บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180032

ชื่อโครงการ: การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรทีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เพื่อการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์คอนโดรซัยต์

ชื่อนักวิจัย: ดร. วราภรณ์ เกษกาญจน์

สถาบัน: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

E-mail: wkasekarn@hotmail.com

โปรตีน Bone morphogenetic proteins ชนิดที่ 2 (BMP-2) ของมนุษย์มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต การควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกและเนื้อเยื่อรอบกระดูก รวมถึงการซ่อมแซมโครงสร้างของกระดูก และสมานบาดแผลที่เกิดจากความผิดปกติของกระดูก งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการโคลนนิ่ง ศึกษาการแสดงออก และแยกบริสุทธิ์ของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน Bone morphogenetic proteins ชนิดที่ 2 ของมนุษย์ โดยใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรีย ยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ถูกสกัดแยกจากเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนของมนุษย์ โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวม และนำไปสังเคราะห์เป็น complementary DNA ยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ขนาด 342 คู่เบส(114 กรดอะมิโน) ถูกเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (PCR) จากนั้นทำการเพิ่มตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*R I, *Nco* I, กรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัว และตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด Factor Xa ในบริเวณปลายด้าน 5′ และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bam*H I ในบริเวณปลายด้าน 3′ ดีเอ็นเอที่ผลิตได้ถูกเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดเวคเตอร์โดยวิธีการเชื่อมต่อแบบปลายทู่ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ XL1-Blue ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีนสำหรับBMP-2 ของมนุษย์จากฐานข้อมูลสากลทุกประการ การศึกษาการแสดงออกของ BMP-2 ของมนุษย์ถูกศึกษาโดยการย้ายชิ้นยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวคเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 3 ชนิดและนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม จากการศึกษาการแสดงออกภายใต้การควบคุมด้วย T7 promotor พบว่าในกรณีที่ไม่มี fusion protein จะมีการแสดงออกของโปรตีนในรูปแบบ inclusion bodies เท่านั้น ในขณะที่หากมีการแสดงออกร่วมกับ fusion protein ชนิด trioredoxin จะพบว่ามีการแสดงออกในรูป soluble protein เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งจะยังคงพบการแสดงออกในรูป inclusion bodies ร่วมด้วย การผลิตริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ประสบความสำเร็จภายใต้การควบคุมด้วย lacUV5 and protein A promoters โดยมี fusion protein ชนิด ZZ protein และกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวทางด้านปลาย N ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot พบตำแหน่งของโปรตีนตำแหน่งเดียวตามขนาดของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่ถูกผลิตขึ้น การแยกบริสุทธิ์สำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ทำโดยเทคนิค nickel affinity

chromatography ปริมาณของริคอมพ์บิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่บริสุทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและกระดูกอ่อนของมนุษย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: รีคอมบิแนนท์โปรทีน Bone Morphogenetic Protein-2, โปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก, รีคอมบิแนนท์โปรทีน, แบคทีเรีย *Escherichai coli*, วิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน

Abstract

Project Code: MRG5180032

Project Title: Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) for Stimulation of Chondrocyte Development

Investigator: Dr.Waraporn Kasekarn

Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University

E-mail Address: wkasekarn@gmail.com

Bone morphogenetic proteins-2 (BMP-2) is a potent growth and differentiation factor for cartilage and bone induction and regeneration. BMP-2 regulates the chondrogenic and osteogenic differentiation and stimulates the synthesis of chondrocyte matrix components by human articular chondrocytes. The aim of this study is the cloning, expression, and purification of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) using *E.coli* expression system. A gene encoding human BMP-2 gene was isolated from human osteoblast cell line by extraction of the total RNA and reverse-transcribed into the complementary DNA. A single band at 342 bp (114 amino acids) was amplified by polymerase chain reaction (PCR). To facilitate the cloning and purification step, the restriction sites of *Eco*R I, *Nco* I, 6xHistidine tag and factor Xa were introduced at 5′ end, whereas *Bam*H I was incorporated at its 3′ end. The amplified product was ligated into the plasmid vector using blunt-end ligation and transformed into *E.coli* XL1-Blue. Nucleotide sequence analysis of insert fragment was the perfect similarity with human BMP-2 gene. Expression of human BMP-2 was investigated by sub-cloning the purified hBMP-2 gene after the restriction digestion, ligated into the expression vectors and transformed into *E.coli* strains. The expressed protein under the control of T7 promotor without fusion protein showed only the inclusion bodies, whereas the expressed protein with trioredoxin fusion protein appeared the soluble protein under low concentration of IPTG induction, although a significant portion of the expressed product remained as inclusion bodies in *E.coli* cells. Recombinant hBMP-2 protein was successfully expressed as the soluble protein under the control of the lacUV5 and protein A promoters with a fusion protein ZZ and histidine tag at its N-terminal. Analysis of the expressed protein by western blot analysis showed a single band of recombinant human BMP-2.The recombinant human BMP-2 was purified using nickel affinity chromatography. The availability of purified rhBMP-2 could be used as therapeutic agent for bone and cartilage tissue repair.

Keywords: bone morphogenetic protein-2, osteogenic protein, recombinant protein, *Escherichai coli*, cartilage tissue engineering