Dual application of hydroxyapatite tag in engineered PDGF peptide: purification and drug delivery

Maryam Sadeghi-Ardebili [1], Sadegh Hasannia [2]*, Bahareh Dabirmanesh [2], Ramazan Ali Khavari-Nejad [1]

1. Department of Cognitive Sciences, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran,Iran

Abstract

Aim and Background: The use of affinity tags is a conventional method for purifying recombinant proteins. However, their removal in later stages is mandatory for therapeutic peptides or proteins, which not only prolongs the purification process but also imposes significant costs on the producer. A peptide sequence with an affinity for hydroxyapatite allows for the purification of recombinant peptides or proteins while enabling their binding to hydroxyapatite-containing structures such as teeth, bones, and even bone grafts. This can play a significant role in biomaterials, tissue engineering, surgery, and dental implants. The goal of this study is to utilize affinity sequences that eliminate the need for removal after purifying the desired protein using affinity chromatography columns, which is a priority in biotechnology and therapeutics.

Material and Methods: In this study, a fusion peptide derived from platelet-derived growth factor (PDGF-BB) was designed, containing a hydroxyapatite-binding sequence and His6x tag. To remove the histidine tag, the sequence was designed with primers containing XhoI and NdeI restriction sites and was subsequently cloned into the pET21a (+) vector. Polymerase chain reaction (PCR) and double enzymatic digestion were performed. The designed fusion peptide was expressed in Escherichia coli, confirmed through SDS-PAGE electrophoresis, and verified using Western blotting. The recombinant fusion peptide was purified using hydroxyapatite resin. To evaluate peptide binding to the scaffold, a release test was conducted, which was assessed using the Bradford protein assay and curve analysis. Cellular viability, proliferation, and growth were examined via the MTT assay.

Results: Expression of the designed fusion peptide in Escherichia coli was optimized. Cloning in the pET21a(+) vector was confirmed after PCR and double enzymatic digestion through gene sequencing. The expression was validated by SDS-PAGE and Western blotting, showing a peptide band at approximately 17 kDa. The peptide release assay demonstrated that the PDGF-BB fusion peptide binds stably to the hydroxyapatite scaffold, preventing complete peptide release on the first day in SBF (Simulated Body Fluid). On the second day, approximately 40% of the peptide was released, followed by stabilization (plateau). The MTT assay revealed cell viability and proliferation over 24 hours, with maximum growth observed at a concentration of 2.9 µg/mL compared to the control group.

Conclusion: In this study, a novel peptide derived from PDGF-BB with stable performance was designed, expressed, and purified using hydroxyapatite resin. The dual-purpose use of the hydroxyapatite-binding affinity tag not only enhances its efficiency in purification processes using hydroxyapatite-based ceramic affinity columns but also serves as an affinity factor for bone scaffolds in tissue engineering.

Keywords: Hydroxyl apatite, Protein purification, PDGF-BB, Platelet- derived growth factor, Tissue engineering, Wound healing

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

Corresponding author:
Department of Basic Science, Imam Hossein, University, Tehran, Iran.
Email: jazrgan@ihu.ac.ir

استفاده دومنظوره از دنباله هیدروکسی آپاتیت در پپتید کایمریک PDGF: برای تخلیص و رهایش پپتید

مریم صادقی اردبیلی [۱]، صادق حسن نیا[۲]*، بهاره دبیرمنش[۲]، رمضانعلی خاوری نژاد[۱]

۱. گروه علوم شناختی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از دنباله‌های تمایلی از روش‌های مرسوم برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به شمار می‌آید. با این حال حذف آن‌ها در مراحل بعدی از الزامات پپتیدها یا پروتئین‌های دارویی است که این امر علاوه بر طولانی کردن مسیر تخلیص، هزینه‌های زیادی را به تولیدکننده تحمیل می‌کند. توالی پپتیدی دارای تمایل اتصال به هیدروکسی آپاتیت، علاوه بر امکان تخلیص پپتید یا پروتئین نوترکیب، موجب اتصال پپتید یا پروتئین‌ها به ساختارهای حاوی هیدروکسی آپاتیت مانند دندان، استخوان و حتی گرافت‌های استخوانی می‌شود که در بایومتریال، مهندسی بافت،جراحی‌ها و ایمپلنت‌های دندان می‌تواند نقش بسزایی ایفا نماید. هدف از انجام این تحقیق استفاده مناسب از دنباله هایی است که علاوه بر تخلیص پروتئین مورد نظر توسط ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی، نیازی به حذف دنباله وجود نداشته باشد که از اولویت‌های بیوتکنولوژی و درمان خواهد بود.

مواد و روش‌ها: در این پروژه، یک فیوژن پپتید مشتق شده از فاکتور رشد پلاکتیPDGF-BB طراحی شد که دارای یک توالی متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت و His6x می‌باشد. به منظور حذف توالی هیستیدینی، توالی مورد نظر توسط دو پرایمر حاوی توالی‌های برشی *Xho*I و *Nde*I طراحی و در پایان در وکتور pET21a(+) کلون شد. سپس، واکنش زنجیره پلیمرازی و هضم دوتایی آنزیمی صورت گرفت. فیوژن پپتید مورد نظر در باکتری *اشریشیا کلی* بیان شد و به روش الکتروفورز SDS-PAGE باند پپتید ملاحظه و در نهایت با وسترن بلات اثبات گردید. برای تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب از رزین هیدروکسی آپاتیت استفاده شد. جهت بررسی اتصال پپتید به داربست از تست رهایش استفاده شد که با استفاده از آزمون سنجش پروتئین به روش برادفورد و رسم منحنی ارزیابی گردید. برای بررسی زنده مانی، تکثیر و رشد سلولی تست سمیت سلولی (MTT ASSAY) انجام شد.

یافته‌ها: بیان فیوژن پپتید مورد نظر در باکتری *اشریشیا کلی* بهینه سازی شد. کلونینگ باکتری *اشریشیا کلی در وکتور* pET21a(+) بعد از PCR و هضم دوتایی آنزیمی با انجام توالی‌یابی ژنی، مورد نظر تایید واقع شد. تایید بیان توسط SDS-PAGE و وسترن بلات اثبات گردید. باند پپتید در محدوده وزنی حدود ۱۷ کیلو دالتون مشاهده شد . در آزمون رهایش پپتید مشاهده شد که فیوژن پپتید PDGF-BB قابلیت اتصال پایدار به داربست هیدروکسی آپاتیت را دارد که مانع از آزادسازی کامل پپتید در روز اول در محیط SBF می‌شود. در ادامه در روز دوم حدود ۴۰ درصد پپتید رهایش دارد و سپس به پلاتو می‌رسد . بررسی زنده مانی سلولی با انجام تست MTT نشان داد که سلول‌ها در طول ۲۴ ساعت تکثیر پیدا کرده و بیشترین رشد سلولی را طی ۲۴ ساعت در غلظت۲/۹میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل داشتند.

نتیجه‌گیری: در این پژوهش یک پپتید جدید مشتق شده از PDGF-BB با عملکرد پایدار طراحی، بیان و با کمک رزین هیدروکسی آپاتیت خالص شد. استفاده دو منظوره از دنباله تمایلی به هیدروکسی آپاتیت می‌تواند علاوه بر کارایی آن در روند تخلیص با ستون‌های افینیتی سرامیکی بر پایه هیدروکسی آپاتیت، به عنوان یک فاکتور تمایلی به داربست‌های استخوانی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: هیدروکسی آپاتیت، تخلیص پروتئین، فاکتور رشد پلاکتی، مهندسی بافت ، ترمیم زخم.

نویسنده مسئول:
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: hasannia@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱
تاریخ پذیرش:۱۴۰۲/۱۲/۰۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

مقدمه

دنباله‌های تمایلی به منظور خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب بسیار مورد توجه هستند. در طی سال‌های گذشته، دنباله‌های تمایلی زیادی توسعه یافته است که از جمله آن‌ها می‌توان به اپی توپ‌ها، پپتیدهای کوتاه، دمین‌های تاخورده پروتئینی و دنباله‌های چندعملکردی ترکیبی با توانایی بهینه سازی اشاره کرد (۱). دنباله تمایلی پلی هیستیدین یا His_{6x} از مرسوم‌ترین دنباله‌های مورد استفاده در خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب می‌باشد، با این وجود طول آن از دو تا ۱۰ هیستیدین متغیر است. اندازه کوچک و بار پلی هیستیدین به ندرت بر عملکرد پروتئین فیوژ شده به آن موثر است. این دنباله عمدتا برای تخلیص پروتئین‌های نوترکیب خصوصا در *ایشریشیا کلی*مورد استفاده قرار می‌گیرد زیرا پروتئین‌های موجود در سلول‌های پستانداران و حشرات دارای توالی‌های هیستیدینی زیادی است (۲). گلوتاتیون S-ترانسفراز[1] دیگر پروتئین تمایلی است که امکان تخلیص را توسط ستون کروماتوگرافی گلوتاتیون فراهم می‌کند. با این حال از آنجا که تخلیص به واسطه فیوژن پروتئین سلولی وابسته به تاخوردگی صحیح GST می‌باشد، تخلیص از حالت اجسام توده‌ای پروتئین با محدودیت مواجه می‌شود (۲). پروتئین متصل شونده به مالتوز (MBP) علاوه بر افزایش بیان و حلالیت پروتئین، امکان خالص‌سازی فیوژن پروتئین را با رزین آمیلوز فراهم می‌کند، با این حال با ترکیبات احیا کننده یا مواد دناتوره کننده سازگار نیست. ازشناخته‌شده ترین دنباله‌ها می‌توان به پپتید ۲۶ اسید آمین‌های متصل شونده به کالمودولین (CBP) موجود در برخی وکتورهای pET دارای پروموتر T7 hc نام برد که امکان اتصال فیوژن پپتید نوترکیب را در حضور غلظت فیزیولوژیک کلسیم به پروتئین کالمودولین فراهم می‌کند (۲). پروتئین یا پپتیدهای فیوژنی که با دنباله-های تمایلی، به منظور تولید پروتئین خالص طراحی شده‌اند، در مرحله نهایی با کمک یک پروتئاز مانند انتروکیناز، سوموپروتئاز، Tev و غیره جدا می‌شوندکه علاوه بر هزینه بالا، یک مرحله به تخلیص پروتئین یا پپتید هدف اضافه می‌کند. به منظور حذف آلودگی در تخلیص پپتیدهای دارویی بدین روش، به مراحل تخلیص بیشتری نیاز است. از این‌رو چنانچه بتوان از دنباله‌هایی استفاده کرد که علاوه بر تخلیص پروتئین مورد نظر توسط ستون‌های کروماتوگرافی تمایلی، نیازی به حذف دنباله وجود نداشته باشد، از اولویت‌های بیوتکنولوژی و درمانی خواهد بود. تاکنون، چندین مطالعه در خصوص پپتید-های متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت انجام شده است. این پپتیدها معمولا حاوی ۱۲-۳ اسیدآمینه هستند که یا به روش تکنیک کتابخانه فاژی تولید می‌شوند و یا از پروتئین‌های تمایلی برای هیدروکسی آپاتیت مانند استئوکلسین مشتق شده‌اند. هپتا پپتید برای بیوژنز مینای دندان به روش تکنیک بیان فاژی، شناسایی توالی پپتیدی به کمک روش بیان فاژی، سه پپتید ۱۲ اسیدآمینه‌ای جهت بازسازی استخوان و پپتید با توالی SVSVGMKPSPRPGGGK، مثال‌هایی در این راستا هستند (۷-۳). استفاده از هیدروکسی آپاتیت در ستون-های کروماتوگرافی پروتئینی برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب به طور قابل‌توجهی بین سال‌های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۹ افزایش یافته است. با این حال، امروزه استفاده از هیدروکسی آپاتیت در ستون‌های کروماتوگرافی به واسطه امکان اتصال آن به انواع پروتئین‌ها، پروتئین A، تجمعات آنتی‌بادی، دایمرها، اسیدهای نوکلئیک ویروس‌ها رو به افزایش است. پیشرفت‌های اخیر در شناسایی ویژگی‌های هیدروکسی آپاتیت، منجر به توسعه روش‌های تخلیص بر این اساس شده است (۸, ۹). مطالعات بر روی بررسی مکانسیم اتصال پپتید به هیدروکسی آپاتیت حاکی از این است که پپتید از طریق برهمکنش‌های الکترواستاتیکی بین بخش‌های کاتیونی پپتید و گروه‌های دارای بار منفی روی سطح کریستال متصل می‌شود. علاوه بر این مشخص شد که باقی‌مانده‌های کاتیونی نقش مهمی در اتصال دارند. بررسی‌های شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، نشان داد که ساختار پپتید یک عامل کمک‌کننده به مکانیسم چسبندگی است. این نتایج نشان می‌دهد که حتی تغییرات ساختاری کوچک می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر چسبندگی پپتید داشته باشد. ظاهرا ساختار خمیده پپتید به آن اجازه می‌دهد تا با تمایل بالا به هیدروکسی آپاتیت متصل شود (۱۰). غلظت بالای پروتئین‌های خاص در محل مورد نظر، در بسیاری از فرآیندهای زیستی بسیار مهم است، بدین منظور Tang و همکاران از یک حامل پپتید برای اتصال به هیدروکسی آپاتیت جهت افزایش تجمع فاکتور رشد BMP2 در محل ترمیم استخوان استفاده کردند (۱۱). Bang و همکاران پپتیدی با اختصاصیت بالا نسبت به هیدروکسی آپاتیت شناسایی کردند که می‌تواند در تصویربرداری اختصاصی از استخوان و دارورسانی مورد استفاده قرار گیرد

[1] GST

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

(۱۲). Huang و همکاران یک فیوژن پپتید آنتی میکروبی همراه با هپتا پپتید متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت تولید کردند که بعلت تمایل بالا برای اتصال به مینای دندان و خاصیت آنتی میکروبی، از تشکیل بیوفیلم بر روی دندان جلوگیری می‌کند (۱۳). پپتیدها در اصلاح مواد دندانی مانند چسب‌های دندانی و رزین‌های پایه دندان مصنوعی کاربرد دارند. یکی از نقاط ضعف محل اتصال کامپوزیت-دندان پوسیدگی مکرر می‌باشد (۱۴). محل اتصال کامپوزیت-دندان توسط یک سیستم چسب با ویسکوزیته کم پوشش داده می-شود. با این حال، هنگامی که یک مهر و موم شکننده توسط باکتری‌های پوسیدگی‌زا مانند استرپتوکوک موتانس[1] در عاج دندان (دنتین) به وجود بیاید، آنزیم‌ها، اسیدها و مایعات دهانی می‌توانند باعث پوسیدگی دندان شوند (۱۸-۱۵). حضور پپتید ضد میکروبی برای مهار حمله باکتریایی و پپتید متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت برای معدنی سازی مجدد ساختارهای دندان در چسب موجب بهبود ترمیم دندان می‌شود، پپتید ضد میکروبی با چسب دندانی ترکیب شده با نایسین از مهار کننده اثر مهاری قابل توجهی بر رشد *استرپتوکوک موتانس* داشته است (۲۱-۱۹). از طرف دیگر، بخش ترمیمی متصل به دنباله می‌تواند یک فاکتور رشد باشد. در این خصوص، پماد موضعی Becaplermin (Regranex®) که توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده در سال ۱۹۹۷ تایید شد، اولین فاکتور رشد نوترکیب انسانی است که حاوی فاکتور رشد پلاکتی[2] است و برای درمان زخم پای دیابتی مزمن در بیماران دیابتی و سایر زخم‌های مزمن مثل زخم بستر استفاده می‌شود (۲۲). بر اساس مطالعات قبلی، به نظر می‌رسد که PDGF می‌تواند روند بهبود زخم و بازسازی عروق را بهبود بخشد. افزایش تعداد بیماران مبتلا به زخم‌های حاد و مزمن و همچنین استفاده از PDGF در استخوان‌سازی جراحی‌های دندان، تولید نوترکیب این فاکتور رشد را تسریع می‌کند. با این حال، به دلیل هزینه بالا و نیمه عمر کم PDGF، چندین گروه از رویکردهای متفاوتی برای کاهش دوز موثر و افزایش پایداری آن استفاده کرده‌اند. پپتیدهای نوترکیب مشتق شده از زنجیره PDGF-B برای عمل به عنوان آگونیست یا آنتاگونیست PDGF طراحی شده‌اند. Angstrom و همکاران یک پپتید آنتاگونیست ۱۳ اسید آمینه‌ای (ANFLVWEIVRKKP) را از دنباله اسیدآمینه ۱۱۶ تا ۱۲۱ و ۱۵۷ تا ۱۶۳ زنجیره PDGF-B معرفی کردند (۲۳). Lin X و همکاران هم چنین یک پپتید آگونیست PDGF را با پیوند دادن بقایای اسیدآمینه ۱۵۳-۱۶۲ در زنجیره PDGF-B (VRKIEIVRKK) به یک توالی اتصال به هپارین (RKRKLERIAR) گزارش کردند (۲۴). علاوه بر این، Deptuła و همکارانش سه پپتید را بر اساس زنجیره‌های L1 و L3 در PDGF طراحی کردند که در مدل موش، اثرات تکثیری بر سلول‌های پوست انسان، پاسخ ایمنی کم، سمیت سلولی کم، و بهبود سریع زخم را نشان داد (۲۵). در مطالعه حاضر، یک توالی جدید مهندسی شده مشتق شده از فاکتور رشد پلاکتی PDGF-BB همراه با توالی متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت و توالی هیستیدینی برای بیان در باکتری *اشریشیا کلی* بهینه سازی و سنتز شد. به منظور حذف توالی هیستیدینی، توالی مورد نظر توسط دو پرایمر تکثیر و در وکتور pET21a(+) ساب کلون شد. فیوژن پپتید در سویه شافل *اشریشیا کلی* بیان و توسط رزین هیدروکسی آپاتیت خالص شد. با بررسی تست رهایش و پایداری آن قابلیت طراحی و تولید برای مصارف دارویی و درمانی و مهندس بافت مد نظر قرار گرفت.

مواد وروش‌ها

مواد و سویه‌های مورد استفاده

درمطالعه حاضر از وکتور pET21a(+) (Invitrogen، کالیفرنیا، آمریکا)، کیت استخراج پلاسمید (GenAll؛ کره جنوبی، کیت استخراج DNA از ژل (GenAll؛ کره جنوبی)، مستر میکس (Amplicon؛ دانمارک)، آنزیم‌های محدودکننده *Nde*I و *Xho*I (Thermo scientific، آمریکا) و آنزیم T4 DNA لیگاز (Thermo scientific، آمریکا) به منظور کلونینگ ژن مورد نظر در وکتور بیانی مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌های *اشریشیا کلی*DH5α و ®SHuffle/*اشریشیا کلی* (Novagen، آلمان) به ترتیب برای کلون و بیان پروتئین مورد نظر استفاده شد. ایزوپروپیل-بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، پپتون، آگار و عصاره مخمر از Biobasic (کانادا) خریداری گردید. آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه لوپ PDGF-B III و HRP از شرکت بیوتکنولوژی Santa Cruz (کالیفرنیا) تهیه شدند. رزین هیدروکسی آپاتیت شرکت BioRad (ایالات متحده) برای تخلیص پروتئین استفاده شد.

طراحی سازه نوترکیب

در این مطالعه، یک پپتید حاوی دو تکرار از توالی DNA کدکننده حلقه III فاکتور رشد PDGF-BB (ACQVRKIEIVRKKPIFKKATC) طراحی شد که توسط

[1] S. mutans

[2] PDGF-B

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

توالی لینکر $(G_4S)_2$ به یکدیگر متصل شده‌اند و در انتها توسط یک توالی متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت (SVSVGMKPSPRP) (۶) و توالی کدکننده His_{6x} به پایان می‌رسد. سازه ژنی مورد نظر توسط شرکت GenScriptدر وکتور pET21-a(+) بین توالی‌های برشی *Xho*I و *Nde*I بر اساس ارجحیت کدونی باکتری *اشریشیا کلی* سنتز شد. به منظور حذف توالی هیستیدینی انتهای پپتید، پرایمر رفت:

AAAAAAACATATGAGCGTGAGCGTTGGTA۳')
(۵'TGAAACCG

و برگشت:

(۵'AAACTCGAGTTACGGACGCGGGCTC۳') به ترتیب حاوی جایگاه‌های برش آنزیم *Nde*I و *Xho*I طراحی و سنتز شد. به منظور حذف توالی کدکننده His_{6x}، کدون پایان در پرایمر برگشت قبل از سکانس برشی آنزیم *Xho*I لحاظ شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط ۹۵ درجه سلسیوس ۳ دقیقه، و ۳۳ سیکل، ۹۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۶۷ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس۱۵ ثانیه و سپس برای ۱۰دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تولید قطعه مورد نظر انجام شد. محصول PCR و وکتور pET21a(+) پس از برش توسط آنزیم‌های محدودکننده *Nde*I و *Xho*I و خالص سازی توسط کیت استخراج DNA از ژل، مرحله لیگیشن توسط T4 DNA لیگاز صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب به سلول مستعد *اشریشیا کلی*DH5α به روش شیمیایی با شوک حرارتی منتقل شد. سپس از کلونی‌های تایید شده استخراج پلاسمید انجام گرفت. به منظور تایید کلونینگ از کلونی PCR، هضم پلاسمید نوترکیب به صورت همزمان با آنزیم‌های محدودکننده و توالی‌یابی توسط شرکت MacroGene (کره جنوبی) استفاده شد.

بیان فیوژن پپتید نوترکیب

پلاسمید نوترکیب به منظور بیان ژن وارد سویه شافل *اشریشیا کلی* شد. پس از کشت یک تک کلونی در محیط کشت LB حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر آمپی سیلین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۸ ساعت کشت داده شد. سپس از محیط‌های پیش کشت شبانه در محیط 2xyT حاوی ۱/۶ درصد تریپتون، یک درصد عصاره مخمر و ۰/۵ درصد سدیم کلرید و مقدار مناسب آنتی بیوتیک تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. وقتی کدورت باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۵رسید، بیان ژن توسط یک میلی مولار IPTG در دمای ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت القا شد.

۱ تا ۱/۵ لیتر از کشت پس از گذشت زمان مناسب از القا با ۴۰۰۰ rpm برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس رسوب داده شد. رسوب باکتری به دست آمده با افزودن بافر لیزکننده ۵ میلی مولار سدیم فسفات (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) به میزان یک و نیم برابر حجم رسوب به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از آن، سوسپانسیون حاصل تحت سونیکاسیون در شرایط ۵۰ درصد Amplitude، سیکل ۰/۵ و به صورت ۸ تا ۱۲ مرحله ۱۰ ثانیه‌ای با فواصل زمانی استراحت ۳۰ ثانیه‌ای، سلول‌ها شکسته شدند (۲۶). سلول‌های لیز شده در ۱۴۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز و مایع رویی برای آنالیز بیان پروتئین بر روی ژل آکریل آمید برده شد.

آنالیز SDS-PAGE

به منظور تایید بیان ژن از ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵ درصد در شرایط احیایی استفاده شد که در نهایت توسط رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی گردید.

خالص سازی فیوژن پپتید با ستون هیدروکسی آپاتیت

به منظور بررسی توانایی پپتید برای اتصال به ستون هیدروکسی آپاتیت، پروتئین نوترکیب با استفاده از این ستون تخلیص شد (۲۷). ستون حاوی رزین هیدروکسی آپاتیت BIORAD توسط بافر سدیم فسفات ۵ میلی مولار بدون نمک به تعادل رسید. سپس سوپ رویی لیز باکتری به ستون اضافه گردید. ستون با ۱۵ میلی‌لیتر بافر شست و شو ۵ و ۲۰ میلی مولار سدیم فسفات حاوی ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلراید شسته شد تا پروتئین‌هایی با اتصال غیر اختصاصی از ستون خارج شوند. سپس پپتید مورد نظر توسط بافر جدا سازی با غلظت‌های ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی مولار سدیم فسفات حاوی ۱۵۰ میلی مولار کلسیم کلرید از ستون خارج شد. فرآیند دیالیز برای پروتئین‌های جدا شده از ستون در مرحله آخر توسط کیسه دیالیز اسپکترا با منافذ ۳/۵ کیلو دالتون طی دومرحله ۲ و ۴ ساعت در ۴ درجه سلسیوس انجام شد. پس از انجام دیالیز، کیسه و محتویات آن در پلی اتیلن گلیکول با Grade 6000 قرار گرفت تا بدین ترتیب غلظت مناسبی از پپتید بدست آید. از روش برادفورد به منظور تعیین غلظت پروتئین استفاده شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

روش وسترن بلات

به جهت تایید باندهای تخلیص پپتید مورد نظر از روش وسترن بلات براساس لومینسانس شیمیایی استفاده شد (۲۸). در این روش پس از جداسازی مخلوط پروتئینی براساس اندازه در ژل SDS-PAGE، باندهای پروتئینی طی ۲ساعت به کاغذ PVDF منتقل شد که بافر انتقال شامل ۳ گرم تریس، ۱۴/۴ گرم گلایسین و ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول تنظیم شده در pH ۸/۳ بود. برای جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی، کاغذ در بافر PBST (بافر فسفات و سالین حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) حاوی BSA پنج درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و ۳ساعت در ۴ درجه سلسیوس همراه با شیک قرار گرفت. از آنتی‌بادی اولیه موشی اختصاصی علیه آمینواسیدهای ۱۵۴ تا ۱۹۰ ناحیه C ترمینال PDGF-BB (ناحیه لوپ III) محصول شرکت Santa Cruz (Cat. #: sc-365805) استفاده شد که توالی پپتید مورد نظر ما نیز در بر می‌گیرد. این آنتی‌بادی با رقت ۱:۲۰۰۰ درون PBST حل و به کاغذ اضافه شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه همراه با شیک قرار داده شد. پس از شستشو، آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه با HRP[1] علیه آنتی‌بادی اولیه اضافه شد. سپس معرف ECL[2] جهت واکنش اکسیداسیون با پراکسیداز HRP آنتی‌بادی ثانویه و تولید لومینانس اضافه شد. در فضای تاریک، کاغذ فیلم برداری بر روی غشا PVDF در تماس با باندهای پروتئینی قرار داده شد تا تصاویر باندها بر روی کاغذ عکس برداری ظاهر شود.

تست رهایش پپتید از داربست

به منظور بررسی قدرت اتصال و پایداری فیوژن پپتید به داربست کلاژن-هیدروکسی آپاتیت، تست رهایش پپتید انجام شد. برای انجام این آزمایش دو نمونه داربست در حضور و عدم حضور پپتید PDGF آماده شد. آماده‌سازی داربست کلاژن-هیدروکسی آپاتیت فرموله شده با پپتید با غلظت ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر و بدون پپتید توسط شرکت نواطب انجام شد و جهت انجام تست رهایش دراختیار این پژوهش قرارگرفت. بدین ترتیب، ابتدا داربست کلاژن-هیدروکسی آپاتیت سنتز شد و سپس با استفاده از NaOH، pH به ۵ / ۵ رسانده شد. سپس کم کم پپتید، به داربست کلاژن-هیدروکسی آپاتیت به صورت قطره قطره اضافه گردید، در این مرحله، با استفاده از بافر فسفات، pH داربست کلاژن-هیدروکسی آپاتیت به محدوده ۷ رسانده شد که سبب غلیظ و ویسکوز شدن کلاژن-هیدروکسی آپاتیت می‌گردد. کلاژن-هیدروکسی آپاتیت یک پلیت استریل ریخته و سطح آن با استفاده از یک کاردک استریل صاف پوشانیده شد و در نهایت تحت فرآیند FREEZE-DRY قرار گرفت. در نهایت، به نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر باف SBF[3] ;منطبق با استاندارد بین المللی با ایزو ۲۳۳۱۷-۲۰۱۴[4] اضافه گردید (۲۹). در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد و در فواصل زمانی مختلف به مدت ۸ روز میزان رهایش پپتید از داربست کلاژن-هیدروکسی آپاتیت اندازه‌گیری شد. درنهایت، نمونه‌های پپتید آزادشده در فاز محلول با روش برادفورد ارزیابی شدند.

بررسی تکثیر سلولی(MTT Assay)

تاثیر فاکتور رشد PDGF-BB بر بقا و رشد سلول‌های L929 طبق استاندارد ISO 2009: 5-10993 ارزیابی شد. سلول های L929 در چاهک‌های پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت (در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۵ درصد CO2، ۹۰ درصد رطوبت) انکوبه شدند. پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف پروتئین (۰/۱۸، ۰/۳۶، ۰/۷۲، ۱/۴۵و ۲/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) در سه تکرار به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت دیگر در شرایط مشابه انکوبه شد. به دنبال آن ۱۰ میکرولیتر معرف MTT (با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه و به مدت ۴-۲ ساعت انکوبه شد. سپس محلول MTT حذف شد و رسوب بنفش فرمازان در DMSO حل شد. در نهایت، به مدت ۳۰ دقیقه پلیت ۹۶ خانه هم زده شد و میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

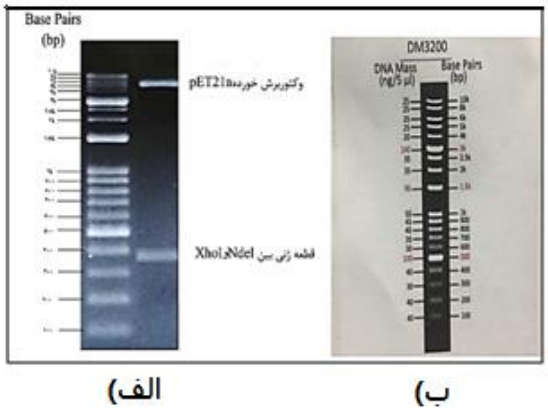
پپتید طراحی شده، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر و به کمک پرایمرهای طراحی شده توالی هیستیدینی انتهای ژن حذف و جایگاه‌های برش *Nde*I و *Xho*I در دو طرف ژن به منظور انتقال به وکتور جدید ایجاد شد. بعد از برش آنزیم دوتایی وکتور pET21a(+) و محصول PCR، توالی تکثیر شده در وکتور موردنظر درج شد و به سویه *اشریشیا کلی* DH5α منتقل گردید و بدین ترتیب ژن مورد نظر کلون شد. پس از استخراج پلاسمید، به منظور تایید کلونینگ از واکنش هضم آنزیمی دوتایی استفاده

[1] Horseradish Peroxidase

[2] Enhanced Chemiluminescence
[3] Simulated Body Fluid
[4] ISO 2014-23317

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

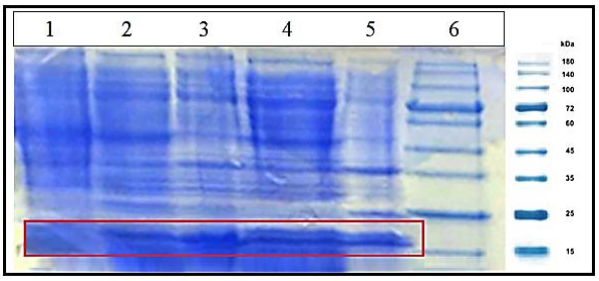
گردید شکل ۱-الف) در سمت راست تصویر ژل، نتایج حضور دو باند شامل وکتور برش خورده در ناحیه بالای ژل و ژن کد کننده پپتید PDGF-BB در محدوده تقریبی ۳۶۶ bp مشاهده می شودکه صحت انتقال وکتور حاوی فیوژن پپتید بدون His_{6x} را به باکتری‌ها تایید می‌کند .در همان شکل در سمت چپ تصویر ژل، لدرDNA ران شده در ژل مشخص می باشد. شکل ۱- ب) تصویر بروشور تجاری لدر DNA .وکتور برای توالی‌یابی ارسال شد و صحت توالی تایید گردید.



شکل ۱- بررسی نتایج کلونینگ بر روی ژل آگارز. الف،راست) حضور قطعه ۳۶۶ bp پس از کلونی PCR و محصول هضم آنزیمی توسط *NdeI* و *XhoI*. قطعه ژنی بدون توالی His_{6x} در ناحیه ۳۶۶ bp و وکتور pET21-a(+) برش خورده در ناحیه بالای ژن که نشان دهنده ساب کلونینگ صحیح ژن مورد نظر است.

نالیز SDS-PAGE

پس از تایید کلونینگ ژن، پلاسمیدهای نوترکیب pET21a(+) در *اشریشیا کلی* سویه شافل به روش شیمیایی با شوک حرارتی ترانسفرم شدند. از میان کلونی‌های ترانسفرم شده، سه کلونی جداسازی شد و پس از بررسی بیان ژن، بهترین کلونی انتخاب گردید. در نهایت بیان ژن با یک میلی مولار IPTG در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه طی ۶ ساعت القا شد. بعد از لیز سلول‌های حاصل از القا بیان، رسوب سلولی فیوژن پپتید بر روی ژل SDS-PAGE بررسی شد. باند فیوژن پپتید در ناحیه ۱۷ کیلو دالتون در سوپ قابل مشاهده است (شکل ۲).

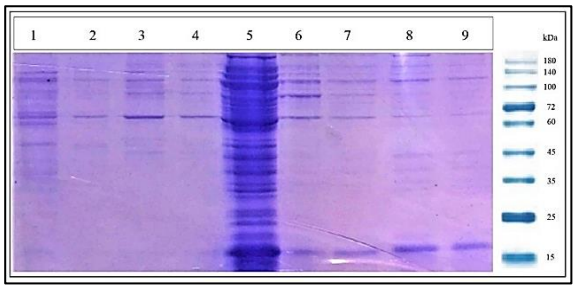


شکل ۲- بررسی بیان فیوژن پپتید ۱) کنترل منفی، ۲و۳) نمونه رسوب فیوژن پپتید ۴و۵) نمونه سوپ فیوژن پپتید ۶) مارکر پروتئینی

تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب با ستون هیدروکسی آپاتیت

رزین هیدروکسی آپاتیت، یک رزین ترکیبی با فرمول $Ca10(PO4)6(OH)2$ می‌باشد که حاوی گروه‌های فعال با بار مثبت یون‌های کلسیم و بار منفی اکسیژن‌های فسفات می-باشد. گروه‌های آمین سطح پروتئین در برهمکنش‌های الکتروستاتیک جذب گروه‌های فسفات می‌شوند و توسط یون-های کلسیم دفع می‌گردند. برای گروه‌های عاملی کربوکسیل به صورت معکوس رخ می‌دهد. pI محاسبه شده برای فیوژن پپتید نوترکیب ۱۰/۸۹ می‌باشد. افزایش بار مثبت در pH پایین‌تر از آن، موجب شد تا pH ۷/۴ برای تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد. در مراحل اولیه تخلیص از بافر سدیم فسفات با مولاریته کم برای کاهش دافعه حاصل از حضور یون‌های کلسیم و بهبود راندمان اتصال فیوژن پپتید به رزین هیدروکسی آپاتیت استفاده شد و در مراحل پایانی افزایش غلظت سدیم فسفات تا ۲۰۰ میلی مولار به جداسازی فیوژن پپتید از ستون کمک می‌کند. با وجود اینکه حضور نمک کلسیم کلرید به کاهش اتصال غیراختصاصی به ستون کمک می‌کند، پپتید همراه با برخی ناخالصی‌ها از ستون جدا شد (شکل ۳).

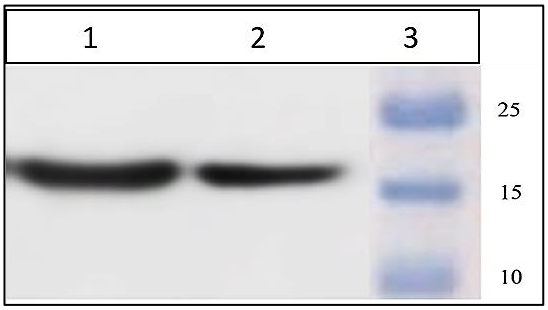
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]



شکل ۳- نتیجه SDS-PAGE تخلیص فیوژن پپتید با ستون هیدروکسی آپاتیت. ۱: بافر شست و شو ۵ میلی مولار سدیم فسفات، ۲: بافر شست و شو ۲۰ میلی مولار سدیم فسفات، ۳: بافر جداسازی ۴۰ میلی مولار سدیم فسفات، ۴: بافر جداسازی ۶۰ میلی مولار سدیم فسفات، ۵: فلو، ۶: بافر جداسازی ۸۰ میلی مولار سدیم فسفات، ۷: بافر جداسازی ۱۰۰ میلی مولار سدیم فسفات، ۸: بافر جداسازی ۲۰۰ میلی مولار سدیم فسفات، ۹: بافر جداسازی ۲۵۰ میلی مولار سدیم فسفات (همه‌ی بافرها حاوی ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلراید می‌باشد) و مارکر پروتئینی.

وسترن بلات

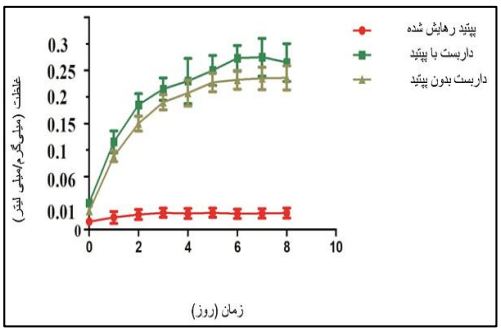
علاوه بر بررسی باندهای تخلیص شده به روش SDS-PAGE، وسترن بلات روشی مکمل برای شناسایی و تایید باندهای پروتئینی مورد نظر مباشد. به کمک این روش باندهای پپتید مورد نظر قبل و بعد از تخلیص بعد از SDS-PAGE به کاغذ PVDF منتقل شدند و با سوبسترای کموفلورسانس باندها بر روی کاغذ عکاسی پدیدار شدند. در این بررسی از آنتی‌بادی اختصاصی شناسایی کننده لوپ سوم PDGF-BB استفاده شد تا دقت انجام تست افزایش یابد. بررسی باند قبل و بعد از تخلیص انجام شد. همانطور که نتایج وسترن نشان می‌دهد، باندها در ناحیه ۱۷ کیلودالتون قابل مشاهده است که تاییدی بر وجود پپتید در بیان و تخلیص می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- نتیجه وسترن بلات قبل و بعد از تخلیص فیوژن پپتید. ۱) بیان فیوژن پپتید، ۲) پپتید تخلیص شده با رزین هیدروکسی آپاتیت ۳) مارکر پروتئینی

رهایش پپتید از داربست

به منظور بررسی قدرت اتصال فیوژن پپتید به داربست هیدروکسی آپاتیت، آزمون رهایش پپتید به صورت سه تکرار انجام شد. نمودار مربوطه نیز در شکل ۵ نشان داده شده است. اختلاف دو نمونه ۱ و ۲ بیانگر مقدار جذب مرتبط با پپتید رهاشده می‌باشد. نتایج نشان داد که بیشتر از ۴۰ درصد پپتید در روز اول رها شده و تقریباً از روز سوم به پلاتو[1] می‌رسد. $P < ۰,۰۵$ و معنی دار می‌باشد. در نتیجه پایداری اتصال پپتید به هیدروکسی آپاتیت را نشان داد (شکل ۵).



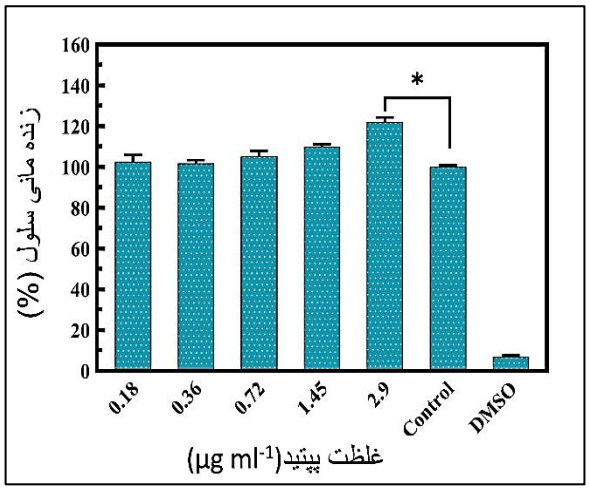
شکل ۵- نمودار آزمون رهایش پپتید به منظور بررسی قدرت اتصال پپتید به داربست هیدروکسی آپاتیت. دو سری نمونه با سه تکرار از نمونه داربست بدون پپتید و داربست با پپتید آماده و در محیط SBF در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند.در فواصل زمانی مختلف نمونه برداری انجام شد و جذب نمونه‌ها با روش برادفورد خوانش شد. اختلاف جذب دو نمونه مربوط به داربست بدون پپتید و داربست با پپتید محاسبه و به عنوان غلظت مربوط به پپتید رهاشده اعلام گردید. $P < ۰,۰۵$

بررسی سمیت سلولی(MTT Assay)

نتایج بررسی سمیت سلولی بر روی رده سلولی L929 نشان داد که در حضور پروتئین PDGF-BB تخلیص شده، سلول‌ها در طول ۲۴ ساعت تکثیر پیدا کرده و رشد سلولی بیشتری را در غلظت۲/۹میکروگرم بر میلی‌لیتر را نسبت به گروه کنترل نشان دادند (شکل ۶).

[1] Plateau

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]



شکل۶- بررسی زنده مانی سلولی با روش MTT. غلظت های ۰/۱۸ تا ۲/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر PDGF-BB جهت تست مورد استفاده قرار گرفت. از محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS به عنوان کنترل مثبت و DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شده است.

بحث

در مطالعه حاضر تلاش شد تا سیستمی جامع طراحی شود تا کمترین مقدار پپتید مشتق شده از PDGF-BB موردنیاز باشد که با کمک رزین هیدروکسی آپاتیت خالص سازی شود ودر نهایت برای اهداف درمانی و ترمیم زخم در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات ساختاری کریستالوگرافی کمپلکس PDGF-BB/PDGFR-ββ نشان داد که دو گیره در انتهای PDGF-BB وجود دارد که از سه حلقه بین رشته‌ای مشتق شده است (L1 متشکل از بقایای اسید آمینه ۳۸-۲۵، L3 متشکل از باقی مانده‌های آمینو اسید ۸۱-۷۸ و L2 متشکل از باقی مانده‌های اسید آمینه ۵۸-۵۳). از آنجایی که هر گیره در برهمکنش با یک مولکول گیرنده PDGFR-β است، هر دو مونومر گیرنده در برهمکنش با لیگاند نقش ایفا می‌کنند. حدود ۶۷ درصد از سطح تماس گیرنده/لیگاند توسط بازوی بلند (حلقه های L1 و L3) و بازوی کوتاه گیره (حلقه L1 و انتهای کربوکسیل) ناحیه تماس باقی مانده را می‌پوشاند. بخش‌هایی از انتهای آمین لیگاند نیز در ایجاد سطح تماس با گیرنده نقش دارند. برهمکنش‌های آبگریز ناشی از باقی-مانده‌های اسید آمینه Tyr205، Tyr207، Phe136 و Phe138 از PDGFR-β و Tyr40، leu38، Ile75، Ile77، و Pro82 از PDGF-B نقش مهمی در ایجاد تماس‌های لیگاند / گیرنده سطحی دارند (۳۹). در این تحقیق از پپتید HA-6-1 متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت در توالی پپتیدی خودمان که دارای دو نسخه توالی متصل شونده به رسپتور PDGF می‌باشد، جهت کاربرد اتصال پپتید به دندان در ایمپلنت‌های دندانی و القا ترمیم بافت، استفاده شد. هم چنین از دو لینکر G_4S برای اتصال توالی پپتیدی مشتق از PDGF به توالی پپتیدی متصل شونده به هیدروکسی آپاتیت برای انعطاف-پذیری بیشتر پپتید استفاده شد. علاوه بر این، چهار باقیمانده سیستئین در پپتید حضور دارند که بر اساس یک مطالعه پیشین، حضور آن‌ها در توالی موجب تسهیل در دایمر شدن گیرنده PDGF و در نتیجه القا بیشتر سیگنال میتوژنیک می-گردد (۶). در مطالعه حاضر، دو تکرار از ۱۸ اسید آمینه (Gln71-Thr88) از حلقه سوم PDGF-BB در طراحی فیوژن پپتید مورد توجه قرار گرفت. دنباله مشتق شده از PDGF-BB دارای سه بخش است: Gln71-Ile77، Pro82-Thr88 (به ترتیب انتهای آمین و انتهای کربوکسیل حلقه III، برای پایداری ساختار حلقه) و Val78-Lys81 حلقه III (محل اتصال به گیرنده).فیوژن پپتید مورد نظر دارای سه تکرار از توالی اسیدآمینه‌ای متمایل به هیدروکسی آپاتیت (SVSVGNKPSPRP) است. این پپتید که HA-6-1 نام دارد با خاصیت اتصالی بالا به هیدروکسی آپاتیت بلورین متصل می‌شود که این هیدروکسی آپاتیت ترکیب اصلی دندان می-باشد و در نتیجه می‌توان از ساختار طراحی شده به طور فزاینده‌ای در کاربردهای مهندسی بافت به عنوان ساختارهای حمایتی برای هدایت تمایز سلول بنیادی به سمت رده‌های سلولی استفاده نمود. هم چنین در طراحی توالی فیوژن پپتید مورد نظر علاوه بر توجه به اتصال صحیح فیوژن پپتید مشتق از PDGF-BB به گیرنده با قدرت اتصال بالا، تمرکز اصلی بر مسئله پایدارسازی پپتید مورد نظراست. مشابه یک مطالعه پیشین که از دنباله His-6 جهت برچسب میل ترکیبی داربست برای خالص سازی استفاده شد (۳۰). در مطالعه حاضر نیز از برچسب میل ترکیبی هیدروکسی آپاتیت HA-6-1 در ساختار پپتید فیوژن به منظور خالص سازی استفاده شد. از طرفی اتصال پپتید به دندان در ایمپلنت‌های دندانی و القای ترمیم بافت در آینده مد نظر قرار داشت . در مطالعه Hasannia و همکاران، بیان فیوژن پپتید نوترکیب با روش‌ها SDS-PAGE و وسترن بلات و تخلیص آن با رزین هیدروکسی آپاتیت تایید شد. در این بررسی مهاجرت باند روی ژل در محدوده ۱۲کیلودالتون گزارش شد (۳۱). در مطالعه حاضر نیز، اگرچه وزن مولکولی پپتید فیوژن نوترکیب در محدوده ۱۲ کیلو دالتون است، اما باند فیوژن پپتید روی ژل SDS-PAGE حدود ۱۷ کیلو دالتون مشاهده شد که احتمالاً به دلیل وجود ۱۰ درصد لیزین در ساختار آن است. بسیاری از اسید-های آمینه با بار مثبت باعث کاهش بار منفی کل پروتئین می‌شوند و در نهایت کندتر از وزن واقعی آن روی ژل SDS-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

PAGE حرکت می‌کنند. در مطالعات گذشته، اهمیت PDGF در تسریع ترمیم زخم به اثبات رسیده است، اما به دلیل ناپایداری ذاتی این پروتئین (نیمه عمر ۱۵ ساعت) حتی در شکل نوترکیب آن، انواع مطالعات جهت افزایش شکل پایداری از این پپتید انجام گرفت. به همین دلیل بسیاری از تحقیقات روی پپتیدهای مشتق از PDGF متمرکز شد (۲۴, ۳۲). هم چنین مطالعات مختلف دیگری به منظور افزایش پایداری فاکتورهای رشد در طی فرآیند ترمیم زخم صورت گرفته و راهکارهای متعددی استفاده شده است. استفاده از وزیکول-های حاوی فاکتورهای رشد، داربست‌های ۳ بعدی از جنس مواد سازگار با سیستم بیولوژیک بدن، استفاده از سیستم‌های میکرو و نانوذرات به جهت ایجاد پوشش و تولید فاکتورهای رشد نوترکیب انسانی به صورت موضعی یا تزریق به اطراف زخم از جمله روش‌های ابداع شده به جهت افزایش پایداری فاکتورهای رشد می‌باشد (۳۳،۳۴). وجود نواحی اضافی در فاکتورهای رشد موجب کاهش نفوذ آن‌ها، جهت عبور از بافت سخت و محکم اسکار شده و ممانعتی برای، نفوذ به زخم می-باشد (۳۳). در مطالعه‌ای که Ghasemi و همکاران در سال۲۰۲۰، بر روی خالص سازی ژن PDGF-BB انسانی در اشریشیا کلی انجام دادند مشاهده شد که پروتئین نوترکیب انسانی خالص شده PDGF-BB، دارای یک باند واضح بر روی ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) با وزن مولکولی در محدوده ۱۲ کیلو دالتون است و این پروتئین نوترکیب عملکرد بیولوژیکی مناسبی جهت کاربرد های درمانی دارد (۳۵). نتیجه این مطالعه همسو با مطالعه حاضر می‌باشد. هم چنین در مطالعه حاضر، بررسی سکانس توالی حلقه ۳ از PDGF-BB به عنوان ناحیه اتصالی قوی‌تر نسبت به سایر نواحی، برای اتصال به گیرنده انتخاب شد تا با بیان در سویه باکتریایی، تاثیر آن بر سلول‌ها و سپس فاز حیوانی ترمیم زخم مورد بررسی قرار گیرد. هدف از این اقدام القای مسیر سیگنالینگ PDGF تنها با دمین اتصالی آن می‌باشد تا بدین صورت علاوه بر کوچک‌تر کردن اندازه این فاکتور رشد و افزایش نفوذ پذیری آن، نیمه عمر و در نتیجه اثرگذاری آن افزایش یابد. با مطالعه‌ای که Dyson و همکاران بر روی تهیه پروتئین محلول و خالص سازی آن انجام دادند، مشخص شد که وزن مولکولی پروتئین بیان شده علاوه بر میزبان و شرایط بیان، نقش مهمی در حلالیت دارد. پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط ۲۲ کیلو دالتون می‌توانند محلول باشند، در حالی که اندازه‌ای بیش از ۴۰ کیلو دالتون برای افزایش حلالیت باید دارای لینکرهای تقویت کننده حلالیت باشند (۳۶). نتایج به دست آمده از SDS-PAGE در تحقیق حاضر نشان داد که فیوژن پپتید مورد نظر با وزن ملکولی ۱۷ کیلو دالتون به صورت محلول در فاز سوپ بعد از لیز باکتری می‌باشد. Hasannia و همکاران در سال ۲۰۱۹، یک پپتید پایدار بر پایه پپتید نوترکیب حاوی دنباله تمایلی به رزین هیدروکسی آپاتیت با کمک ستون کروماتوگرافی تخلیص کردند که در سویه *اشریشیا کلی* شافل[1] بیان شد (۳۱. هم چنین در مطالعه ای مشابه، Razazpour و همکاران با بررسی رهایش فیوژن پپتید با رزین هیدروکسی آپاتیت، گزارش دادند که پایداری و عملکرد مناسب این ترکیب منجر به پایین آمدن درصد رهایش پپتید می‌گردد (۳۷). بررسی فعالیت زنده مانی سلولی برای پروتئین تخلیص شده با روش MTT انجام شد. در مطالعات قبلی، تأثیر غلظت‌های مختلف (۰/۱ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) هر یک از فاکتورهای رشد، از جمله PDGF (۳۸)، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) (۳۹)، فاکتور رشد اصلاح‌کننده β (۴۰) و فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) بر افزایش تکثیر انواع مختلف سلول نشان داده شده است. در این بررسی مشاهده شد که PDGF-BB در غلظت ۲/۹میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر بالایی بر روی رشد و تکثیر سلولی سلول‌های L929، به نسبت کنترل مثبت که محیط کامل حاوی FBS ده درصد است، را دارد. نتایج این مطالعه با پژوهش حاضر کاملا همسو است، پژوهش حاضر نشان داد که که فیوژن پپتید PDGF-BB با رزین هیدروکسی آپاتیت دارای عملکرد و پایداری مناسبی جهت کاربرد در اهداف درمانی مهندسی بافت می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در انتها با در نظر گرفتن تمامی نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر و مقایسه این نتایج با بررسی‌ها گذشته می‌توان عنوان نمود که فیوژن پپتید مشتق شده از فاکتور رشد پلاکتی PDGF-BB با داربست رزینی هیدروکسی آپاتیت، با موفقیت طراحی و تخلیص شده است. در پایان به منظور حذف توالی هیستیدینی در وکتور pET21a(+) کلون و سپس در سویه شافل *اشریشیا کلی* بیان آن بهینه سازی شد و در نهایت، بیان آن توسط SDS-PAGE و وسترن بلات اثبات گردید. برای تخلیص فیوژن پپتید نوترکیب از رزین هیدروکسی آپاتیت استفاده شد. در ادامه، تست رهایش پپتید اثبات کرد که فیوژن پپتید ،PDGF-BB طراحی شده حاوی دنباله تمایلی به هیدروکسی آپاتیت، قابلیت اتصال پایدار به داربست

[1] Shuffle

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

هیدروکسی آپاتیت را دارد. بررسی‌های زنده مانی PDGF-BBطراحی شده بر سلول‌های L929، اثر رشد و تکثیر سلولی بیشتری در غلظت ۲/۹ میکروگرم بر میلی لیتر نشان دادند. نتایج این پژوهش با پژوهش‌های قبلی همسو بوده و پپتید فیوژن شده در رزین هیدروکسی آپاتیت طراحی شده می‌تواند جهت کاربرد در مهندسی بافت و اهداف درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند تعارض منافع وجود ندارد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکتری مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحدعلوم تحقیقات می‌باشد. از تمام کسانی که در این مطالعه ما را یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

منابع

1.Wood DW. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. Current opinion in structural biology. 2014 Jun 1;26:54-61. doi.org/10.1016/j.sbi.2014.04.006

2.Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of affinity tags for protein purification. Current protocols in protein science. 2013 Aug;73(1):9-.doi.org/10.1002/0471140864.ps0909s73

3.Lee JS, Wagoner Johnson AJ, Murphy WL. A modular, hydroxyapatite-binding version of vascular endothelial growth factor. Adv Mater. 2010 Dec 21;22(48):5494-8.doi.org/10.1002/adma.201002970.

4.Weiger MC, Park JJ, Roy MD, Stafford CM, Karim A, Becker ML. Quantification of the binding affinity of a specific hydroxyapatite binding peptide.Biomaterials.2010 Apr1;31(11):2955-63.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.012

5.Segvich SJ, Smith HC, Kohn DH. The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials. Biomaterials. 2009 Mar 1;30(7):1287-98.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.008

6.Roy MD, Stanley SK, Amis EJ, Becker ML. Identification of a highly specific hydroxyapatite-binding peptide using phage display. Advanced Materials. 2008 May 19;20(10):1830-6.doi.org/10.1002/adma.200702322

7.Mao J, Shi X, Wu YB, Gong SQ. Identification of specific hydroxyapatite {001} binding heptapeptide by phage display and its nucleation effect. Materials. 2016 Aug 17;9(8):700.doi.org/10.3390/ma9080700

8.Cummings LJ, Snyder MA, Brisack K. Protein chromatography on hydroxyapatite columns. Methods in enzymology. 2009 Jan 1;463:387-404.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63024-X

9.Snyder MA. Working with a powerful and robust mixed-mode resin for protein purification. BioProcess Int. 2011 May;9(5):50-3.

10.Duanis-Assaf T, Hu T, Lavie M, Zhang Z, Reches M. Understanding the adhesion mechanism of hydroxyapatite-binding peptide. Langmuir. 2022 Jan 7;38(3):968-78.doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02293

11.Tang W, Becker M. A Hydroxyapatite (HA)-Binding Peptide Functionalized Dendron: Design, Synthesis and application as a Growth Factor Carrier.

12.Bang J, Park H, Yoo J, Lee D, Choi WI, Lee JH, et al. Selection and identification of a novel bone-targeting peptide for biomedical imaging of bone. Scientific reports. 2020 Jun 29;10(1):10576. doi.org/10.1038/s41598-020-67522-4.

13.Huang ZB, Shi X, Mao J, Gong SQ. Design of a hydroxyapatite-binding antimicrobial peptide with improved retention and antibacterial efficacy for oral pathogen control. Scientific Reports. 2016 Dec 2;6(1):1-1. doi.org/10.1038/srep38410

14.Yuca E, Xie SX, Song L, Boone K, Kamathewatta N, Woolfolk SK, et al. Reconfigurable dual peptide tethered polymer system offers a synergistic solution for next generation dental adhesives. International Journal of Molecular Sciences. 2021 Jun 18;22(12):6552.. doi.org/10.3390/ijms22126552

15.Spencer P, Ye Q, Song L, Parthasarathy R, Boone K, Misra A, et al. Threats to adhesive/dentin interfacial integrity and next generation bio-enabled multifunctional adhesives. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2019 Nov;107(8):2673-83.. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34358

16.Hardan L, Lukomska-Szymanska M, Zarow M, Cuevas-Suárez CE, Bourgi R, Jakubowicz N, Sokolowski K, et al. One-Year Clinical Aging of Low Stress Bulk-Fill Flowable Composite in Class II Restorations: A Case Report and Literature Review. Coatings. 2021 Apr 25;11(5):504.doi.org/10.3390/coatings11050504.

17.Hardan L, Bourgi R, Cuevas-Suárez CE, Zarow M, Kharouf N, Mancino D, et al. The bond strength and antibacterial activity of the universal dentin bonding system: A systematic review and meta-analysis. Microorganisms. 2021 Jun 6;9(6):1230.doi.org/10.3390/microorganisms9061230.

18.Bourgi R, Daood U, Bijle MN, Fawzy A, Ghaleb M, Hardan L. Reinforced universal adhesive by ribose crosslinker: A novel strategy in adhesive dentistry. Polymers. 2021 Feb 26;13(5):704.doi.org/10.3390/polym13050704

19.Xie SX, Boone K, VanOosten SK, Yuca E, Song L, et al. Peptide mediated antimicrobial dental adhesive system. Applied Sciences. 2019 Feb 8;9(3):557. doi.org /10.3390/app9030557.

20.Su M, Yao S, Gu L, Huang Z, Mai S. Antibacterial effect and bond strength of a modified dental adhesive containing the peptide nisin. Peptides. 2018 Jan 1;99:189-94.doi.org/10.1016/j.peptides.2017.10.003.

21.Zhao M, Qu Y, Liu J, Mai S, Gu L. A universal adhesive incorporating antimicrobial peptide nisin: Effects on Streptococcus mutans and saliva-derived multispecies biofilms. Odontology. 2020 Jul;108:376-85.doi.org/10.1007/s10266-019-00478-8.

22.Wieman TJ, Smiell JM, Su Y. Efficacy and safely of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers: a phase III randomized placebo-controlled double-blind study. Diabetes care. 1998 May 1;21(5):822-7.doi.org/10.2337/diacare.21.5.822.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]

23.Engström U, Engström A, Ernlund A, Westermark B, Heldin CH. Identification of a peptide antagonist for platelet-derived growth factor. Journal of Biological Chemistry. 1992 Aug 15;267(23):16581-7. doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42042-X.

24.Lin X, Takahashi K, Liu Y, Derrien A, Zamora PO. A synthetic, bioactive PDGF mimetic with binding to both α-PDGF and β-PDGF receptors. Growth Factors. 2007 Jan 1;25(2):87-93.doi.org/10.1080/08977190701553449.

25.Deptuła M, Karpowicz P, Wardowska A, Sass P, Sosnowski P, Mieczkowska A, et al. Development of a peptide derived from platelet-derived growth factor (PDGF-BB) into a potential drug candidate for the treatment of wounds. Advances in Wound Care. 2020 Dec 1;9(12):657-75.doi.org/10.1089/wound.2019.1051.

26.Zhang P, Zhang G, Wang W. Ultrasonic treatment of biological sludge: floc disintegration, cell lysis and inactivation. Bioresource technology. 2007 Jan 1;98(1):207-10.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.002.

27.Doonan S. Chromatography on hydroxyapatite. Protein purification protocols. 2004:191-4.doi.org/10.1385/1-59259-655-X:191.

28.Haan C, Behrmann I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. Journal of immunological methods. 2007 Jan 10;318(1-2):11-9. doi.org/10.1016/j.jim.2006.07.027.

29.Implants for Surgery: In Vitro Evaluation for Apatite-forming Ability of Implant Materials: ISO Copyright Office.2012.International Organization for S.

30.Hwang YE, Im S, Cho JH, Lee W, Cho BK, Sung BH, et al. Semi-biosynthetic production of surface-binding adhesive antimicrobial peptides using intein-mediated protein ligation. International Journal of Molecular Sciences. 2022 Dec 2;23(23):15202.doi.org/10.3390/ijms232315202.

31.Bahri M, Hasannia S, Dabirmanesh B, Zadeh HH. Purification of Recombinant Fusion Peptide Containing Hydroxyapatite Affinity Tag Using Ceramic Chromatography Column. Modares Journal of Biotechnology. 2019 Dec 10;10(4):655-64.

32.Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. Physiological reviews. 2003 Jul;83(3):835-70.doi.org/10.1152/physrev.2003.83.3.835.

33.Park JW, Hwang SR, Yoon IS. Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration. Molecules. 2017 Jul 27;22(8):1259.doi.org/10.3390/molecules22081259.

34.Guo SA, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. Journal of dental research. 2010 Mar;89(3):219-29.doi/abs/10.1177/0022034509359125.

35.Ghasemi Y, Ghoshoon MB, Taheri M, Negahdaripour M, Nouri F. Cloning, expression and purification of human PDGF-BB gene in Escherichia coli: New approach in PDGF-BB protein production. Gene Reports. 2020 Jun 1;19:100653.. doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100653.

36.Dyson MR, Shadbolt SP, Vincent KJ, Perera RL, McCafferty J. Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression. BMC biotechnology. 2004 Dec;4:1-8.doi.org/10.1186/1472-6750-4-32.

37.Fateme R, Fatemeh G, Sima S, Moshaverinia A, Hasannia S. New engineered fusion peptide with dual functionality: antibacterial and strong binding to hydroxyapatite. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2020 Sep;26:1629-39.doi.org/10.1007/s10989-019-09963-8.

38.Vij N, Sharma A, Thakkar M, Sinha S, Mohan RR. PDGF-driven proliferation, migration, and IL8 chemokine secretion in human corneal fibroblasts involve JAK2-STAT3 signaling pathway. Molecular vision. 2008;14:1020.

39.Izumi K, Zheng Y, Li Y, Zaengle J, Miyamoto H. Epidermal growth factor induces bladder cancer cell proliferation through activation of the androgen receptor. International journal of oncology. 2012 Nov 1;41(5):1587-92.doi.org/10.3892/ijo.2012.1593.

40. Xiao L, Du Y, Shen Y, He Y, Zhao H, Li Z. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. Front Biosci (Landmark Ed). 2012 Jun 1;17(7):2667-74.doi:10.2741/4077.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-26]