دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۴، صفحه ۵۲۳ – ۵۱۶ (مهر و آبان ۱۳۹۳)

ISMJ 2014; 17(4): 516-523

# بیان و تخلیص دو پروتئین نوترکیب DnaK و Omp31 بروسلا ملی تنسیس و جداسازی اندوتوکسین همراه آن‌ها

امیر قاسمی [۱]، محمدحسین سالاری [۱*]، امیر حسن زرنانی [۲و۳]، محمود جدی‌تهرانی [۴]

[۱] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۲] پژوهشکده نانوتکنولوژی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین ابن‌سینا، جهاد دانشگاهی تهران
[۳] مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
[۴] پژوهشکده مونوکلونال آنتی‌بادی، پژوهشگاه فناوری‌های نوین ابن‌سینا، جهاد دانشگاهی تهران

(دریافت مقاله: ۹۱/۴/۲۸- پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۲۱)

## چکیده

**زمینه:** امروزه به‌دلیل مشکلاتی که سوش واکسن بروسلا ملی تنسیس ایجاد می‌کند، توسعه واکسن ساب یونیتی با استفاده از پروتئین‌های نوترکیب مد نظر است. علی‌رغم به‌دست آمدن پروتئین‌های نوترکیب با بیش‌تر از ۹۵ درصد خلوص، این پروتئین‌ها هنوز حاوی میزان زیاد و مشخصی از اندوتوکسین هستند. اندوتوکسین‌ها، لیپوپلی‌ساکاریدهایی همراه با غشاء بیرونی باکتری‌های گرم منفی هستند. سمیت ذاتی این لیپوپلی ساکاریدها دارای یک اثری شاخص بر روی رخدادهای بیوشیمیایی بعضی از سلول‌ها از جمله سلول‌های ایمنی هستند و می‌توانند در آزمایش‌های انجام شده در شرایط آزمایشگاه تداخل ایجاد کنند.

**مواد و روش‌ها:** پلاسمیدهای بیانی حاوی دوژن ***dnak*** و***omp31*** به‌درون باکتری ***E.coli*** **Bl21(DE3)** ترانسفورم شد. بعد پس از انتخاب کلونی مناسب با استفاده از روش وسترن بلات محلولیت و عدم محلولیت هر کدام معین شد. سپس بعد از بیان در ۲۰ درجه به‌مدت ۲۲ ساعت با استفاده از روش **Ni-NTA** آگاروز و روش تخلیص با استفاده از اوره، پروتئین‌های نوترکیب تخلیص گردید. در هنگام شستشو **Ni-NTA agarose** هم از روش همراه با دترجنت **Triton X-114** و هم بدون آن (استاندارد) استفاده شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه میزان ۲۰ و ۸ میلی‌گرم از پروتئین‌های نوترکیب **DnaK** و **Omp31** به‌ترتیب با استفاده از روش استاندارد به‌دست آمد در حالی‌که در روشی که دترجنت استفاده شده بود، این میزان ۲۰ درصد افت داشت. اما در عوض میزان اندوتوکسین در محصول نهایی به‌میزان بسیار زیادی جدا شده بود و به کمتر از ۰/۰۵ **EU** میلی‌گرم در لیتر رسید.

**نتیجه‌گیری:** روش به‌کار رفته در این مطالعه می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب به‌منظور بیان، تخلیص و جدا سازی از محصول پروتئین نوترکیب نهایی برای تمام پروتئین‌های با خصوصیات فیزیولوژیکی مشابه به‌کار رود.

**واژگان کلیدی:** پروتئین نوترکیب، تخلیص، اندوتوکسین، بیان

* تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروب‌شناسی
**E-mail: mhsalari2002@gmail.com**

[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

## مقدمه

برای تولید در مقیاس انبوه پروتئین‌های نوترکیب راه‌کارهای مختلفی توسعه یافته است. یکی از این روش‌ها استفاده از برچسب‌های[1] پپتیدی کوچک است که تأثیر چندانی روی پروتئین ندارد. متداول‌ترین برچسب‌های پپتیدی مورد استفاده شامل گلوتاتیون S-ترانسفراز (۱)، پروتئین متصل شونده به مالتوز (۲) و هیستیدین می‌باشد (۳).

علی‌رغم به‌دست آمدن پروتئین‌هایی با ۹۵ درصد خلوص با استفاده از این برچسب‌ها، این پروتئین‌ها هنوز حاوی میزان زیاد و مشخصی از اندوتوکسین هستند. اندوتوکسین‌ها، لیپوپلی‌ساکاریدهایی همراه با غشاء بیرونی باکتری‌های گرم منفی هستند. سمیت ذاتی این لیپوپلی‌ساکاریدها دارای یک اثر شاخص بر روی رخدادهای بیوشیمیایی بعضی از سلول‌ها از جمله سلول‌های ایمنی هستند و می‌توانند در آزمایشات انجام شده در شرایط آزمایشگاه تداخل ایجاد کنند (۴). علاوه‌بر این، حضور حتی مقدار کمی از اندوتوکسین در محتویات پروتئین مورد استفاده برای درمان و یا واکسیناسیون، می‌تواند التهاب و شوک سپتیک در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی می‌شود (۵).

به‌منظور اجتناب از اثرات جانبی، حذف تقریباً کامل اندوتوکسین از محصول نهایی پروتئین نوترکیب قبل از استفاده از این پروتئین به‌منظور تجویز و یا کاربردهای مرتبط با زیست‌شناسی سلول، ضروری به‌نظر می‌رسد. تاکنون تکنیک‌های متنوعی به‌منظور حذف اندوتوکسین از محلول‌های پروتئینی همراه با درجه‌های متفاوتی از موفقیت به‌کار رفته است (۶).

اولترافیلتراسیون، اگرچه در حذف اندوتوکسین از آب مؤثر است، اما روشی غیرمؤثر برای پروتئین‌ها است. زیرا فشار فیزیکی موجود در این روش می‌تواند باعث آسیب به پروتئین‌ها شود (۷). مبادله کننده‌های آنیونی[2] که از مزایای حضور بار منفی برروی اندوتوکسین بهره می‌برند، به‌طور گسترده‌ای به‌منظور برای جذب اندوتوکسین استفاده شده‌اند (۸).

با این وجود، وقتی که پروتئین‌های اسیدی به منظور برداشتن اندوتوکسین استفاده شده‌اند، این امکان که خود این پروتئین‌ها هم جذب بستر[3] شده و باعث کاهش شاخصی در محصول نهایی پروتئین شود، وجود دارد. پروتئین‌های دارای شارژ خالص مثبت نیز توانایی تشکیل کمپلکس‌های قوی با اندوتوکسین را دارند، که در نتیجه این احتمال هم وجود خواهد داشت که در هنگام جدا سازی اندوتوکسین‌ها بر مبنای بار منفی آن‌ها، این پروتئین‌ها از اندونوکسین جدا نشده و در نتیجه در بستر گیر بیفتند و در نتیجه حاصلی جز کاهش محصول دیده نخواهد شد (۸).

جاذب‌های با میل اختصاصی به اندوتوکسین از قبیل هیستیدین، هیستامین، پلی میکسین B و پلی‌ال-لیزین، جذب اندوتوکسین را به داخل بستری که داخل آن قرار گرفته‌اند، از طریق واکنش‌های هیدروفوبیک و الکترواستاتیک تسهیل می‌کنند (۹).

از مضرات استفاده از این جاذب‌ها، نیاز به انجام چندین بار شستشو در هر بار جداسازی و نیز انجام متعدد عمل جداسازی به‌منظور حذف تقریباً کامل اندوتوکسین می‌باشد که این اعمال باعث کاهش محصول نهایی خواهد شد (۸). جدا سازی بر مبنای تشکیل فاز حاصل از دترجنت‌های non-ionic شبیه Triton-X114 به‌عنوان روشی بسیار مؤثر برای

[1] Tags

[2] Anionic exchanger
[3] Matrix



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

جداسازی اندوتوکسین از محلول‌های پروتئینی توصیف شده است (۱۰). در دمای پایین نقطه تشکیل ابر این دترجنت، Triton-X114 به‌طور مؤثری اندوتوکسین را از پروتئین‌ها جدا می‌کند. در دمای بالاتر از نقطه تشکیل ابر دترجنت، اندوتوکسین در فاز دترجنت به‌دلیل ویژگی‌های هیدروفوبیک خود به‌دام خواهد افتاد. در حالی‌که پروتئین‌های آب دوست در فاز مایع باقی خواهند ماند. با این حال، این روش زمان‌بر است و نیاز به انجام چندین مرتبه مراحل جداسازی اندوتوکسین به‌منظور کاهش اندوتوکسین به‌میزان ۹۸ درصد دارد. علاوه‌بر این، تغییرات دمایی می‌تواند منجر به تغییر حالت پروتئین شود و نیز میزان اندکی از Triton-X114 در محلول‌های پروتئینی باقی بماند (۱۱).

همان‌طور که نشان داده شده است، اندوتوکسین می‌تواند به‌عنوان مولکولی مقاوم به دما و pH در نظر گرفته شود که این ویژگی باعث می‌شود در نظر گرفتن پارامترهایی مانند دما و pH برای جداسازی این مولکول امکان‌پذیر نباشد و به همین دلیل حضور اندوتوکسین همراه پروتئین نوترکیب به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین مشکلات در مسیر تولید پروتئین نوترکیب خالص در نظر گرفته شود (۱۲).

در این مطالعه، روشی بررسی می‌شود که در هنگام تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از Ni-NTA آگاروز، میزان اندوتوکسین همراه پروتئین نوترکیب نیز به‌میزان زیادی کاهش می‌یابد. به‌منظور نشان دادن کاربردی بودن این روش دو پروتئین نوترکیب بروسلا ملی تنسیس با ویژگی‌های متفاوت مورد آزمایش قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### بیان

پلاسمیدهای بیانی pET28a-*dnak* و pDEST-*omp*31 بروسلا ملی‌تنسیس به‌درون باکتری *E.coli* Bl21(DE3) با استفاده از شوک دمایی در ۴۲ درجه ترانسفورم شد. اخیراً نشان داده‌ایم که این دو پلاسمید توانایی بیان دو پروتئین نوترکیب DnaK و Omp31 بروسلا ملی تنسیس را دارند (۱۲). یک کشت مایع ۱۲ ساعته به‌عنوان استارتر از هرکدام تهیه شد و این کشت به‌درون ۵۰۰ سی‌سی محیط LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (برای کشت باکتری‌های حاوی پلاسمید pET28a-*dnak*) ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین (برای کشت باکتری‌های حاوی پلاسمید pDEST-*omp*31) اضافه قبل گردید و بعد از رسیدن به جذب نوری[4] ۰/۵ ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوز (IPTG) یک میلی‌مولار اضافه شد. سپس به‌مدت ۲۲ ساعت در دمای ۲۰ درجه با سرعت ۲۵۰۰rpm هوادهی شدند. از پلت‌گیری ۱۰ سی‌سی از هر کدام از محیط‌های کشت به‌منظور بررسی حلالیت و یا عدم حلالیت پروتئین‌های بیان شده برداشته شد. پلیت حاصل از باکتری‌های رشد کرده با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌دست آمد و در ۷۰- درجه برای استفاده در مراحل بعد نگهداری شد (۱۲).

### تعیین حلالیت و عدم حلالیت پروتئین‌های نوترکیب:

در این تست از روش وسترن بلات استفاده گردید. این روش دو مزیت دارد. ۱) هم بیان پروتئین را می‌توان اثبات کرد و ۲) هم پی به حلالیت و عدم حلالیت پروتئین‌های بیان شده برد. از ۱۰ سی‌سی محیط به‌دست آمده در مرحله قبل، رسوب به‌دست آمد و این رسوب در یک سی‌سی بافر PBS حل شد. از این سوسپانسیون به‌طور جداگانه ۱، ۳ و ۵ میکرولیتر برداشته، دوباره

[4] Optical Density



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

سوسپانسیون را با سرعت ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ کرده و این بار ۵ میکرولیتر از مایع رویی برداشت شد. به نمونه‌های جمع‌آوری شده بافر نمونه اضافه و در ژل آکریلامید لود شد. تست وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پلی‌هیستیدین کونژوگه HRP شرکت روش[5] همان‌طور که قبلاً توصیف داده شده است انجام گرفت (۱۴).

**تخلیص پروتئین نوترکیب و جداسازی اندوتوکسین از آن**

با مشخص شدن محلولیت پروتئین نوترکیب DnaK و عدم محلولیت پروتئین نوترکیب Omp31 با استفاده از دستورالعمل شرکت کیاژن[6] تخلیص پروتئین‌های نوترکیب صورت گرفت با این تفاوت که به‌منظور جداسازی اندوتوکسین مرحله‌ای به موازات روش استاندارد تخلیص انجام گرفت که در این روش به بافرهای شستشو میزان ۰/۱ درصد Triton-X114 (Sigma ،USA) اضافه گردید. بعد از اتمام شستشو، با بافر حاوی غلظت ۱ مولار ایمیدازول پروتئین‌های نوترکیب از Ni-NTA آگاروز جدا شد. و به‌منظور جداسازی ایمیدازول هم محلول پروتئینی به‌مدت یک شب در دمای ۴ درجه در بافر PBS دیالیز شدند.

**بررسی غلظت پروتئین‌های نوترکیب و اندوتوکسین همراه آن‌ها**

غلظت پروتئین‌های به‌دست آمده در روش برادفورد به‌منظور تعیین میزان اندوتوکسین، با استفاده از دستورالعمل تهیه شده توسط شرکت لونزا[7] انجام گرفت. در نهایت میزان باقی‌مانده Triton-X114 در محصول نهایی پروتئین نوترکیب، با خوانش محلول پروتئینی در ۲۸۰OD به‌دست آمد (۱۳).

## یافته‌ها

پروتئین‌های نوترکیب DnaK و Omp31 به‌ترتیب محلول و غیرمحلول در بافر PBS هستند (شکل ۱). بنابراین برای تخلیص آنها از بافرهای بدون اوره و دارای اوره استفاده شد.




شکل ۱) آزمایش تعیین محلولیت و یا عدم حلالیت پروتئین‌های نوترکیب Dnak و Omp31 با استفاده از روش وسترن بلات
(۱) ۵ میکرولیتر از لیزات حاصل از باکتری‌های سونیکه شده (۲) ۱ میکرولیتر از لیزات مایع‌رویی حاصل از سانتریفیوژ (۳) ۲ میکرولیتر از لیزات مایع‌رویی حاصل از سانتریفیوژ (۴) ۳ میکرولیتر از لیزات مایع‌رویی حاصل از سانتریفیوژ (۵) ۵ میکرولیتر از لیزات مایع‌رویی حاصل از سانتریفیوژ

[5] Roche, Germany
[6] Qiagen, Germany
[7] Lonza, Switzerland



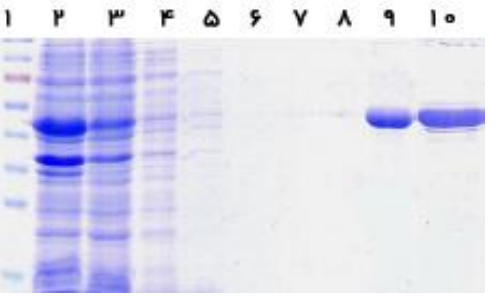
[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

میزان پروتئین به‌دست آمده از پروتئین نوترکیب DnaK به‌مراتب بیشتر ازOmp31 بود (جدول ۱). استفاده از Triton-X114 می‌تواند به‌میزان بسیار زیادی باعث جداسازی اندوتوکسین از پروتئین‌های نوترکیب شود (جدول ۱).

**جدول ۱) میزان اندوتوکسین همراه دو پروتئین نوترکیب تخلیص شده با دو روش استاندار و روش دارای Triton-X114**

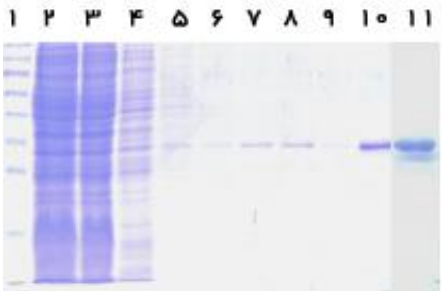
| نام نمونه ها | ایزوالکتریک pH | استفاده از Triton-X114 | شرایط تخلیص | بازیابی پروتئین | EU mg/1 |
|---|---|---|---|---|---|
| DnaK | ۴/۹۷ | - | N | mg/l۱۶ | >۱۰۰۰۰ |
| | | + | N | mg/l۱۳ | <۰/۰۵ |
| Omp31 | ۵/۰۶ | - | D | mg/l۴ | >۱۰۰۰۰ |
| | | + | D | mg/l۳ | <۰/۰۵ |

همچنین هیچ مقداری از Triton-X114 در محصول نهایی قابل ردیابی نبود. علاوه‌بر این، غلظت نهایی پروتئین نوترکیب نهایی به‌دست آمده در روشی که Triton-X114 استفاده شد، ۸۰ درصد روش استاندارد بود (شکل‌های ۲ و ۳ و جدول ۱). باید به این نکته توجه داشت که تمام این روش‌ها باید در دمای ۴ درجه صورت بگیرد.




شکل ۲) بررسی مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب Dnak با استفاده از ژل ۱۲ درصد آکریلامید در SDS-PAGE

۱) مارکر وزن مولکولی (Fermentase SM ۶۷۱) ۲) لیزات ۳) فلوترو(flow through) ۴-۶) فراکشن‌های حاصل از شستشو با بافر حاوی ۲ میلی‌مولار ایمیدازول ۷و۸) فراکشن‌های حاصل از شستشو با بافر حاوی ۴۰ میلی‌مولار ایمیدازول ۹) پروتئین حاصل از شستشو با بافر ۱ میلی‌مولار ایمیدازول ۱۰) پروتئین نوترکیب حاصل از استفاده از روش استاندار (بدون استفاده از دترجنت)




شکل ۳) بررسی مراحل تخلیص پروتئین نوترکیب Omp31 با استفاده از ژل ۱۲ درصد آکریلامید در SDS-PAGE

۱) مارکر وزن مولکولی (Fermentase SM ۶۷۱) ۲) لیزات ۳) فلوترو(flow through) ۴-۶) فراکشن‌های حاصل از شستشو با بافر حاوی ۲ میلی‌مولار ایمیدازول ۷-۹) فراکشن‌های حاصل از شستشو با بافر حاوی ۴۰ میلی‌مولار ایمیدازول ۱۰) پروتئین حاصل از شستشو با بافر ۱ میلی‌مولار ایمیدازول

## بحث

برچسب پلی‌هیستیدین در تولید و تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به‌وسیله کروماتوگرافی میل ترکیبی فلز تثبیت شده (IMAC) کاربرد زیادی دارد. IMAC بر پایه اتصال بین یک یون فلزی مانند نیکل تثبیت شده روی یک بستری مانند آگاروز و یک اسید آمینه خاص است. هیستیدین قوی‌ترین اتصال را با بسترهایی که روی آن‌ها یون فلزی تثبیت شده است برقرار می‌کند. پس از شستشوی بستر، پروتئین‌های واجد پلی‌هیستیدین با تنظیم pH بافر ستون یا اضافه کردن ایمیدازول به‌سهولت خارج می‌شوند. توانایی این روش بسیار بالاست و می‌تواند بیشتر از ۹۵ درصد محصول نوترکیب خالص در اختیار ما بگذارد (۱۵ و ۱۶). اما با این روش نمی‌توان پروتئین نوترکیبی به‌دست آورد که عاری از اندوتوکسین باشد. از این رو روش‌های متفاوتی به‌منظور جداسازی مولکول‌های اندوتوکسین از پروتئین نوترکیب به‌کار رفته است. امروزه نقش Triton-X114 به‌عنوان دترجنتی که دارای توانایی جداسازی اندوتوکسین از پروتئین‌ها است، شناخته شده است (۱۷).

در این مطالعه ما روشی را معرفی کردیم که با استفاده



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

از این دترجنت در مراحل شستشوی تخلیص پروتئین نوترکیب، به‌طور همزمان می‌توانیم هم مرحله تخلیص پروتئین نوترکیب را انجام دهیم و هم می‌توان اندوتوکسین را تا میزان کمتر از ۰/۰۵EU میلی‌گرم در لیتر کاهش داد. با استفاده از این روش اصلاح شده، میزان محصول نهایی ۸۰ درصد محصول به‌دست آمده با استفاده از روش استاندارد است و این موضوع احتمالاً به‌دلیل واکنش‌های قوی میان اندوتوکسین و پروتئین نوترکیب است که در هنگام جداسازی اندوتوکسین، قسمتی از پروتئین نوترکیب نیز همراه اندوتوکسین جدا می‌شود.

در مطالعه‌ای که توسط ریشلت (Reichelt) و همکاران انجام گرفته است، آن‌ها نیز از این دترجنت در مراحل شستشوی تخلیص به‌منظور جداسازی اندوتوکسین از پروتئین نوترکیب استفاده کردند و توانسته‌اند مشابه یافته‌های ما، بیشتر از ۹۹ درصد از اندوتوکسین را از محصول نوترکیب نهایی جدا کنند (۱۳)، اما محصول نهایی پروتئین نوترکیب آن‌ها هیچ کاهشی نسبت به‌روش استاندارد نداشت و این می‌تواند به‌دلیل خصوصیات فیزیولوژیکی آن پروتئین‌ها و اتصال کمتر با اندوتوکسین نسبت به پروتئین‌های ما باشد.

در نتیجه استفاده از Triton-X114 مراحل شستشوی تخلیص پروتئین نوترکیب می‌تواند روش مناسب و کم هزینه‌ای باشد که در وقت کم، محصول نهایی با میزان حداقل از اندوتوکسین را به ما بدهد.

## سپاس و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و پژوهشگاه ابن سینا جهاد دانشگاهی تهران به دلیل حمایت‌های مالی و اجرای این پژوهش اعلام می‌دارند.

## References:

1.Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene 1988; 67: 31-40.
2.Maina CV, Riggs PD, Grandea AG, 3rd, et al. An Escherichia coli vector to express and purifyforeign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. Gene 1988; 74: 365-73.
3.Ghasemi A, Salmanian AH, Sadeghifard N, et al. Cloning, expression and purification of Pwo polymerase from Pyrococcus woesei. Iran J Microb 2011; 3: 118-22.
4.Bito LZ. Inflammatory effects of endotoxin-like contaminants in commonly used protein preparations. Science 1977; 196: 83-5.
5.Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. Am J Pathol 1978; 93: 526-618.
6.Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol 2000; 76: 97-119.
7.Pyo SH, Lee JH, Park HB, et al. A large-scale purification of recombinant histone H1.5 from Escherichia coli. Protein Expr Purif 2001; 23: 38-44.
8.Anspach FB, Hilbeck O. Removal of endotoxins by affinity sorbents. J Chromatogr A 1995; 711: 81-92.
9.Petsch D, Beeskow TC, Anspach FB, et al. Membrane adsorbers for selective removal of bacterial endotoxin. J Chromatogr Biomed Sci App 1997; 693: 79-91.
10.Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. J Immunol Methods 1990; 132: 191-5.
11.Franken KL, Hiemstra HS, van Meijgaarden KE, et al. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. Protein Expr Purif 2000; 18: 95-9.
12.Ghasemi A, Salari MS, Zarnani AH, et al. Immune reactivity of Brucella melitensis-vaccinated rabbit serum with recombinant Omp31 and DnaK proteins. Iran J Microbiol 2013; 5: 19-23.
13.Reichelt P, Schwarz C, Donzeau M. Single step protocol to purify recombinant proteins



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

with low endotoxin contents. Protein Expr Purif 2006; 46: 483-8.
14.MacPhee DJ. Methodological considerations for improving Western blot analysis. J Pharmacol Toxicol Methods 2010; 61: 171-7.
15.Hamidiyeh F, Shirazi MH, Fallah Mehrabadi J, et al. PapG Gene cloning, Escherichia coli uropathogen and examination of its subsequence diversity. ISMJ 2013; 16: 1-8.
16.Hengen P. Purification of His-Tag fusion proteins from Escherichia coli. Trends Biochem Sci 1995; 20: 285-6.
17.Chataing B, Concepcion JL, Lobaton R, et al. Inhibition of Trypanosoma cruzi growth in vitro by Solanum alkaloids: a comparison with ketoconazole. Planta Med 1998; 64: 31-6.

[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]

**ISMJ 2014; 17(4): 516-523**

***Original Article***

# Expression, Purfication and endotoxin removal of Brucella melitensis DnaK and Omp31 proteins

*A. Ghasemi [1], MH. Salari [1*], AH Zarnani [2, 3], M. Jeddi-Tehrani [4]*

*[1] Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*
*[2] Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, IRAN*
*[3] Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*
*[4] Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, IRAN*

**(Received 18 Jul, 2012 Accepted 11 Aug, 2012)**

***Abstract***

**Background**: New strategies are needed to protect against Brucella melitensis infection. Subunit vaccines offer a promising approach because they can stimulate both cellular and humoral immunity, so high production of recombinant protein with less content of endotoxin is desired. In present study, we described a method for expression and purification of B.melitensis recombinant DnaK(rDnaK) and Omp31(rOmp31) proteins while less content of endotoxins were detected in final product.

**Material and Methods:** Recombinant pET-*dnak* and pDEST-*omp*31 plasmids were transformed into competent expression host *E.coli* BL21 (DE3). After induction by IPTG, bacteria were grown at 20°C for 22h. Then recombinant proteins were purified by Ni-NTA Agarose. Purification was done while two methods using Triton X-114 in washing steps and standard protocol (without detergent) were used in parallel.

**Results**: rDnak and rOmp31 were purified by using Urea. We could obtain 20 and 8 mg recombinant proteins from rDnak and rOmp31 from 1 liter medium, respectively. The amount of endotoxins in final products was less content of 0.05 EU/mg. Furthermore, recovery of protein was up to 80% as compared to the standard protocol.

**Conclusion:** The method used in this study, gives a product with very low extent of endotoxin, but 20% of recombinant proteins were lost. So we think the method described here can be used for purification and endotoxin removal of other recombinant proteins with similar physiologic properties.

**Keywords**: recombinant protein, purification, endotoxin, expression

***Address for correspondence*: Department of Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN; E-mail: mhsalari2002@gmail.com

**Website: http://bpums.ac.ir**
**Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir**

[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-29 ]