ۲۰ نوع از BMP ها شناسایی شده‌اند که هر کدام از این پروتئین‌ها درجات متفاوتی از توانایی القای استخوان یا غضروف را دارا می‌باشند (۱،۲). BMP ها بطور مستقیم از استخوان نیز جدا می‌شوند اما مقدار تولیدی آنها کم می‌باشد (1-3 ng/kg) بعلاوه، مراحل خالص سازی پیچیده و وقت گیر و مهمتر از همه آنتی ژنیسیته برای سیستم ایمنی بدن و خطر انتقال آلودگی در ارتباط با استخوان دهنده، باعث می‌شود تا BMP ها با استفاده از تکنولوژی DNA نو ترکیب، در سیستم‌های بیانی یوکاریوتی و پروکاریوتی تولید گردند (۳).

پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (Bone Morphogenetic Proteins)، گروهی از سایتوکاینهای متعلق به خانواده BMP و ابرخانواده فاکتور ترانسفورم کننده رشد (TGFβ) می‌باشند. این پروتئین‌ها در تکامل بسیاری از ارگان‌ها و بافت‌ها، طی دوران جنینی و پس از آن در ترمیم و بازسازی بافت‌هایی همچون استخوان و غضروف، متعاقب آسیب و بیماری نقش دارند. BMP ها توانایی تنظیم چسپندگی سلولی، تکثیر، تمایز و آپوپتوز را در انواع بافت‌های مختلف از جمله استخوان دارند. تاکنون

\* کارشناسی ارشد زیست فن آوری پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\* استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\* کارشناس آزمایشگاه بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\*\* استادیار گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

\*\*\*\*\* دانشیار زیست فن آوری پزشکی عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی و ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی همدان (sjam110@yahoo.com)

زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و به کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تکثیر داده شد. فرایند PCR تحت شرایط زیر انجام شد: مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل متوالی از مراحل واسرشت در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. پس از تکثیر ژن محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری گردید.

هضم آنزیمی: محصول واکنش PCR و پلاسمید pET28a هر دو تحت هضم دو آنزیمی با XhoI و NcoI از محصولات شرکت فرمنتاز آلمان قرار گرفتند. محصول هردو واکنش دو آنزیمی روی ژل ۱٪ بارگذاری شدند و با کیت استخراج از ژل (Bioneer, Korea) خالص گردیدند. غلظت ژن و پلاسمید خالص شده، با نانودراپ (BioTek, USA) سنجش شد.

واکنش اتصال: با استفاده از آنزیم T<sub>4</sub> لیگاز (Fermentase, Germany) ژن BMP-2 به درون پلاسمید pET28a وارد شد و پلاسمید نو ترکیب ایجاد شده، pET28a/BMP-2 نام گرفت. جهت تأیید صحت وارد شدن ژن به درون پلاسمید، ابتدا پلاسمید نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید از باکتری E. coli TOP10، استخراج و تحت واکنش هضم دو آنزیمی قرار گرفت و نتیجه روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین پلاسمید نو ترکیب توالی یابی گردید (Biomatic, Canada).

بیان پروتئین: پلاسمید نو ترکیب به باکتری E. coli BL21(DE3) مستعد شده به روش شیمیایی با استفاده از شوک حرارتی انتقال گردید. سپس باکتری انتقال شده در محیط لوریا برتانی (LB) حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۱۰ mg/ml) در شیکر انکوباتور ۳۷ °C با دور 200 rpm به مدت ۱۶-۱۲ ساعت کشت داده شد. زمانیکه OD به ۰/۴-۰/۶ رسید، القا با IPTG در غلظت نهایی یک میلی مولار صورت گرفت و در همان دما و دور قرار داده شد. دو ساعت بعد از

BMP-2 درون بدن بصورت پیش ساز مولکولی بزرگ ۳۹۶ آمینو اسیدی شامل پپتید نشانه، پرودومین و دومین بالغ سنتز می شود. پس از گلیکوزیلاسیون و شکست پروتئولیتیکی، دو پلی پپتید بالغ فعال از نظر بیولوژیکی شامل ۱۱۴ آمینو اسید، به کمک پیوندهای دی سولفیدی، شکل دایمر BMP-2 را بوجود می آورند (۴).

BMP-2 برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ توسط مارشال پوریست، از استخوان، جداسازی و شناسایی گردید (۵). BMP-2 برای استفاده کلینیکی در سال ۲۰۰۲ توسط FDA تأیید گردید. این پروتئین هم اکنون بصورت تجاری در دسترس بوده و بعنوان یک جایگزین مناسب پیوند آلوگراف استخوان در مواردی همچون جوش خوردن مهره‌ها، درمان نقایص استخوانی، ثابت کردن شکستگی‌ها و ترمیم ناهنجاری و شکستگی استخوان‌های صورت و فک مورد استفاده قرار می گیرد. در این موارد، BMP‌ها با استفاده از یک حامل زیست تخریب پذیر، به محل آسیب انتقال داده می شوند (۸-۶).

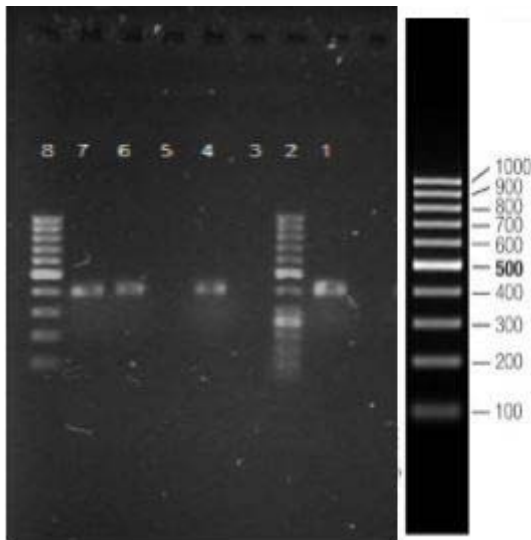
هدف از این مطالعه، کلون کردن توالی مربوط به پپتید بالغ BMP-2 جهت تولید انبوه این پروتئین در باکتری اشریشیا کلی به منظور تولید یک داروی نو ترکیب در داخل کشور می باشد. این پروتئین جهت درمان شکستگی‌های استخوانی، ترمیم ساییدگی مفاصل و درمان افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن استخوانی، کاربرد دارد.

## روش کار:

بخش بیوانفورماتیک: توالی cDNA مربوط به BMP-2 بالغ از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج گردید (NM\_001200.2). جهت تسهیل در امر کلونینگ و ترجمه تغییراتی از جمله اضافه کردن کدون شروع و خاتمه، توالی برش آنزیم محدود کننده در انتهای ۵' و ۳'، برچسب هیستیدینی و توالی برش انتروکیناز روی توالی ژن صورت گرفت. با مجموعه تغییرات صورت گرفته توالی مورد نظر به ۳۹۲ جفت باز افزایش یافت. سپس توالی جدید بصورت بیوشیمیایی سنتز گردید (Biomatic, Canada). تکثیر ژن: توالی cDNA سنتز شده با استفاده از واکنش

جدول ۱: توالی پرایمرهای پیشرو و پیرو

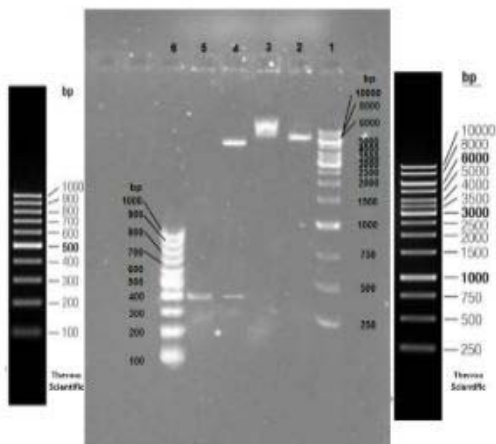
ردیف	نوع پرایمر	طول قطعه تکثیری (توکلوئید)	جایگاه برش آنزیم	سایت برش آنزیمی	سکانس پرایمر
1	BMP-2a F	392	Nco I	5...CCATGG...3 3...GGTACC...5	5'GTCAGACCATGGGACACCACCACC ACCACCACGAC-3'
2	BMP-2a R	392	Xho I	5...CTCGAG...3 3...GAGCTC...5	5'GTCAGACTCGAGCTAGCGACACCC ACAACCCT-3'



شکل ۱: بررسی واکنش اتصال با PCR مستقیم

ستون ۱، کنترل مثبت (نتیجه PCR بر روی پلاسمید pGEM دارای ژن سنتز شده)، ستون ۲ و ۸ مارکر DNA (Thermo Scientific) ستون ۳، کنترل منفی (کلنی دارای پلاسمید بیانی فاقد ژن)، ستون های ۴ و ۶ و ۷، کلنی های رشد کرده دارای پلاسمید بیانی حاوی ژن، ستون ۵، کلنی رشد یافته دارای پلاسمید بیانی اما فاقد ژن مورد نظر

واکنش هضم تک و دو آنزیمی با آنزیم های NcoI و XhoI برای تأیید واکنش اتصال صورت گرفت که نتایج حاصل از این هضم دو آنزیمی نشان دهنده خروج ژن از بدنه وکتور و قرارگیری در ناحیه ۳۹۲ جفت بازی بود، این وکتور سبک تر از وکتور دارای ژن بوده و در طول ژل، بیشتر حرکت کرده است. نتایج حاصل از توالی یابی نیز نشان داد که ژن مورد نظر در ناحیه MCS پلاسمید، بین جایگاه آنزیم های NcoI و XhoI قرار گرفته است (شکل ۲).



شکل ۲: بررسی واکنش اتصال با برش تک و دو آنزیمی

ستون ۱ و ۶ مارکر DNA (Thermo Scientific)، ستون ۲، پلاسمید نوترکیب تک برشی با RE، ستون ۳، پلاسمید نوترکیب فاقد برش، ستون ۴، پلاسمید نوترکیب برش یافته با دو RE، ستون ۵، محصول PCR

القا و چهار ساعت بعد از القا، جهت بررسی بیان، رسوب گیری با سانتر فوژ در دور 12000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

بررسی بیان: بررسی بیان در سطح RNA و پروتئین به ترتیب به کمک روش Reverse Transcriptase PCR و تکنیک SDS-PAGE و تأیید بیان با وسترن بلاتینگ صورت گرفت. استخراج RNA با استفاده از محلول تجاری RNX-Plus و سنتز cDNA با استفاده از RevertAid M- Mul Reverse Transcriptase و پرایمرهای هگزامر تصادفی طبق پروتکل، از کلنی های غربال شده، صورت گرفت. به منظور حذف DNA Genomic، از DNAase استفاده شد. در نهایت با استفاده از cDNA سنتز شده به عنوان template و پرایمرهای اختصاصی طراحی شده واکنش PCR صورت گرفت. پس از انجام واکنش PCR، محصول بدست آمده برای مشاهده نتیجه حاصل از بیان ژن در سطح RNA، بر روی ژل آگارز ۱٪ منتقل شد. همچنین جهت بررسی بیان در سطح پروتئین، رسوب دو میلی لیتر از باکتری همراه با بافر نمونه آماده سازی و بر روی ژل اکریل آمید ۱۵٪ به همراه مارکر وزن مولکولی بار گذاری گردید. تأیید بیان به کمک آنتی بادی مونوکلونال تک مرحله ای اختصاصی علیه ناحیه هیستیدین نشاندار شده با HRP از کلاس Mouse Ig، انجام گرفت. پروتئین نوترکیب بیان شده با استفاده از ژل الکتروفورز، مشخص و به غشای نیتروسولولزی منتقل گردید سپس با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی ضد برچسب هیستیدینی تک مرحله ای نشاندار شده با HRP مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج:

بعد از انجام کلونینگ، صحت پلاسمید نوترکیب pET28a/BMP-2 تولید شده مورد بررسی قرار گرفته و غربالگری کلنی های بدست آمده با واکنش PCR مستقیم از کلنی ها انجام شد. نتایج در شکل ۱، نشان دهنده وجود کلنی های دارای ژن مورد نظر بود. در این شکل ستون های ۴ و ۶ و ۷، کلنی های رشد کرده دارای پلاسمید بیانی حاوی ژن و ستون ۵، کلنی رشد یافته دارای پلاسمید بیانی اما فاقد ژن مورد نظر می باشد. همچنین ستون ۳ و ۱ به ترتیب بعنوان کنترل مثبت (محصول PCR) و کنترل منفی (کلنی دارای پلاسمید بیانی فاقد ژن) گذاشته شده اند.



شکل ۵: نتیجه وسترن بلاتینگ با آنتی بادی علیه توالی

#### برچسب هیستیدینی

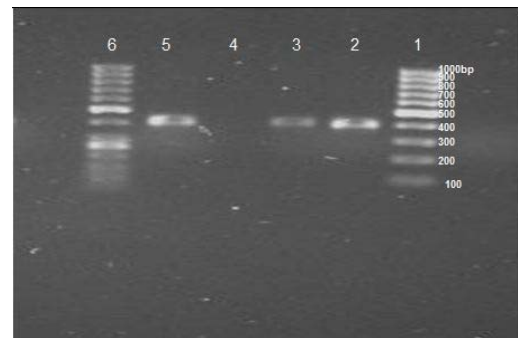
ستون ۱، مارکر پروتئینی. ستون ۲، بلاتینگ بر روی عصاره باکتری دارای پلاسمید نوترکیب در زمان قبل از القا. ستون ۳، نتیجه بلاتینگ بر روی عصاره باکتری دارای پلاسمید نوترکیب ۲ ساعت بعد از القا. ستون ۴، بلاتینگ بر روی عصاره باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب ۴ ساعت بعد از القا

#### بحث:

پروتئین‌های مورفوژنتیک استخوانی (BMPs) از اعضای خانواده پروتئین مورفوژنتیک استخوانی و ابر خانواده (TGF $\beta$ ) می‌باشند. BMP-2 یکی از اعضای این خانواده است که از همان اوایل جنینی در تکامل اعضا، کنترل پرورده‌های سلولی، تنظیم ساخت و بازسازی استخوان، غضروف، تاندون و رباط مشارکت می‌کند اما بواسطه نقش پر اهمیت آن در بازسازی استخوان و غضروف، شناخته شده است. BMP-2 از طریق تمایز پیش‌سازهای استخوانی به سلول‌های تشکیل دهنده بافت استخوانی، به بازسازی بافت قابل تغییر استخوان کمک می‌کند. بواسطه اهمیت این پروتئین، تصمیم به تولید فرم نوترکیب BMP-2 در سیستم پروکاریوتی گرفته شد نتایج نشان‌دهنده تولید این پروتئین نوترکیب به مقدار زیاد در این سیستم بود.

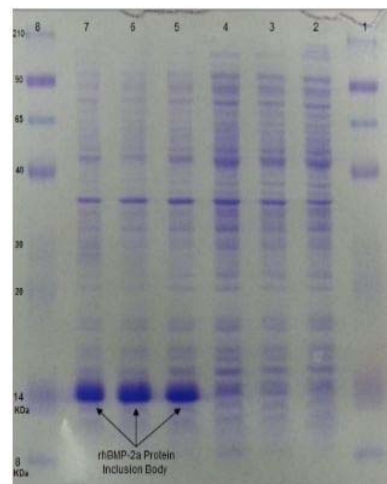
BMP-2 برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ میلادی کلون شد. رتنونینگرام و همکاری در سال ۲۰۱۲ (۹) و گو و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۱۰)، بخش کد کننده مربوط به

بیان پروتئین در باکتری میزبان: ابتدا بررسی بیان در سطح RNA و با استفاده از روش Reverse Transcriptase PCR صورت گرفت. همانطور که در شکل ۳ پیداست؛ نتایج نشان‌دهنده وجود باند ژنی در ناحیه ۳۹۲ جفت بازی می‌باشد. در این شکل، از باکتری دارای پلاسمید نوترکیب؛ قبل از القا، دو و سه ساعت بعد از القا نمونه برداری شد. نتایج نشان‌دهنده وجود mRNA مربوط به ژن BMP-2 در ساعت‌های بعد از القا بود (ستون ۲ و ۳). همچنین بررسی بیان به کمک SDS-PAGE انجام شد، نتایج نشان‌دهنده باند پروتئینی در ناحیه ۱۴ کیلو دالتون بود (شکل ۴). تأیید بیان پروتئین نیز با استفاده از روش وسترن بلاتینگ انجام شد. نتایج مؤید وجود پروتئین نوترکیب در باکتری اشریشیا کلی بود (شکل ۵).



شکل ۳: واکنش RT-PCR

ستون ۱ و ۶، مارکر DNA. ستون ۲ و ۳ باکتری دارای پلاسمید نوترکیب به ترتیب در دو و سه ساعت بعد از القا، ستون ۴، باکتری دارای پلاسمید نوترکیب قبل از القا، ستون ۵، کنترل مثبت (محصول PCR)



شکل ۴: بررسی بیان با SDS-PAGE

ستون های ۱ و ۸ مارکر پروتئینی (sigma). ستون ۲، باکتری BL21(DE3) فاقد پلاسمید نوترکیب قبل از القا. ستون ۳، باکتری BL21(DE3) فاقد پلاسمید نوترکیب بعد از القا. ستون ۴، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب قبل از القا. ستون ۵، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب ۲ ساعت بعد از القا. ستون ۶، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب ۴ ساعت بعد از القا. ستون ۷، باکتری BL21(DE3) دارای پلاسمید نوترکیب ۱۶ ساعت بعد از القا

به دلیل مصرف انرژی بالا برای ترجمه پروتئین نو ترکیب، سلول در چهار ساعت بعد از القا با کاهش انرژی مواجه شده و از آنطرف سمیت پروتئین هترولوگ برای سلول باعث می شود سلول زودتر وارد فاز سکون گردد و مرحله به مرحله تولید پروتئین نو ترکیب را کمتر کند. همچنین غلظت IPTG از 1mM حداکثر توانایی بکارگیری اپرون Lac و پروموتور T7 می باشد. با استفاده از روش هایی چون کنترل دمایی در زمان القا و بعد از القا، تغییر سوش میزبان، هوادهی مناسب و ... می توان به کاهش تجمع پروتئین نو ترکیب در سیتوپلاسم باکتریایی کمک کرد (۱۲،۱۳).

جهت افزایش کارایی اثر BMP-2 ها از حامل ها جهت انتقال دارو به بدن استفاده می شود. پس BMP-2 نو ترکیب انسانی برای درمان شکستگی های استخوان ران و همچنین برای درمان نقایص و شکستگی های استخوان درشت نی، بدون هیچ عارضه جانبی و با نتایج فوق العاده، بکار گرفته می شوند. ایمپلنت های حاوی BMP، ممکن است در آینده ای نزدیک جایگزین اتوگرافت های معمول در ترمیم شکستگی ها، نقایص سر و صورت و اتصالات ستون فقرات شوند که در نتیجه آن سرعت تشکیل استخوان جدید بیشتر خواهد شد (۳،۱۴،۱۵).

### نتیجه نهایی:

با اتکا بر نتایج حاصله می توان پروتئین BMP-2 را در سیستم های بیانی پروکاریوتی همانند اشریشیا کلی به میزان زیادی و در سطح انبوه در داخل کشور تولید نمود تا بتواند بصورت یک داروی نو ترکیب به راحتی در دسترس عموم قرار بگیرد. ضمن اینکه باعث کاهش هزینه های درمانی و تسریع روند بهبودی بیماران گردد و کمکی به بومی سازی علوم در کشور شود. همچنین با توجه به نقش BMP-2 در مسیر سیگنالینگ و اهمیت آن در بدن، نیاز است تا جنبه های دیگر اثر گذاری این پروتئین بر مسیرهای پیام رسانی، ترمیم، درمان و آپوپتوز بافت های مختلف شناسایی گردد.

### سپاسگزاری:

این مقاله برگرفته شده از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری پزشکی می باشد. از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر حمایت مالی از این پروژه قدردانی می گردد.

پپتید بالغ این پروتئین را به ترتیب در پلاسمید بیانی pET32b و pET11b کلون کردند. همچنین آنها از برچسب هیستیدینی تعیبه شده در بخش N-ترمینال برای خالص سازی استفاده نمودند. مقایسه نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با نتایج بدست آمده توسط رتنونینگرام و همکارانش، یکسان بود. از آنجا که آنها فرایند خالص سازی و بررسی اثرات بیولوژیکی این پروتئین را انجام دادند و تمایز سلول های پیش ساز به سلول های استخوانی را مشاهده کردند می شود نتیجه گرفت که با خالص سازی این پروتئین به همان نتایج حاصل شده از کار آنها می توان دست یافت.

هدف از انتخاب بخش کد کننده پپتید بالغ این بود که با وجود حذف توالی های مربوط به پرودومین و پپتید نشانه، باز هم اثرات زیستی و قابلیت تمایز پیش سازها به سلول های استخوانی و غضروفی در پپتید بالغ ۱۱۴ آمینواسیدی مشهود است و می تواند به گیرنده های سرین ترئونین کینازی اتصال یابد و خانواده پروتئینی Smad را جهت پیام رسانی بکار گیرد. چون پپتید بالغ فاقد بخش های قندی است و نیازی به گلیکوزیلاسیون ندارد، می توان آن را در سیستم بیانی پروکاریوتی که فاقد گلیکوزیلاسیون است، کلون کرد. پس از تخلیص این پروتئین می توان با انجام پروسه رناتوراسیون پیوندهای دی سولفیدی را احیاء و شکل دایمر فعال از نظر بیولوژیکی را ایجاد کرد (۱۱).

پروتئین های هترولوگ در سیستم بیانی پروکاریوتی بصورت انکلیوژن بادی در سیتوپلاسم میزبان تجمع می یابند. این تجمعات علاوه بر اینکه بار متابولیکی وسیعی به سلول میزبان تحمیل می کنند، دارای اثرات سمی نیز می باشند و سلول زودتر وارد فاز سکون و در نهایت فاز مرگ می شود. در این مطالعه از وکتورهای گروه pET استفاده شد. این وکتورها دارای پروموتور قوی T7 می باشند و بیان بالایی از ژن پایین دست خود را حمایت می کنند. سرعت تولید زیاد فرم نو ترکیب این پروتئین در باکتری بیانی E.coli BL21(DE3) منجر به تجمع پروتئین هترولوگ در سیتوپلاسم میزبان، به فرم انکلیوژن بادی می شود. با بررسی های انجام شده در زمان ها و غلظت های متفاوت از IPTG، این نتیجه بدست آمد که بیشترین بیان در ۴ ساعت بعد از القا و بهترین غلظت با 1mM IPTG صورت می گیرد با توجه به این یافته می توان گفت که؛

## منابع:

1. Du Y, Yip H. Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation. *Differentiation* 2010;79: 84-92.
2. Balemans W, Hul WV. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250 231-50.
3. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;43(1):65-92.
4. Scheufler C, Sebald W, Hülsmeier M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol* 1999; 287(1): 103-15.
5. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150(3698):893-9.
6. Capra P, Conti B. The role of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in bone tissue engineering: a mini review. *Scientifica Acta* 2009;3(1):25-32.
7. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:10-13.
8. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *Int Orthop* 2007;31: 729-34.
9. Retnoningrum DS. Codon optimization for high level expression of human BMP-2 in *Escherichia coli*. *Protein Expres Purifi* 2012; 84: 188-94.
10. Guo W. Refolding and two-step purification by hydrophobic interaction chromatography of recombinant human bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. *Proc Biochem* 2012;47: 960-967.
11. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(5):343-55.
12. Alfasi SN. Physiological aspects underpinning recombinant protein production in *Escherichia coli*. Birmingham: University of Birmingham, 2011.
13. Rodríguez-Carmona E, Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Villaverde A, García-Fruitós E.. Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microb Cell Fact* 2010. doi: 10.1186/ 1475-2859-9-71.
14. Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems. *Spine* 2002;27(16):16-23.
15. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998;22(6):591-603

*Original Article*

## Cloning of BMP-2 Gene and Its Expression Study in *E. coli* in Order to Produce a Recombinant Drug

N. Mohammadi, M.Sc.<sup>\*</sup>; J. Karimi, Ph.D.<sup>\*\*</sup>; N. Shabab, B.Sc.<sup>\*\*\*</sup>; S. Naderi, M.Sc.<sup>\*</sup>  
R. Yadegar Azari, Ph.D.<sup>\*\*\*\*</sup>; M. Saidijam, Ph.D.<sup>\*\*\*\*\*</sup>

Received: 23.4.2014

Accepted:

### Abstract

**Introduction & Objective:** Bone morphogenetic proteins are a group of cytokines that belongs to superfamily TGF $\beta$ . These proteins play an important role in evolution of many of organs and tissues through germinal period followed by amending and rebuilding of bone tissue and cartilage. The aim of this study was to clone and expression analysis of BMP-2 gene in *E. coli* bacteria.

**Materials & Methods:** In this experimental study the sequence of cDNA related to the mature peptide of human morphogenetic protein-2 (BMP-2) in *E. coli* was synthesized and cloned in a PET system. After sequencing, recombinant plasmid pET28a/BMP-2 was transformed into the expression host, *E. coli* BL21 (DE3). The transformed bacteria were cultured in LB medium containing kanamycin antibiotic at 37° C for O/N. Then, induction with IPTG took place. The expression was evaluated by reverse transcriptase PCR and SDS-PAGE followed by western blotting to confirm its identity. The observed band on SDS-PSGE showed the presence of the expressed protein at the 14k Dalton segment which was confirmed by western blotting technique.

**Results:** The gene sequence was amplified by PCR. After gene and plasmid preparation, ligation was performed. Sequencing confirmed accuracy of cloning. Protein expression was demonstrated by RT-PCR and SDS-PAGE. Results were confirmed by western blotting.

**Conclusion:** In this study over-expression of this recombinant protein was achieved in a prokaryotic system. Different concentrations of inducer were applied and harvesting was performed in different times after induction. The best expression was detected in 4 hours after induction with a concentration of 1mM IPTG.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci* 2014; 21 (3): 196-202)

**Keywords:** Bone Morphogenetic Proteins / *Escherichia coli* / Proteins Recombinant

-----  
<sup>\*</sup> M.Sc. in Medical Biotechnology

Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

<sup>\*</sup> Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine

Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

<sup>\*\*\*</sup> B.Sc. in Biology, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran

<sup>\*\*\*\*</sup> Assistant Professor, Department of Molecular Medicine & Genetics, School of Medicine

Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Associate Professor of Biotechnology, Molecular Medicine & Genetics Research Center

Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (sjam110@yahoo.com)