



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เพื่อการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์คอนโดรซัยต์

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

โดย

ดร. วรากรณ์ เกษกาญจน์

สิงหาคม 2557

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เพื่อการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์คอนโดรซัยต์

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

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. วราภรณ์ เกษกาญจน์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

2. รศ.ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัชฎา คงทวีเลิศ สังกัดภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณาเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง ซึ่งช่วยสนับสนุนทั้งในด้านวิชาการ ให้คำแนะนำต่างๆ เป็นที่ปรึกษาในการทำวิจัย ตลอดจนสนับสนุนด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย จนทำให้โครงการวิจัยสามารถดำเนินไปได้อย่างต่อเนื่อง ขอกราบขอบคุณ Prof. Dr. Ken Kitajima จาก Bioscience and Biotechnology Center มหาวิทยาลัยนาโกย่า ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนแบบอัตโนมัติ (N-terminal amino acid sequencer)

ขอขอบพระคุณ นายตะวัน โชคไพจิตรกุล ที่ช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านวิศวกรรมเนื้อเยื่อและสเต็มเซลล์ประเทศไทย ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และภาควิชาชีวเคมี รวมทั้งสถานบริการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการสนับสนุนอุปกรณ์เครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงานของโครงการวิจัยนี้

วราภรณ์ เกษกาญจน์

สิงหาคม 2557

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180032

ชื่อโครงการ: การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เพื่อการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์คอนดิโรซัยต์

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 และแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Bone morphogenetic proteins ชนิดที่ 2 ของมนุษย์ โดยใช้ระบบเซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรียสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ถูกสกัดแยกจากเซลล์เพาะเลี้ยงกระดูกอ่อนของมนุษย์ โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวม และนำไปสังเคราะห์เป็น complementary DNA ยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ขนาด 342 คู่เบส(114 กรดอะมิโน) ถูกเพิ่มจำนวนโดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) จากนั้นทำการเพิ่มตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoR* I, *Nco* I, กรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว และตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด Factor Xa ในบริเวณปลายด้าน 5' และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BamH* I ในบริเวณปลายด้าน 3' ดีเอ็นเอที่ผลิตได้ถูกเชื่อมต่อไปกับพลาสมิดเวกเตอร์โดยวิธีการเชื่อมต่อแบบปลายทู่ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ XL1-Blue ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์จากฐานข้อมูลสากลทุกประการ การศึกษาการแสดงออกของ BMP-2 ของมนุษย์ถูกศึกษาโดยการย้ายยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวกเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 3 ชนิดและนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสม จากการศึกษาการแสดงออกภายใต้การควบคุมด้วย T7 promotor พบว่าในกรณีที่ไม่มี fusion protein จะมีการแสดงออกของโปรตีนในรูปแบบ inclusion bodies เท่านั้น ในขณะที่หากมีการแสดงออกพร้อมกับ fusion protein ชนิด trioredoxin จะพบว่าการแสดงออกในรูปแบบ soluble protein เมื่อเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งจะยังคงพบการแสดงออกในรูปแบบ inclusion bodies ร่วมด้วย การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ประสบความสำเร็จภายใต้การควบคุมด้วย lacUV5 and protein A promoters โดยมี fusion protein ชนิด ZZ protein และกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัวทางด้านปลาย N ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี western blot พบตำแหน่งของโปรตีนตำแหน่งเดียวตามขนาดของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่ถูกผลิตขึ้น การแยกบริสุทธิ์สำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ทำโดยเทคนิค nickel affinity

chromatography ปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่บริสุทธิ์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและกระดูกอ่อนของมนุษย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: รีคอมบิแนนท์โปรตีน Bone Morphogenetic Protein-2, โปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก, รีคอมบิแนนท์โปรตีน, 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 *EcoR* I, *Nco* I, 6xHistidine tag and factor Xa were introduced at 5' end, whereas *BamH* 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, *Escherichia coli*, cartilage tissue engineering

หน้าสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)

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

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

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : อาจารย์ ดร. วราภรณ์ เกษกาญจน์

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. รัชฎา คงทวีเลิศ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคหรือภาวะความผิดปกติที่ความสัมพันธ์กับกระดูกและกระดูกอ่อน เป็นปัญหาสุขภาพของผู้สูงอายุที่สำคัญของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก รวมทั้งในประเทศไทย โดยปัจจุบันมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากจำนวนประชากรผู้สูงอายุในประเทศที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีความรู้และการบริการทางการแพทย์ที่ก้าวหน้าอย่างต่อเนื่อง และการรักษามีค่าใช้จ่ายสูงซึ่งเป็นปัญหาเป็นอย่างมากโดยเฉพาะประชากรในประเทศไทยซึ่งส่วนใหญ่มีรายได้น้อย อย่างไรก็ตามการรักษารอคหรือซ่อมแซมภาวะความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับสัมพันธ์กับกระดูกและกระดูกอ่อน มักมีข้อจำกัดเนื่องจากการขาดระบบหลอดเลือดที่มาเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีปริมาณน้อย การเจริญเติบโตของเซลล์รวมถึงเนื้อเยื่อต่างๆภายนอกเซลล์ซึ่งใช้ระยะเวลานาน ทำให้กระบวนการรักษาหรือซ่อมแซมเนื้อเยื่อเหล่านี้ในภาวะปกติจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาที่ยาวนานมาก และปัญหาพบได้มากขึ้นในกลุ่มผู้สูงอายุที่มีความเสื่อมถอยของประสิทธิภาพการเจริญพัฒนาของกระดูกและเนื้อเยื่อกระดูก

ในปัจจุบันมีการรายงานว่ากลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่า Bone morphogenetic proteins (BMPs) มีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโต การเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูกและเนื้อเยื่อกระดูก รวมถึงการซ่อมแซมโครงสร้างของกระดูก และสมานบาดแผลที่เกิดจากความผิดปกติของกระดูก นอกจากนี้ยังพบว่าควบคุมการเปลี่ยนแปลงหรือเจริญพัฒนาของเซลล์ (differentiation factors) มีผลทำให้เซลล์ต้นกำเนิด (mesenchymal stem cells) สามารถแทรกซึมเข้าสู่บริเวณที่จะมีการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นมาทดแทน ดังนั้นจึงได้มีการนำความรู้นี้มาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยมีการนำโปรตีนชนิดนี้มาช่วยในการรักษาทางออร์โธปิดิค โดยช่วยในการรักษาโดยตรงหรือช่วยส่งเสริมการยึดเกาะระหว่างวัสดุที่ใช้สำหรับโครงสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อที่ล้อมรอบวัสดุนั้น การนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการรักษาที่มีความจำเป็นต้องการกระตุ้นการสร้าง การซ่อมแซม และการเจริญเติบโตของกระดูกขึ้นมาใหม่ อย่างไรก็ตามระบบการเสริมสร้างของกระดูกและกระดูกอ่อนในผู้สูงอายุจำนวนมากมักมีปัญหาด้านระยะเวลาซึ่งต้องใช้เวลานาน จึงมีแนวคิดในการส่งเสริมการรักษาโดยใช้โปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตของกระดูก (Osteoinductive proteins หรือ Growth factor) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการชักนำองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆในการสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อกระดูกให้มีการ

เจริญเติบโต และมีการสร้างเนื้อเยื่อของกระดูกขึ้นมาใหม่ เพื่อช่วยลดระยะเวลาการรักษาและเพิ่มคุณภาพชีวิตต่อผู้สูงอายุ

มีรายงานการค้นคว้าวิจัยพบว่า Bone morphogenetic proteins ชนิดที่ 2 (BMP-2) ของมนุษย์มีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการนี้ โดยกระตุ้นการเจริญเติบโตและควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์กระดูก กระดูกอ่อนตั้งแต่ในระยะตัวอ่อนจนกระทั่งการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและกระดูกอ่อนอย่างสมบูรณ์ และยังพบว่าช่วยส่งเสริมการยึดเกาะระหว่างวัสดุที่ใช้เป็นโครงร่างของกระดูก และเนื้อเยื่อที่ล้อมรอบวัสดุนั้น มีการศึกษาวิจัยประสิทธิภาพของ BMP-2 ในสัตว์ทดลองหลายชนิด ร่วมกับตัวนำชนิดต่างๆ เช่น คอลลาเจน hydroxyapatite หรือ biodegradable polymers พบว่าสามารถช่วยในการซ่อมแซมความบกพร่องของกระดูกได้ การศึกษาทางคลินิกในมนุษย์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการรักษาของ BMP-2 โดยทำให้มีการแผ่ขยายของโครงสร้างโพรงจมูก (maxillary sinus floor) การสร้างกระดูกขึ้นมาใหม่เฉพาะที่ (localized bone regeneration) การซ่อมแซมเนื้อเยื่อในช่องปาก (periodontal repair)

ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมโปรตีนทำให้สามารถผลิตโปรตีนที่ต้องการได้ในปริมาณที่สูงตามความต้องการ ทำให้สามารถมีโอกาสนำมาพัฒนาการผลิตโปรตีนที่ต้องการที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีความบริสุทธิ์ปริมาณสูงเพียงพอที่จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาเข้าสู่การรักษาทางคลินิกได้ ในต่างประเทศเริ่มมีการนำมาใช้รักษาในทางคลินิก แต่อย่างไรก็ดีในประเทศไทยยังไม่มีให้นำโปรตีนชนิดนี้มาใช้ทางการแพทย์เนื่องจากมีราคาที่สูงมาก ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ในการรักษาสำหรับผู้ป่วยที่มีรายได้น้อยได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญและจำเป็นของการพัฒนาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด Bone morphogenetic protein-2 บริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้นได้เองในประเทศ เพื่อการรักษาและเพิ่มคุณภาพชีวิตให้กับผู้สูงอายุในประเทศไทยต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ โดยทำการโคลนยีนที่แยกได้จากเซลล์กระดูกระยะตัวอ่อน ศึกษาการแสดงออกของยีน และแยกบริสุทธิ์โปรตีนโดยอาศัยเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย

3. สรุปผลการวิจัย

-ยีนที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ถูกสกัดจากเซลล์กระดูกระยะตัวอ่อน (Human fetal osteoblast cell line) ทำการเตรียมอาร์เอ็นเอรวมและเปลี่ยนเป็น complementary DNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase ยีนขนาด 342 คู่เบสถูกเพิ่มจำนวนโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

-ยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ถูกเพิ่มตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoR* I, *Nco* I, กรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว และตำแหน่งสำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด Factor Xa ในบริเวณ

ปลายด้าน 5' และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BamH I* และ *Hind III* ในบริเวณปลายด้าน 3' เพื่อประโยชน์ในการโคลนนิ่งและการแยกบริสุทธิ์

-การหาลำดับเบสของจีนดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิดและเวกเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของยีน ถูกวิเคราะห์โดยอาศัยเทคนิคการตรวจหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ เพื่อเป็นการพิสูจน์ลำดับเบสที่ถูกต้อง ลำดับเบสที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลนานาชาติ ผลการวิเคราะห์พบว่า จีนดีเอ็นเอมีลำดับเบสตรงกับยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ 100% จึงสรุปได้ว่า จีนดีเอ็นเอที่ศึกษาคือ ดีเอ็นเอสำหรับยีน Bone morphogenetic protein-2 ของมนุษย์จริง

-การศึกษาแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิดที่ไม่มี fusion protein ภายใต้ T7 promoter พบการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ในรูปแบบ inclusion bodies ในส่วน pellet เท่านั้น ไม่พบการแสดงออกในส่วน supernatant เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ในขณะที่ผลการแสดงออกโดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิดที่มี Thio redoxin fusion protein พบว่า มีการแสดงออกของ hBMP-2 ขนาด 28 กิโลดาลตัน ในรูปแบบทั้ง soluble protein และพบ inclusion bodies ในส่วน pellet สรุปได้ว่าการมี Trx fusion protein ร่วมอยู่ด้วยสามารถช่วยการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ให้สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้

-คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ภายใต้การควบคุมของ lacUV5 promoter และ protein A promoter ในรูปแบบ soluble protein เมื่อมีการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C ภายใต้การชักนำด้วย 1mM IPTG โดยสรุปได้ว่าการมี fusion protein ชนิด ZZ สามารถช่วยให้โครงสร้างและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้

-การแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์สามารถใช้เทคนิค Ni-NTA affinity chromatography ได้

4. ผลงานที่ได้จากการวิจัย

- นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมระดับนานาชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Molecular Cloning of Gene Encoding Human Bone Morphogenetic Protein-2 ในการประชุม The 2nd Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA2009) "Integrated Research for Sustainable Development", 20th November 2009, Katsura Int'tech Center, Katsura Campus, Kyoto University, Japan (Abstract ในภาคผนวก)
- นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมระดับชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in *Escherichia coli* ในการประชุม "นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว." ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

- ได้ยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ และได้องค์ความรู้ในการศึกษารีคอมบิแนนท์โปรตีน Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยด้านกระดูกและกระดูกอ่อนต่อไป
- เผยแพร่ผลงานวิจัยประชุมระดับนานาชาติในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Molecular Cloning of Gene Encoding Human Bone Morphogenetic Protein-2” The 2nd Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA2009): Integrated Research for Sustainable Development, November 20, 2009 ณ มหาวิทยาลัยเกียวโต เมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น (Abstract ในภาคผนวก)
- เผยแพร่ผลงานวิจัยประชุมระดับชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in *Escherichia coli* ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)

บทนำ

Human articular cartilage is an avascular and anervous tissue composed of a highly organized and specialized acellular component, the extracellular matrix, and a sparse cellular component, the chondrocytes. In adult organism, it shows a slow tissue turnover and remodeling. Chondrocytes are surrounded by an abundant extracellular matrix (ECM) which composed of types of collagen (mainly collagen type II, IX and XI), proteoglycans (mainly aggrecan) and various types of glycoproteins such as fibronectin. They have a characteristic by low rate of cell division in the articular cartilage and their ability to expand the extracellular matrix containing the collagenous proteins and proteoglycans. Cartilage tissue engineering using chondrocytes as initial precursor requires the expansion of cell numbers on monolayer culture. The acquisition of chondrocytes for autologous transplantation is faced a major problem involving the losing their characteristic phenotype, collagen type II expression, fibroblastic appearance and proliferation. Dedifferentiated chondrocytes are found rapidly during the *in vitro* cultivation. Alternatively, the use of pluripotent or multipotent stem cells in place of committed tissue-specific cells represents an exciting new approach.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells that constitute a variety of adult tissues. MSCs maintain the self-renewal ability and the capability to differentiate to various connective tissues including cartilage and bone. *In vivo* implantation of these cells at orthotopic sites will also yield tissues in these lineages. The main source of MSCs is the bone marrow. MSCs are also located in other tissues like: adipose tissue, peripheral blood, umbilical cord blood, liver and fetal tissues. The induction of chondrogenesis in MSCs depends on the coordinated activities of many factors, including parameters such as cell density, cell adhesion, and growth factors. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are the key regulatory factors in chondrogenic and osteogenic differentiation, and also function in repair and remodeling of the adult skeletal system. BMPs exert diverse biological process ranging from early embryonic tissue patterning to postnatal tissue homeostasis. BMPs have been involved in the regulation of cell proliferation, survival, differentiation, apoptosis and stem cell properties. BMPs stimulate osteogenic differentiation in mesenchymal progenitor cells as well as increase stem cell numbers. BMPs are the multi-functional growth factors belonging to the TGF- β superfamily. Members of BMP family bind to two distinct type II and type I serine/threonine kinase receptors. BMP binding leads to dimerization of receptors prior to phosphorylation and signaling through the Smad pathway. In recent years experimental evidence accumulated that BMPs are the potent anabolic factors for development of articular cartilages and play their roles for the maintenance adult articular cartilage. The overlapping biological activities of

BMPs raise the possibility that each BMP molecule possesses distinct roles at determined time points in restricted sites during organogenesis or pattern formation. Among BMPs have been identified, BMP-2 has significant importance in chondrogenesis, bone development and the proteoglycan biosynthesis. Thus, BMP-2 is suggested as a promising candidate in cartilage tissue engineering of joint defects. The more information about the action of human BMP-2 on development and its role on chondrocyte is needed to be fulfilled. Therefore, it leads to interest for investigation of the human BMP-2 function on development and proliferation of bone and chondrocyte.

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ โดยทำการโคลนยีนที่แยกได้จากเซลล์กระดูกกระยะตัวอ่อน ศึกษาการแสดงออกของยีน และแยกบริสุทธิ์โปรตีนโดยอาศัยเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย

วิธีการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ Human fetal osteoblast cell line

เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Human fetal osteoblast cell line (hFOB1.19 (ATCC® CRL-11372™), Rockville, USA) ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ที่มี 10% fetal calf serum, 2mM glutamine, 50 U/ml penicillin G และ 50 µg/ml streptomycin โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO₂ และทำการเลี้ยงเซลล์จนได้ 80% confluent จึงนำไปสกัด Total RNA ต่อไป

2. การเตรียม Total RNA และ Complementary DNA (cDNA)

นำเซลล์เพาะเลี้ยง Human fetal osteoblast cell line (hFOB) ที่ทำการเลี้ยงตามวิธีการข้างต้นมาใช้ในการสกัดปริมาณอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA) ตาม protocol ของ Nucleospin® RNA II (Machere-Nagel, Germany) แล้วนำไปวัดปริมาณอาร์เอ็นเอโดยใช้เครื่อง spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอที่เตรียมได้ ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 90 volts และทำการย้อมแถบอาร์เอ็นเอด้วย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำไปใช้เป็นแม่แบบเพื่อสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) โดยอาศัย oligo (dT)₁₈ เป็นไพรเมอร์ ตามวิธีการมาตรฐานของ RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas life science) จากนั้นนำตัวอย่างไปใช้เป็นแม่แบบในการหาเพิ่มปริมาณยีนของ BMP-2 ของมนุษย์โดยเทคนิค Polymerase chain reaction

3. การเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์

ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ mature hBMP-2 ของมนุษย์ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้เป็นแม่แบบ ก่อนดีเอ็นเอถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับเบสของยีน mature hBMP-2 โดย Forward primer คือ 5'- CAAGCCAAACACAAACAGCG -3' และ Reverse primer คือ 5' GCGACACCCACAACCCTC -3' ขั้นตอนและสภาวะในการเพิ่มปริมาณปฏิกิริยา PCR หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมแล้วมีขั้นตอนดังนี้

อุณหภูมิ	94 °C	เป็นระยะเวลา	2	นาที
อุณหภูมิ	94 °C	เป็นระยะเวลา	45	วินาที
อุณหภูมิ	55 °C	เป็นระยะเวลา	1	นาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	1	นาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	5	นาที

โดยทำทั้งหมดจำนวน 35 รอบ องค์ประกอบต่างๆที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ได้จาก GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l หลังจากการเพิ่มจำนวนแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis ทำการตัดแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับยีน mature human BMP-2 ตามที่คำนวณไว้ และนำดีเอ็นเอมาแยกบริสุทธิ์ตามขั้นตอนของ Qiaquick[®] Gel Extraction kit (Qiagen) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มบริเวณลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยที่ปลาย 5' จะมีลำดับเบสจำเพาะสำหรับ *EcoR* I, *Nco* I ตามด้วยลำดับเบสสำหรับกรดอะมิโน Histidine จำนวน 6 ตัว และลำดับเบสสำหรับโปรตีน Factor Xa ส่วนที่ปลาย 3' จะออกแบบโดยเพิ่มลำดับเบสสำหรับการจดจำเพื่อหยุดการสร้างโปรตีน (stop codon) ปลายสุดเป็นบริเวณลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamH* I และ *Hind* III ดังนี้

Forward primer:

5'GAATTCGGCCATGGCTCATCACCATCACCATCACATCGAAGGGCGCCAAGCCAAACACAA 3'

Reverse primer: 5' CGCAAGCTTGGATCCTTAGCGACACCCACAACC 3'

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ขั้นตอนและสถานะในการเพิ่มปริมาณปฏิกิริยา PCR หลังจากการปรับสภาวะที่เหมาะสมแล้วมีขั้นตอนดังนี้

อุณหภูมิ	95 °C	เป็นระยะเวลา	5	นาที
อุณหภูมิ	95 °C	เป็นระยะเวลา	30	วินาที
อุณหภูมิ	58 °C	เป็นระยะเวลา	30	วินาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	30	วินาที
อุณหภูมิ	72 °C	เป็นระยะเวลา	5	นาที

โดยทำทั้งหมดจำนวน 30 รอบหลังจากนำมาวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis ที่ 90 volts ดีเอ็นเอตามตำแหน่งที่ต้องการถูกตัดและทำให้บริสุทธิ์ด้วย Qiaquick[®] Gel Extraction kit (Qiagen) เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์พาหะต่อไป

4. การโคลนยีน BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวกเตอร์พาหะ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

4.1 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับเวกเตอร์พาหะ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำชิ้น PCR product ที่จำเพาะต่อ hBMP-2 ข้างต้นมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์พาหะ โดยใช้ CloneJET[™] PCR Cloning kit (Fermentas) ด้วยอัตราส่วนระหว่าง เวกเตอร์: ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ 1:3 โดยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase ปฏิกิริยาถูกบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้มาเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1- Blue โดยวิธีการ Transformation แบบ Heat shock method โดยแช่ *E. coli* XL1- Blue competent cells 100 μ l ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นผสมกับ ligation product และแช่น้ำแข็งต่ออีก 30 นาที การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์กระทำที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาทีและแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วอีก 2 นาที

จากนั้นใส่ LB media ปริมาตร 900 μ l แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มียาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง

4.2 การคัดเลือก Recombinant clones และตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสม

โคลนที่สนใจซึ่งดื้อยาปฏิชีวนะ Ampicillin ถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาเลี้ยงใน LB ที่มี 100 μ g/ml Ampicillin การคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสมของยีน mature hBMP-2 ทดสอบโดยใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase chain reaction) เพื่อตรวจสอบยีนที่เราสนใจ นำโคลนที่สนใจมาเพิ่มปริมาณโดยการเลี้ยงใน LB ที่มี 100 μ g/ml Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ทำการสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย Plasmid Miniprep kit (Qiagen) แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตามที่ได้ออกแบบไว้เช่น *EcoR* I, *Nco* I, *Bam*H I, *Hind* III, หรือ *Bgl* II หรือตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 5-10 units/ μ g ของดีเอ็นเอที่ต้องการ และนำมาวิเคราะห์บน 1% agarose gel electrophoresis โดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 90 volts และทำการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

5. การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป

วิธีการนี้ใช้สำหรับการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์สูง โดยเลี้ยงพลาสมิดในเซลล์แบคทีเรียปริมาณ 5-10 มิลลิลิตรภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่ความเข้มข้น 100 μ g/ml ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง และทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) หรือ HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience) ตามวิธีการมาตรฐานของชุดสกัด ความเข้มข้นของพลาสมิดที่สกัดได้ถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และความบริสุทธิ์ของพลาสมิดที่สกัดได้คำนวณจากค่าอัตราส่วน A260/A280

6. การหาลำดับเบสโดยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (Automated DNA Sequencing)

การเรียงตัวของลำดับเบสสำหรับยีนที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์สามารถทำได้โดยนำโคลนที่สนใจซึ่งบรรจุอยู่พลาสมิดเวกเตอร์ pJET1.2, pEZZ18 หรือ pET vector มาเพิ่มปริมาณใน LB ที่มี 100 μ g/ml Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ทำการสกัดแยกพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย Plasmid Miniprep kit (Qiagen) แล้วนำไปวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเทคนิค Automated DNA Sequencing โดยใช้ pJET1.2 forward sequencing primer (5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3') หรือ reverse sequencing primer (5' AAGAACATAGATTTTCCATGGCAG 3') สำหรับ pJET1.2 vector หรือ ใช้

M13 forward sequencing primer (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') สำหรับ pEZZ18 vector หรือใช้ T7 terminator sequencing primer (5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3') สำหรับ pET32a vector ลำดับของเบสที่ได้ถูกแสดงผลด้วยโปรแกรม Chromas Lite 2.01 และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยสืบค้นจากฐานข้อมูลสากล GeneBank database จาก National Center Biotechnology Institute (NCBI) โดยใช้ Blast similarity search และลำดับเบสถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VectorNTI version 10.0

7. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย

ทำการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่มีเวกเตอร์พาหะบรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์ ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษา ใน LB media ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยเขย่า 180 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง overnight culture 0.7 ml ถูกเติมลงใน LB broth 70 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยเขย่า 180 rpm ที่ 37 °C จนกระทั่ง OD₆₀₀ มีค่า ~ 0.5 - 0.6 จากนั้นจึงเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 mM และเขย่าต่อไปที่อุณหภูมิ 30°C หรือ 37°C จนครบเวลา 0, 2, 4, 6 และ 20 ชั่วโมง ในแต่ละเวลาทำการเก็บ 10 ml เมื่อครบตามเวลาแล้วทำการเก็บเซลล์ด้วยการปั่นที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เซลล์ที่เก็บได้ถูกทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM Imdidazole, pH 8.0) หรือใช้สารละลาย B-PER II (Pierce) ที่มี 1mg/ml lysozyme และใช้วิธี freeze-thaw method 3 ครั้ง หรือใช้วิธีการแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic sonicator) โดยใช้ push on 2 sec, push off 1 sec, time 30 sec, amplitude 60% ทำซ้ำ 2 ครั้งแล้วจึงนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกส่วนใส (supernatant) และตะกอน (pellet) จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE

8. การวัดปริมาณโปรตีน

การทดลองใช้การวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford protein assay (Bio-Rad laboratories, USA) โดยมีหลักการคือใช้สี Coomassie Brilliant Blue G-250 ซึ่งสามารถจับกับกรดอะมิโนที่มีลักษณะเป็นเบสเช่น arginine หรือมีโครงสร้างของวงแหวนอะโรมาติกได้สารประกอบสีน้ำเงินที่มีสีเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของโปรตีน โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานคือ Bovine serum albumin ซึ่งเตรียมโดยการทำ two-fold serial dilutions ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 1,000 µg/ml สารละลายโปรตีนที่ต้องการทราบปริมาณถูกเตรียมโดยเจือจางในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 และนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย Bradford reagent เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นถูกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 nm

9. Polyacrylamide gel electrophoresis

15% SDS-PAGE ถูกเตรียมโดยใช้ 15% separating gel และ 4% stacking gel ตามวิธีมาตรฐาน หลังจากที่ได้เจล polymerized อย่างสมบูรณ์แล้วจึงหยอดตัวอย่างโปรตีนที่ปริมาณ 10 µg หรือปริมาณตามต้องการลงในแต่ละหลุม โดยโปรตีนนั้นถูกผสมกับ loading dye ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นจึงผ่านกระแสไฟฟ้าที่ศักย์คงที่ 150 volts เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากผ่านสนามไฟฟ้าแล้วทำการย้อมเจลด้วย 5% w/v Coomassie Brilliant Blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างสีออกด้วย 50% v/v methanol, 10% v/v acetic acid solution จนกระทั่ง background ใส

10. การแสดงออกและการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์โดยวิธี

Nickle affinity chromatography

แบคทีเรีย *E.coli* XL1-Blue หรือสายพันธุ์ Shuffle Express *E.coli* ที่มี pEZZ18-hBMP-2 ถูกเลี้ยงใน LB media ปริมาตร 5 ml ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml โดยเขย่า 180 rpm ที่ 37°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture เติมลงใน LB media ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml ให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 1 % inoculum size เลี้ยงโดยเขย่า 180 rpm ที่ 37 °C จนกระทั่ง OD₆₀₀ มีค่า ~ 0.5 - 0.6 จากนั้นจึงเติม IPTG ให้ได้ความเข้มข้น 1.0 mM และเขย่าต่อไปจนครบ 16 - 18 ชั่วโมง จึงทำการเก็บและทำให้เซลล์แตกด้วย lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) ที่มี protease inhibitor cocktail (Amressco) ทำการแตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) หรือ freeze-thaw โดยแช่แข็งที่ -80°C และ thaw ในน้ำแข็ง 15 นาทีจำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม DNase I (Vivantis, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 5 µg/ml และทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วจึงนำไปปั่นที่ 10,000 g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกส่วน soluble portion และ pellet จากนั้นจึงนำส่วนที่เป็น soluble portion มาทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA affinity chromatography

โปรตีนที่มีกรดอะมิโน Histidine ที่เรียงซ้ำกันหลาย ๆ ลำดับสามารถจับกับอนุภาคของ Nickel ได้ โปรตีนที่แสดงออกถูกแยกบริสุทธิ์โดยนำส่วนใสที่ได้จากการแตกเซลล์ ผ่าน Ni-NTA Affinity column (Ni-NTA Superflow resin, QIAGEN) ที่ถูกบรรจุใน column โดยใช้การตกตามแรงโน้มถ่วง Column ถูก equilibrate ด้วย Binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 10 เท่าของ column จากนั้นเติม clear soluble supernatant ที่ได้ลงไป จากนั้นทำการล้างด้วย binding buffer ต่อปริมาตร 20 เท่าของ column ตามด้วยการล้างโดยเติม Washing buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 20 เท่าของ column และทำการชะล้างโปรตีน hBMP-2 ออกด้วย Elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) ปริมาตร 10 เท่าของ column โดยเก็บ eluted fractions แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm และทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

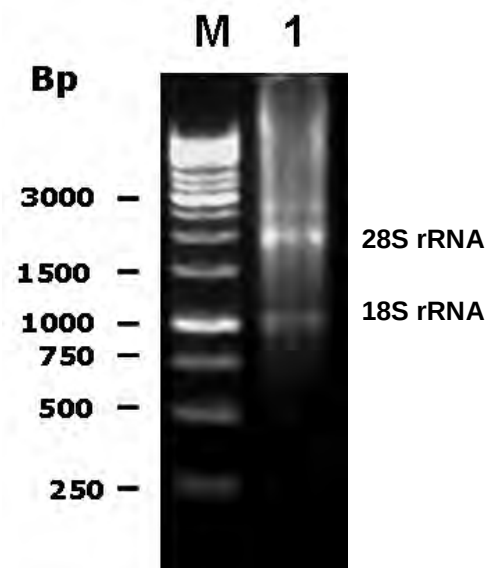
11. การติดตามการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ด้วยวิธี Western blot

การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ติดตามโดยใช้เทคนิค immunodetection โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์ ตัวอย่างโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้ 15%SDS-PAGE และทำการย้าย (Blotting) ลงบนแผ่น PVDF membrane ที่มีการเรียงลำดับจากซ้ายขวาไปขวาโดยเริ่มต้นจากกระดาษกรอง Whatman 3MM filter ตามด้วย PVDF membrane, gel และ Whatman 3MM filter ซึ่งหล่อด้วย blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20%(v/v) methanol, pH 8.3) ที่เย็นภายใต้สนามไฟฟ้าที่ 20 volts เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยใช้ใน Semi-dry blotting apparatus (Atto) หลังจากนั้น Membrane ที่ได้ถูกแช่ใน 5% skim milk ใน TBS-Tween buffer (TBS containing 0.05% Tween 20) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นบ่ม (incubate) กับ Mouse anti-human BMP-2 (Abcam) ที่เจือจางใน 5% skim milk ใน อัตราส่วน 1:2,000 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้างด้วย 0.05% tween 20-TBS เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างซ้ำสามครั้ง แล้วจึงทำการบ่มกับ Rabbit anti-mouse polyvalent immunoglobulin G ที่ conjugated ด้วย horseradish peroxidase เจือจางใน 5% skim milk ใน TBS-Tween buffer อัตราส่วน 1:2,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย 0.05% tween 20-TBS เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างซ้ำสามครั้ง ขั้นตอนสุดท้ายทำการติดตามการเรืองแสงโดยใช้เทคนิค chemiluminescent โดยเติมสารละลายที่เตรียมได้จาก ECL plus Western blotting detection system (Amersham). ด้วยเครื่อง Bio-rad chemidoc XRS หรือติดตามการเกิดสีด้วย Chromogenic substrate (DAB/H₂O₂ in TBS) เป็นเวลา 5-15 นาที เพื่อดูผลการเกิดสีและล้างด้วยน้ำกลั่นและทำให้แผ่น membrane แห้งโดยวางที่อุณหภูมิห้อง

ผลการทดลอง

1. การสกัดและเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์

ยีนซึ่งจำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ ได้ทำการแยกมาจากเซลล์ Human Fetal Osteoblast Cell Line (hFOB) โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ 37°C ภายใต้ 5% CO₂ และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสัปดาห์ จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเติบโตและปริมาณมากเพียงพอ หลังจากนั้นทำการสกัด Total RNA จากเซลล์ที่ได้ และเตรียมสาย Complementary DNA (cDNA Synthesis) ผลการสกัด Total RNA จากเซลล์ Human Fetal Osteoblast Cell Line (hFOB) และนำมาวิเคราะห์ปริมาณและการตรวจสอบบนวุ้นซึ่งผ่านกระแสไฟฟ้า พบว่า Total RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพเพียงพอและถูกนำมาเป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ complementary DNA โดยใช้ Oligo (dT)₁₈ primer ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการวิเคราะห์การสกัด Total RNA ของเซลล์ Human Fetal Osteoblast Cell Line

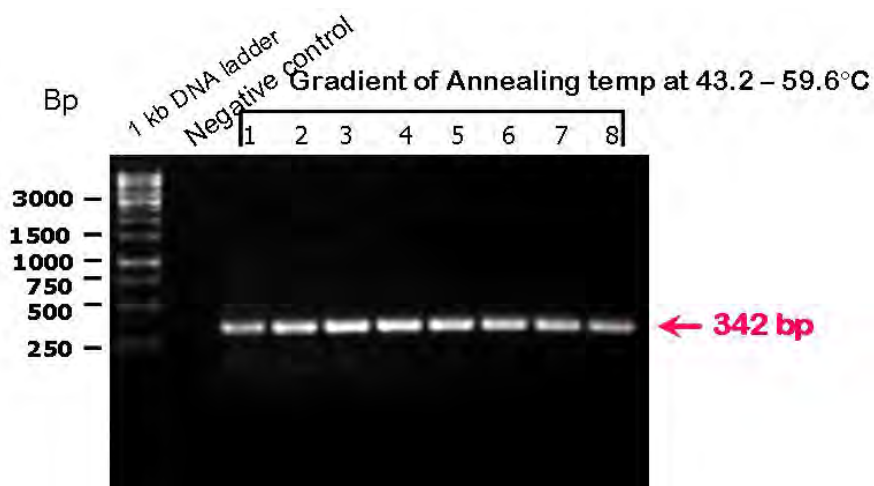
การคัดเลือกยีนที่จำเพาะต่อ mature human Bone Morphogenetic Protein-2 เริ่มต้นโดยการค้นหาลำดับเบสของยีน BMP-2 ของมนุษย์ทั้งหมดจากฐานข้อมูล GeneBank (NCBI) โดยใช้ nucleotide search จากนั้นข้อมูลจาก GeneBank accession number : NM_001200 ซึ่งเป็นลำดับเบสของยีน BMP-2 ของมนุษย์ (Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA) โดยเริ่มจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1632 ถึง 1973 (ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ 283 ถึง 396) ถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบเพื่อออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณของยีนที่จำเพาะต่อ mature human BMP-2 ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ ถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ cDNA ที่เตรียมได้เป็นแม่แบบ ท่อนดีเอ็นเอถูกเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่ถูกออกแบบให้จำเพาะกับลำดับเบสของยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ และทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอน PCR หลังจากการเพิ่มจำนวนแล้ว นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาทำการวิเคราะห์บน 1.5% agarose gel electrophoresis และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาทำแยกบริสุทธิ์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มบริเวณลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งบริเวณปลาย 5' และ ปลาย 3' รวมทั้งการเพิ่มลำดับเบสจำเพาะสำหรับกรดอะมิโน Histidine จำนวน 6 ตัว ตามด้วยลำดับเบสสำหรับโปรตีน Factor Xa ที่ปลาย 5' โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบอย่างจำเพาะ และทำการวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้บน 1.5% agarose gel electrophoresis

การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณของยีนที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยการใช้อุณหภูมิที่แตกต่างกันในขั้นตอนของ Annealing step จาก 40°C – 60°C ดังแสดงในรูปที่ 2 ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มปริมาณท่อนดีเอ็นเอได้แถบเดียวที่มีขนาด 342 คู่เบส และ Annealing temperature ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 48.4°C – 54.6°C ซึ่งเมื่อนาสภาวะที่เหมาะสมนี้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งพบแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาด 342 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 3 ดีเอ็นเอจาก PCR ขั้นตอนแรกนี้ถูกนำมาใช้แม่แบบของ PCR ครั้งที่ 2 เพื่อเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยทำการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนของ Annealing step จาก 48.0°C – 65.0°C (รูปที่ 4) และ Annealing temperature ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 51.4°C – 58.8°C พบแถบดีเอ็นเอแถบเดียวที่มีขนาด 406 คู่เบส

2. การโคลนยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เข้าสู่เวกเตอร์พาหะ และการตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบส

นำชิ้น PCR product ที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์พาหะ pJET1.2 vector โดยเทคนิค Blunt end ligation ด้วยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นนำปฏิกิริยาที่ได้มาถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1-Blue โดยวิธีการ Transformation แบบ Heat shock method แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีน BMP-2 โดยใช้เทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Bgl* II (รูปที่ 5) และผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR (รูปที่ 6) พบท่อนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส จากนั้นทำการวิเคราะห์ยีนที่บรรจุใน Recombinant clones โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoR* I และ *BamH* I ซึ่งลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิดนี้จะไม่พบในเวกเตอร์พาหะชนิด pJET1.2 แต่จะพบในบริเวณตำแหน่ง 5' และ 3' ของยีน BMP-2 ซึ่งได้มีการเพิ่มเติมเข้าไปเท่านั้น ผลการทดลองพบว่า โคลนที่ถูกเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และมีบริเวณลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoR* I และ *BamH* I



รูปที่ 2 แสดงการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอน Annealing ในปฏิกิริยา PCR

แถวที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 43.2 °C

แถวที่ 5 ใช้อุณหภูมิ 54.6 °C

แถวที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 45.5 °C

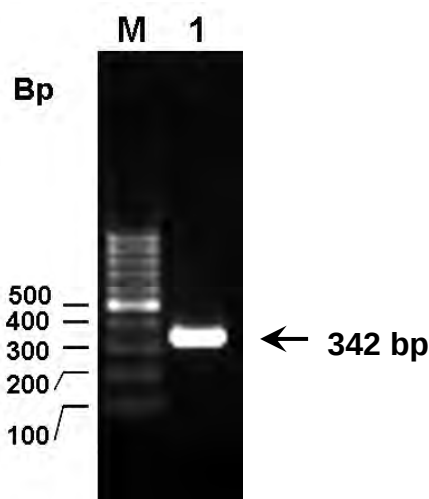
แถวที่ 6 ใช้อุณหภูมิ 56.8 °C

แถวที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 48.4 °C

แถวที่ 7 ใช้อุณหภูมิ 58.4 °C

แถวที่ 4 ใช้อุณหภูมิ 51.7 °C

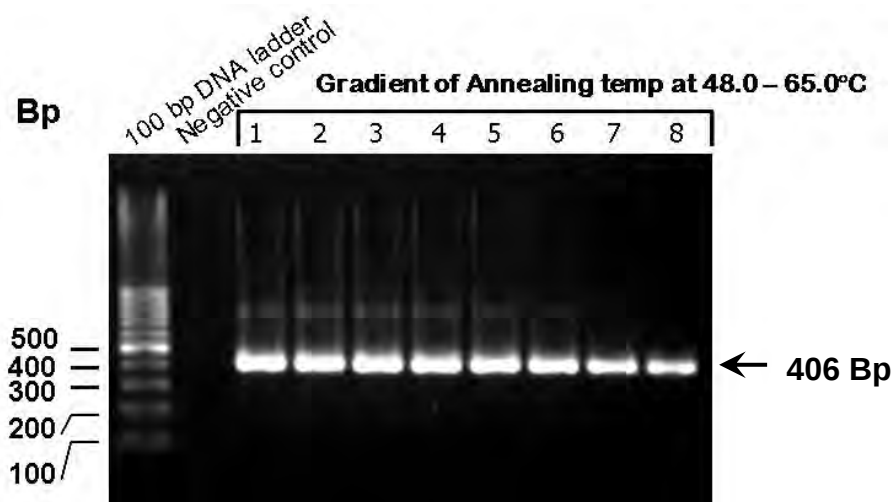
แถวที่ 8 ใช้อุณหภูมิ 59.6 °C



รูปที่ 3 การเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ โดยเทคนิค Polymerase chain reaction

แถวที่ M 100 bp DNA Ladder

แถวที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR ในการเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์ โดยการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ



รูปที่ 4 แสดงการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของขั้นตอน Annealing ในปฏิกิริยา PCR เพิ่มบริเวณของ
เอนไซม์ตัดจำเพาะและการดอามีโนฮิสติดีน 6 ตัว

แถวที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 48.0 °C

แถวที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 49.3 °C

แถวที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 51.4 °C

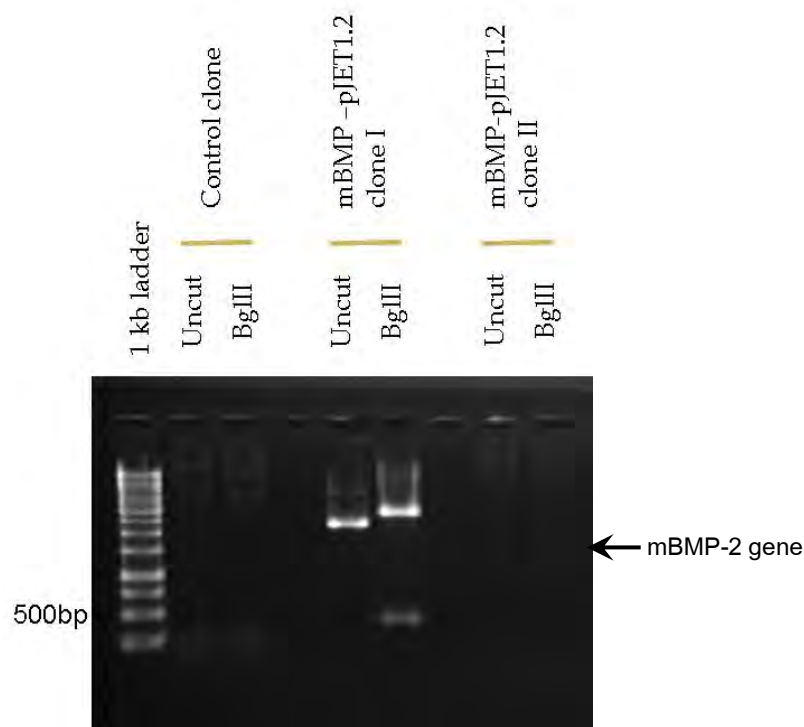
แถวที่ 4 ใช้อุณหภูมิ 54.5 °C

แถวที่ 5 ใช้อุณหภูมิ 58.8 °C

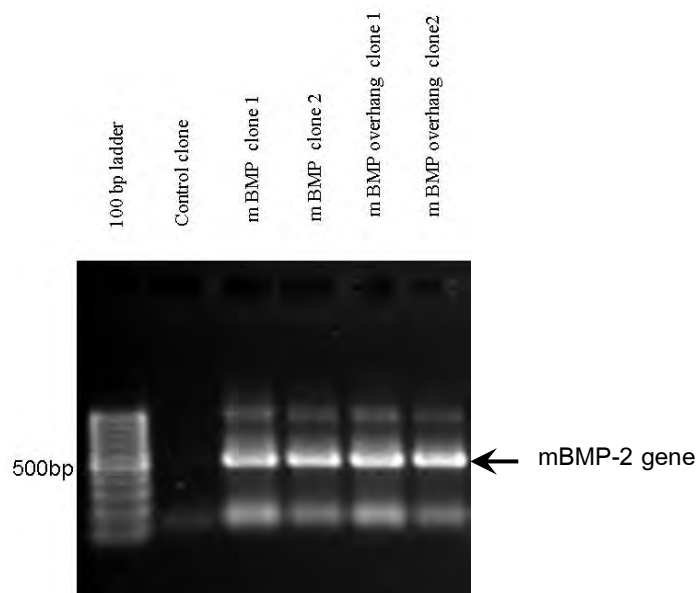
แถวที่ 6 ใช้อุณหภูมิ 61.8 °C

แถวที่ 7 ใช้อุณหภูมิ 63.9 °C

แถวที่ 8 ใช้อุณหภูมิ 65.0 °C

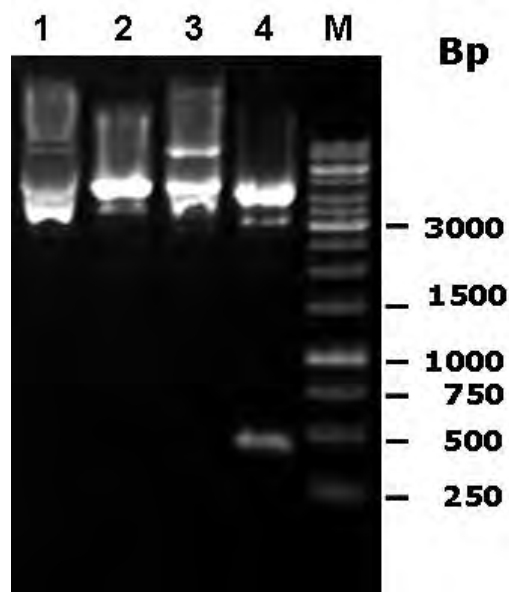


รูปที่ 5 การวิเคราะห์โคลนซึ่งบรรจุยีน mBMP-2 ในเวกเตอร์ pJET1.2 โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bgl* II



รูปที่ 6 การวิเคราะห์โคลนซึ่งบรรจุยีน mBMP-2 และยีน mBMP-2 ที่มีการเพิ่มลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะและสำหรับกรดอะมิโน Histidine โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction

โคลนที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *BamH* I นี้ถูกนำไปพิสูจน์ลำดับเบสโดยอาศัยเครื่องวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ ผลของการหาลำดับเบสแสดงในรูปที่ 8 ลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยการสืบค้นจากฐานข้อมูลสากล GenBank database จาก National Center Biotechnology Institute (NCBI) โดยใช้ Blast similarity search พบว่า ลำดับเบสของดีเอ็นเอจากโคลนที่ถูกเลือกตรงกับยีนของ mature bone morphogenetic protein 2 (mBMP2) ของมนุษย์จากฐานข้อมูลสากล 100% (รูปที่ 9) และทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบสที่ได้โดยใช้โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบส Vector NTI (ดังแสดงในรูปที่ 10) ผลการทดลองพบบริเวณของยีน mBMP-2 ของมนุษย์ บริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 จึงสรุปได้ว่าคณะผู้วิจัยสามารถโคลนยีนสำหรับ mature BMP-2 ของมนุษย์ โดยมีลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่ตรงกับฐานข้อมูลสากลทุกประการ



รูปที่ 7 การวิเคราะห์ Recombinant clone ที่บรรจุยีน mature human BMP-2
โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

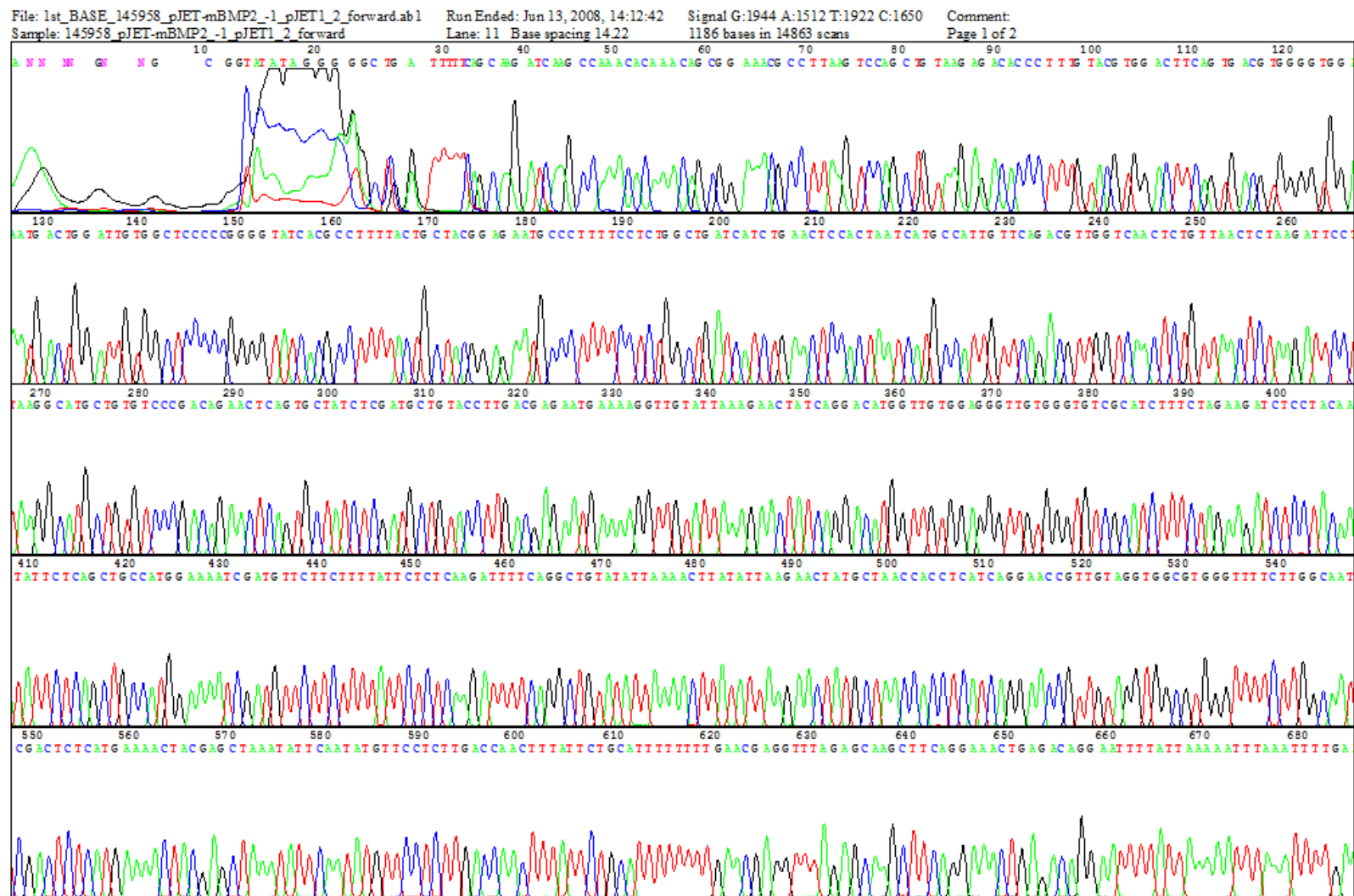
แถวลูก M 1 Kb DNA Ladder

แถวลูก 1 undigested plasmid pJET1.2 – mBMP-2

แถวลูก 2 plasmid pJET1.2 – mBMP-2 digested with *EcoR* I

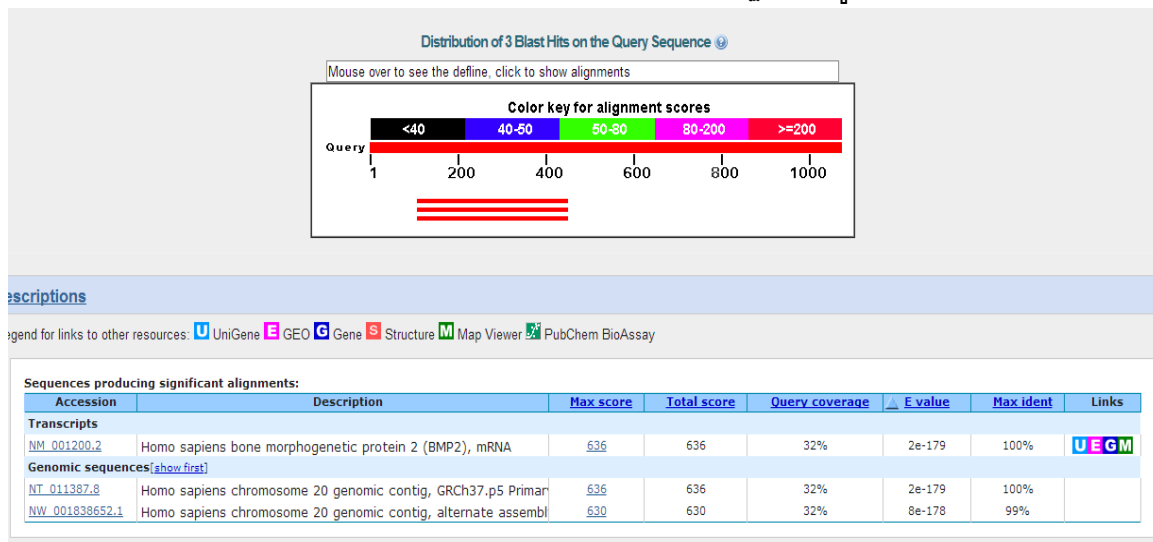
แถวลูก 3 plasmid pJET1.2 – mBMP-2 digested with *BamH* I

แถวลูก 4 plasmid pJET1.2 – mBMP-2 double-digested with *EcoR* I and *BamH* I



รูปที่ 8 การวิเคราะห์หาลำดับเบสโดย Automated DNA Sequencing จาก Recombinant clone pJET1.2-hBMP-2 ที่บรจุยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์

(A) Genetic map ของผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลสากล



(B) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสจากฐานข้อมูลสากล

> [ref|NM_001200.2|](#) [U](#) [E](#) [G](#) [M](#) Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA
Length=3150

[GENE ID: 650 BMP2](#) | bone morphogenetic protein 2 [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)

Score = 636 bits (344), Expect = 2e-179

Identities = 344/344 (100%), Gaps = 0/344 (0%)

Strand=Plus/Minus

```

Query    60      TAGCGACACCCACAACCCCTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATACAACCTTTTCA  119
          |||
Sbjct    1975     TAGCGACACCCACAACCCCTCCACAACCATGTCCTGATAGTTCTTTAATACAACCTTTTCA  1916

Query    120     TTCTCGTCAAGGTACAGCATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCGGGACACAGCATGCCTTA  179
          |||
Sbjct    1915     TTCTCGTCAAGGTACAGCATCGAGATAGCACTGAGTTCTGTCGGGACACAGCATGCCTTA  1856

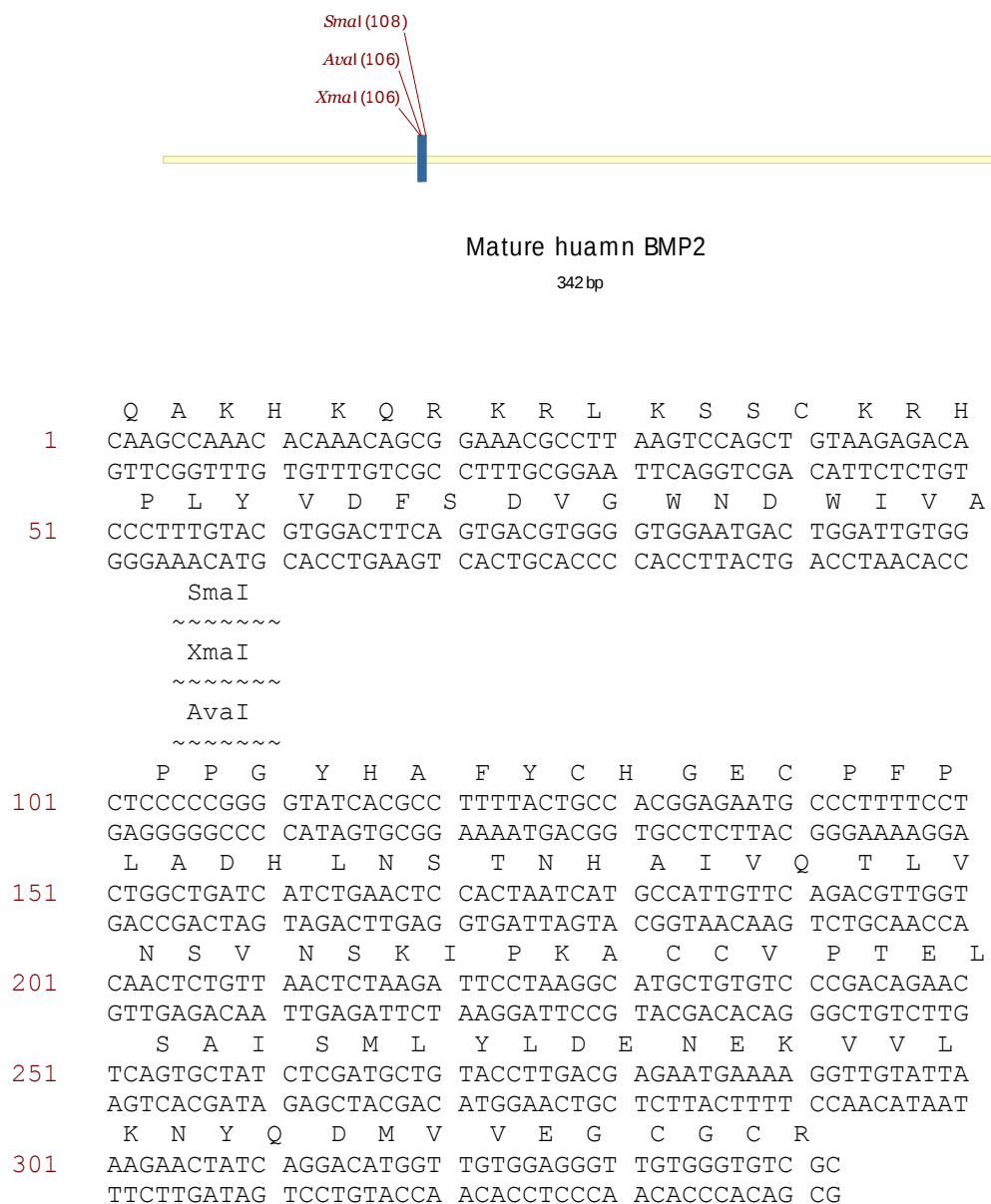
Query    180     GGAATCTTAGAGTTAACAGAGTTGACCAACGTCTGAACAATGGCATGATTAGTGAGTTC  239
          |||
Sbjct    1855     GGAATCTTAGAGTTAACAGAGTTGACCAACGTCTGAACAATGGCATGATTAGTGAGTTC  1796

Query    240     AGATGATCAGCCAGAGGAAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGG  299
          |||
Sbjct    1795     AGATGATCAGCCAGAGGAAAAGGGCATTCTCCGTGGCAGTAAAAGGCGTGATACCCCGGG  1736

Query    300     GGAGCCACAATCCAGTCATTCCACCCACGTCACCTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGCTCT  359
          |||
Sbjct    1735     GGAGCCACAATCCAGTCATTCCACCCACGTCACCTGAAGTCCACGTACAAAGGGTGCTCT  1676

Query    360     TTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTG  403
          |||
Sbjct    1675     TTACAGCTGGACTTAAGGCGTTTCCGCTGTTTGTGTTTGGCTTG  1632
  
```

รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้ กับฐานข้อมูลสากล NCBI database วิเคราะห์โดย Blast
similarity search / Nucleotide Blast แหล่งข้อมูล : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



รูปที่ 10 แสดงลำดับเบส กรดอะมิโนและบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะ
ที่พบภายในยีน mature BMP-2 ของมนุษย์

ลำดับเบสถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VectorNTI version 8.0

~ แสดงลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ



Restriction sites+His6+Xa

406 bp

```

EcoRI      NcoI
~~~~~      ~~~~~
  N  S  A  M  A  H  H  H  H  H  H  I  E  G  R  Q  A
1  GAATTCGGCC ATGGCTCATC ACCATCACCA TCACATCGAA GGGCGCCAAG
   CTTAAGCCGG TACCGAGTAG TGGTAGTGGT AGTGTAGCTT CCCGCGGTTC
      K  H  K  Q  R  K  R  L  K  S  S  C  K  R  H  P
51  CCAAACACAA ACAGCGGAAA CGCCTTAAGT CCAGCTGTAA GAGACACCCT
   GGTTTGTGTT TGTCGCCTTT GCGGAATTCA GGTGACATT CTCTGTGGGA
      L  Y  V  D  F  S  D  V  G  W  N  D  W  I  V  A  P
101 TTGTACGTGG ACTTCAGTGA CGTGGGGTGG AATGACTGGA TTGTGGCTCC
   AACATGCACC TGAAGTCACT GCACCCACC TTACTGACCT AACACCGAGG
      SmaI
      ~~~~~
      XmaI
      ~~~~~
      AvaI
      ~~~~~
      P  G  Y  H  A  F  Y  C  H  G  E  C  P  F  P  L  A
151  CCCGGGGTAT CACGCCTTTT ACTGCCACGG AGAATGCCCT TTTCCTCTGG
   GGGCCCCATA GTGCGGAAAA TGACGGTGCC TCTTACGGGA AAAGGAGACC
      D  H  L  N  S  T  N  H  A  I  V  Q  T  L  V  N
201  CTGATCATCT GAACTCCACT AATCATGCCA TTGTTCAAGAC GTTGGTCAAC
   GACTAGTAGA CTTGAGGTGA TTAGTACGGT AACAAGTCTG CAACCAGTTG
      S  V  N  S  K  I  P  K  A  C  C  V  P  T  E  L  S
251  TCTGTTAACT CTAAGATTCC TAAGGCATGC TGTGTCCCGA CAGAACTCAG
   AGACAATTGA GATTCTAAGG ATTCCGTACG ACACAGGGCT GTCTTGAGTC
      A  I  S  M  L  Y  L  D  E  N  E  K  V  V  L  K  N
301  TGCTATCTCG ATGCTGTACC TTGACGAGAA TGAAAAGGTT GTATTAAAGA
   ACGATAGAGC TACGACATGG AACTGCTCTT ACTTTTCCAA CATAATTTCT
                                     HindIII
                                     ~~~
                                     BamHI
                                     ~~~~~
      Y  Q  D  M  V  V  E  G  C  G  C  R  *  G  S  K
351  ACTATCAGGA CATGGTTGTG GAGGGTTGTG GGTGTCGCTA AGGATCCAAG
   TGATAGTCCT GTACCAACAC CTCCAACAC CCACAGCGAT TCCTAGGTTC
      HindIII
      ~~~
      L  A
401  CTTGCG
   GAACGC
  
```

รูปที่ 11 แสดงลำดับเบสและบริเวณของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่พบภายในยีน mature BMP-2 ของมนุษย์

ลำดับเบสถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม VectorNTI version 8.0

~ แสดงลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ ATG แสดงลำดับเบสสำหรับกรดอะมิโน Methionine

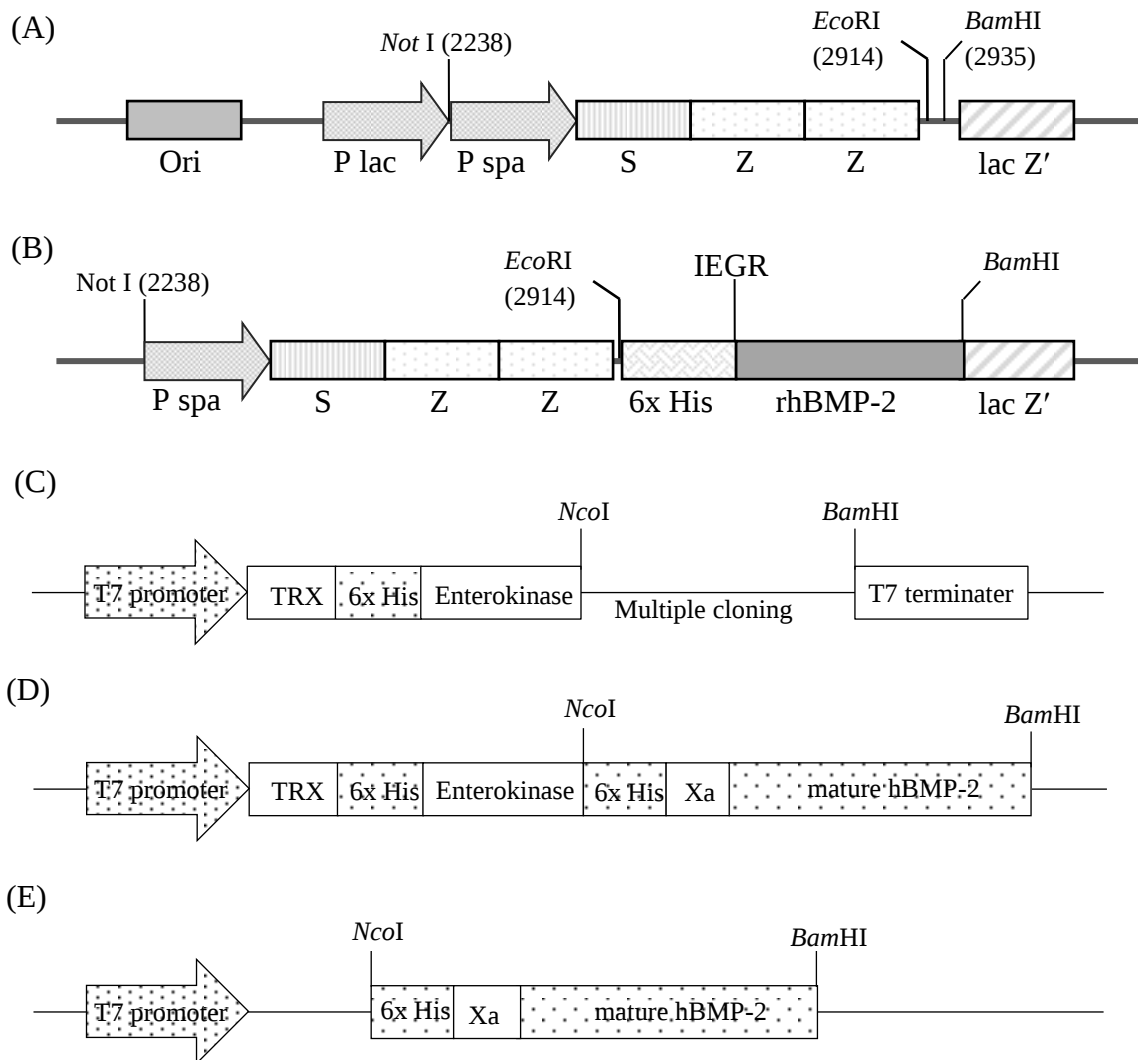
___ แสดงลำดับเบสสำหรับ Factor Xa กรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว

* Stop codon

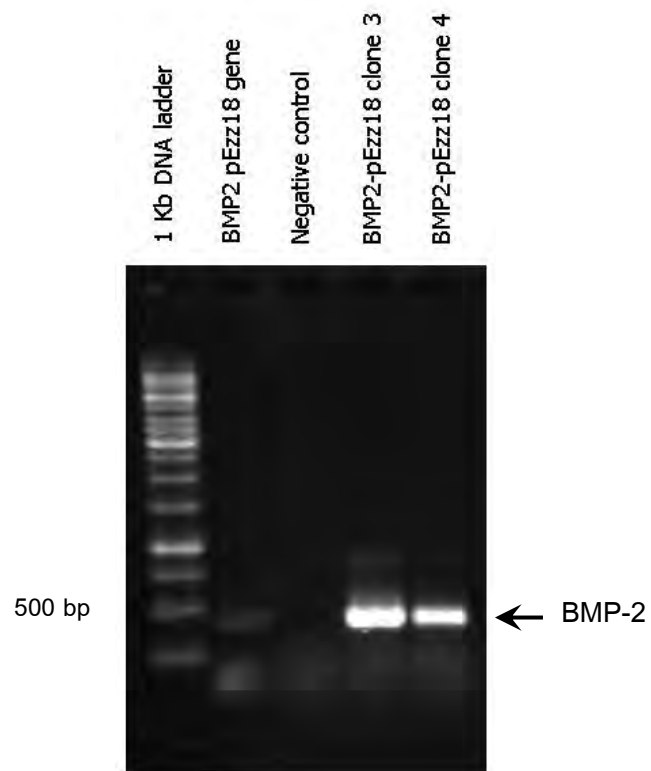
3. การถ่ายโอนยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เข้าสู่ เวกเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 / *E. coli* XL1 Blue

ยีน mature bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) ของมนุษย์ที่บรรจุในเวกเตอร์พาหะ pJET1.2 ถูกย้ายเข้าสู่เวกเตอร์ pEZZ18 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการตัดยีน mBMP-2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *EcoR* I และ *BamH* I จากนั้นนำชิ้นยีนมาผ่านขั้นตอนการทำให้มีความบริสุทธิ์และทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pEZZ18 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I และ *BamH* I เช่นเดียวกัน ด้วยการทำงานของเอนไซม์ ligase และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1 Blue แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีนที่สนใจโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) แล้วจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *BamH* I ภาพแสดงเปรียบเทียบเวกเตอร์ชนิดต่างๆ ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 แสดงในรูปที่ 12

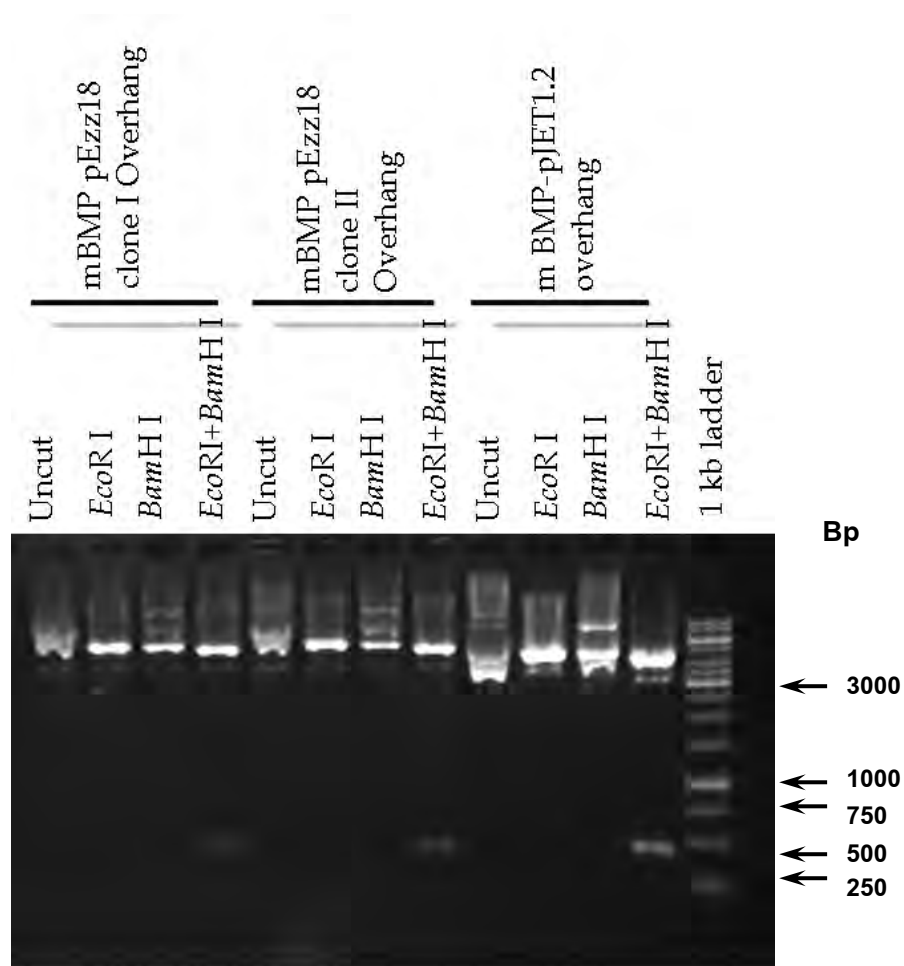
ผลการวิเคราะห์ในการสำรวจแบบสุ่มและตรวจสอบโคลน pEZZ18 ที่บรรจุยีน BMP-2 โดยเทคนิค PCR (รูปที่ 13) พบว่า คณะผู้วิจัยสามารถคัดเลือกโคลนที่บรรจุยีนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของยีน mBMP-2 จากนั้นนำโคลนที่สนใจนี้มาทำการวิเคราะห์โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *BamH* I อีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 14 ผลการทดลองพบว่า โคลนที่ถูกเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน mBMP-2 ของมนุษย์ และนำโคลนที่ได้ไปพิสูจน์ลำดับของเบสโดยเทคนิคการหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ผลของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 16 และพบว่าชิ้นยีนที่บรรจุในเวกเตอร์พาหะ pEZZ18 ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BMP-2 ของมนุษย์ และนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ต่อไป



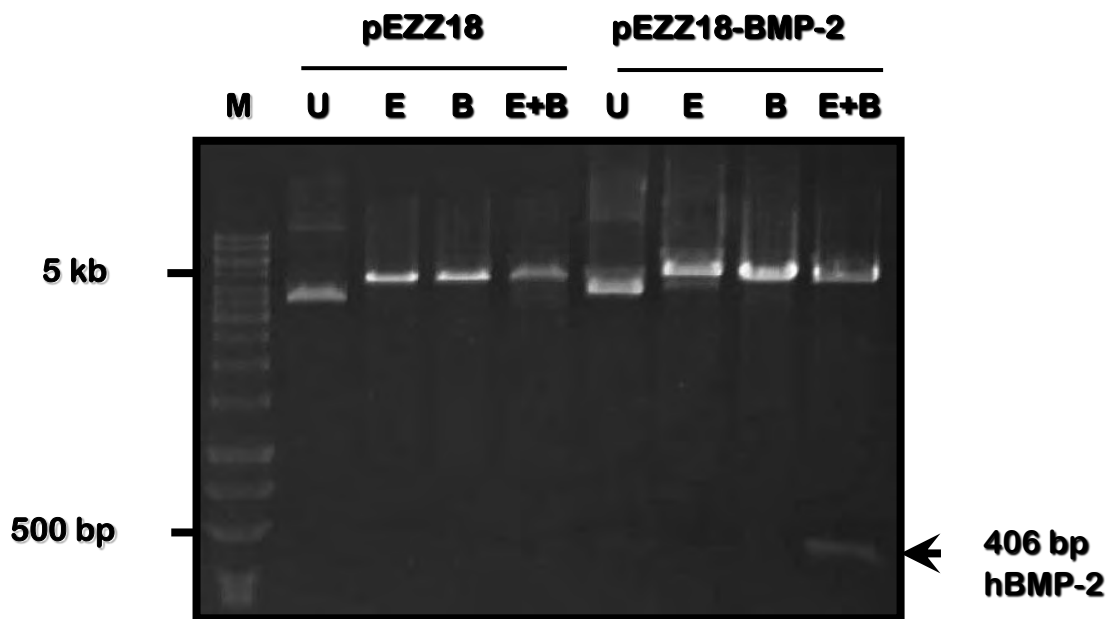
รูปที่ 12 ภาพแสดง Alignment of Restriction sites ของเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก โดยที่ (A) แสดงส่วนของยีนที่กำหนดการสร้าง secretion signal peptide และ ZZ domain ของโปรตีน เอ. (B) pEZZ18-BMP-2 ที่เพิ่มส่วนของ polyhistidine tag และจุดตัดจำเพาะของ factor Xa. (C) แสดงส่วนของ TRX, polyhistidine tag และจุดตัดจำเพาะของเอนไซม์ enterokinase ของ pET32a (D) แสดง alignment ของ pET32a-BMP-2 และ (E) แสดง alignment ของ pET15b-BMP-2



รูปที่ 13 การวิเคราะห์โคลนในเวกเตอร์ pEZZ18 ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction



รูปที่ 14 แสดงการวิเคราะห์ Recombinant clone ในเวกเตอร์ pEZZ18 และเวกเตอร์ pJET1.2 ที่บรรจุยีน mature human BMP-2 โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I, *BamH* I และ *EcoR* I and *BamH* I



รูปที่ 15 แสดงผลการวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์ pEZZ18-hBMP-2 เปรียบเทียบกับเวกเตอร์พาหะ pEZZ18 ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *BamH* I

M = DNA marker

U = Undigested plasmid DNA

E = *EcoRI*

B = *BamH* I and *EcoR* I double-digestion



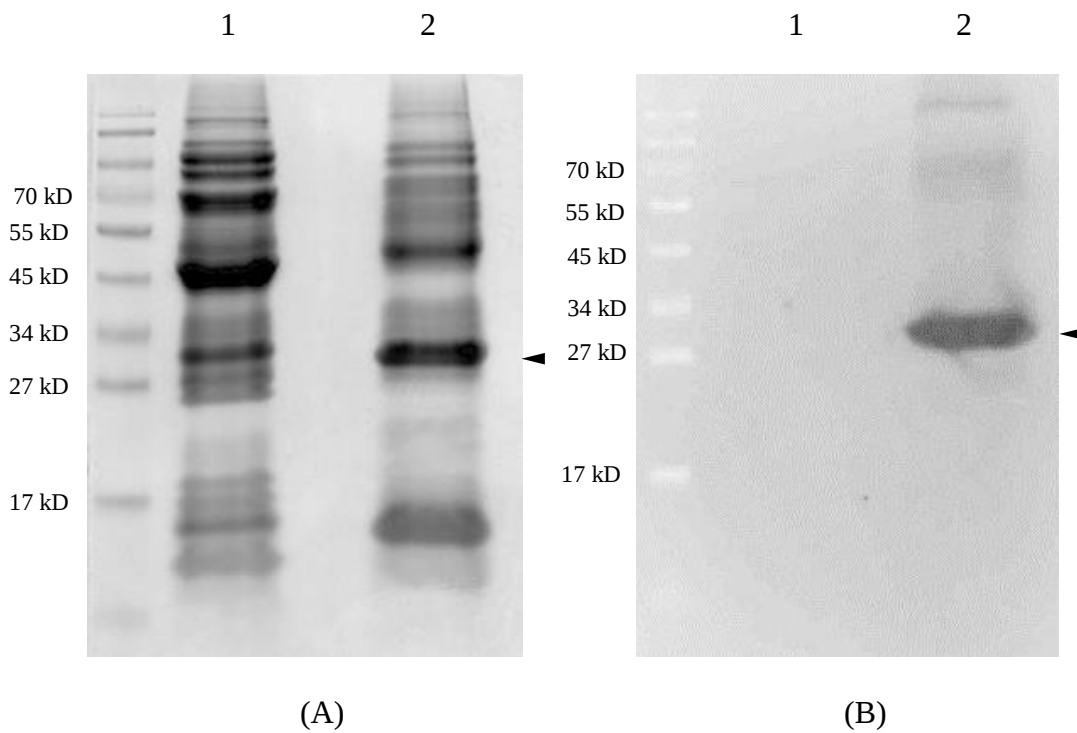
รูปที่ 16 การวิเคราะห์หาลำดับเบสโดย Automated DNA Sequencing จาก Recombinant clone pEZZ18-hBMP-2 ที่บรรจุยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์

4. การศึกษาการแสดงออกและแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 / *E. coli* XL1 Blue

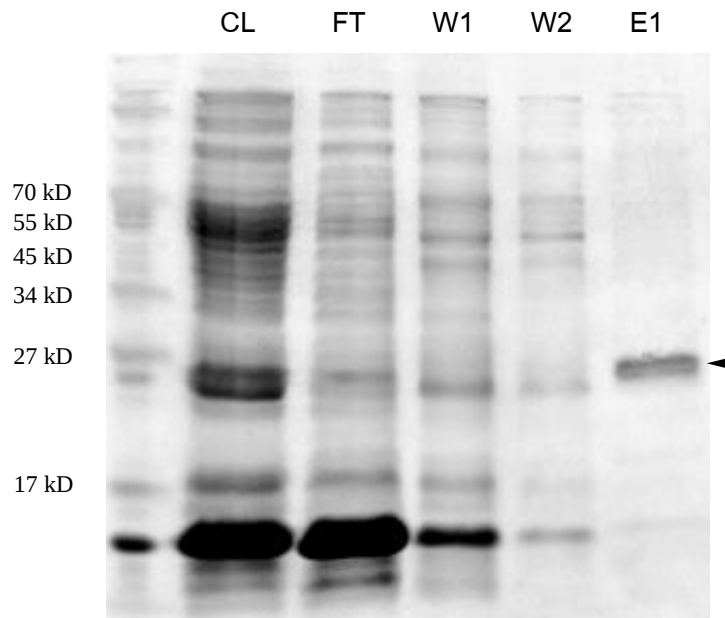
เวกเตอร์ pEZZ18 ที่บรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* XL1 Blue ถูกนำมาศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C โดยเขย่าที่ 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการแสดงออกของโปรตีนโดยนำเซลล์ปริมาณ 1/100 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB media ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C และทำการเขย่าจนกระทั่งมีการเจริญเติบโตโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ 0.5 จากนั้นทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยการเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM และเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C และทำการเขย่าเป็นเวลา 12-15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเก็บส่วนของ media และ cell pellet การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในส่วน cytosol โดยการแตกเซลล์ในส่วนของ cell pellet โดยอาศัยเอนไซม์ Lysozyme, DNase และวิธีการ freeze-thaw หลังจากนั้นทำการปั่นที่ 3,000xg เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บส่วน supernatant

การติดตามการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ทำโดยนำส่วนของ media มาทดสอบการ binding กับ Ni-NTA resin และนำส่วนของ crude cytosol part (supernatant) มาวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิคการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (SDS-PAGE) และทำการติดตามการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 โดยใช้เทคนิค Western blot analysis ซึ่งทำการย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่แผ่น nitrocellulose membrane โดยอาศัยกระแสไฟฟ้า จากนั้นทำการติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน mBMP-2 โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ BMP-2 ของมนุษย์ (Mouse-anti human mBMP-2) และ Goat-anti mouse IgG polyvalent conjugated HRP เป็น secondary antibody และติดตามสัญญาณโดยการเปล่งแสงด้วยเทคนิค Enhanced chemiluminescence detection (ECL) ผลการติดตามการแสดงออกและการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot analysis ดังแสดงในรูปที่ 17 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ พบว่า มีการแสดงออกของยีน BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์ pEZZ18 โดยอาศัยแบคทีเรียเจ้าบ้านสายพันธุ์ *E. coli* XL1 Blue ภายใต้การควบคุมของ *lacUV5* และ protein A promoters รีคอมบิแนนท์โปรตีน mBMP-2 ที่ผลิตได้มีขนาดประมาณ 28 kDa ในส่วนของ cytosol part จึงสามารถนำไปนำไปใช้ในการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน mBMP-2 ของมนุษย์ได้

การศึกษาการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ส่วน supernatant หลังการแตกเซลล์มาแยกบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA affinity column (รูปที่ 18) พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน mBMP-2 ของมนุษย์สามารถถูกแยกบริสุทธิ์โดยจับกับ Ni-NTA affinity resin ได้และความบริสุทธิ์สูงโดยสามารถกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกได้จำนวนมาก



รูปที่ 17 (A) แสดงผลการ SDS-PAGE analysis และย้อมด้วยสี coomassie blue ของ hBMP-2 ที่แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียชนิด *E. coli*. สายพันธุ์ XL1-blue ในรูปแบบของ fusion protein ที่ละลายอยู่ภายในส่วนของ supernatant โดย lane 1 คือ negative control (pEZZ18 ใน XL1-blue) และ lane 2 คือ pEZZ18-hBMP-2 ใน XL1-blue (B) แสดงผลการทดสอบด้วย western-blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ human BMP-2 ให้ผล positive ที่โปรตีนขนาดประมาณ 28 kD



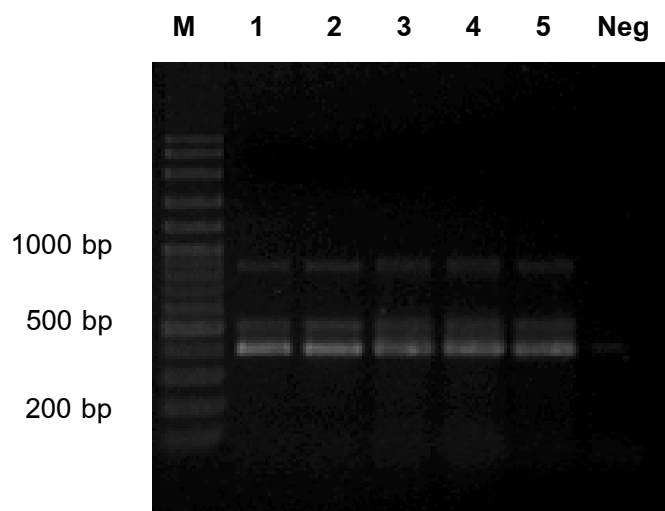
รูปที่ 18 แสดงผลการแยกบริสุทธิ์ BMP-2 ของมนุษย์ด้วย Ni-NTA affinity chromatography โดยนำ ส่วน supernatant หลังการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แยกเซลล์ ด้วย Freeze-thaw method โดยที่ CL คือ cell lysate, FT คือ ส่วนที่ไม่จับกับ column, W1 และ W2 คือส่วนที่ได้จากการล้างด้วย binding buffer ที่มี Imidazole ที่ความเข้มข้น 30 mM ปริมาณครั้งละ 10 column volume และ E1 คือ ส่วนที่ได้จากการล้างเอาโปรตีน hBMP-2 ออก ด้วย binding buffer ที่มี Imidazole ที่ความเข้มข้น 250 mM โปรตีนที่แยกบริสุทธิ์ได้มีขนาด ประมาณ 28 kDa

5. การถ่ายโอนยีนและการศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์พาหะชนิด pET32a ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E.coli* Origami B

ยีน mature bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ที่บรรจุในเวกเตอร์พาหะ pJET1.2 ถูกย้ายเข้าสู่เวกเตอร์ pET32a เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการตัดยีน BMP-2 ของมนุษย์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Nco* I และ *Bam*H I จากนั้นนำชิ้นยีนมาผ่านขั้นตอนการทำให้มีความบริสุทธิ์และทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET32a ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I และ *Bam*H I เช่นเดียวกัน การเชื่อมต่อชิ้นยีนอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ligase และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ Origami B แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีนที่สนใจโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bam*H I

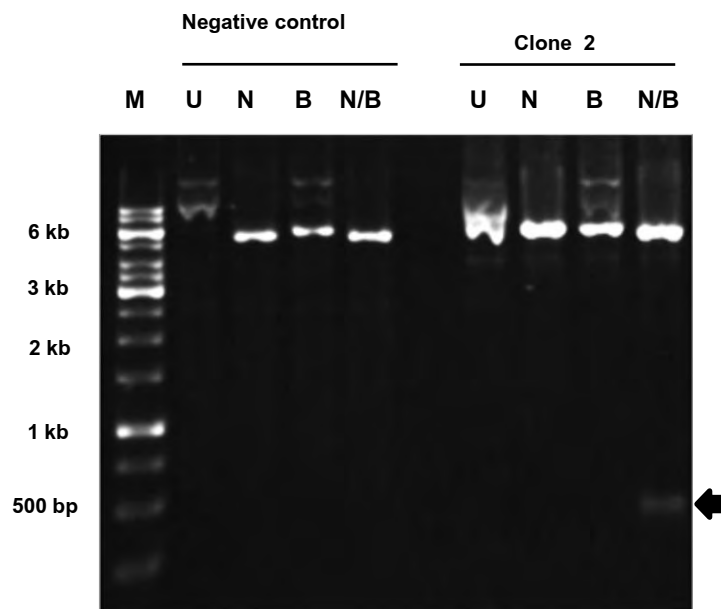
ผลการตรวจสอบโคลน pET32a ที่บรรจุยีน BMP-2 โดยเทคนิค PCR (รูปที่ 19) พบว่าคณะผู้วิจัยสามารถคัดเลือกโคลน pET32a ที่บรรจุยีนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของยีน BMP-2 จากนั้นนำโคลนที่สนใจนี้มาทำการวิเคราะห์โดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bam*H I ดังแสดงในรูปที่ 20 ผลการทดลองพบว่า โคลนที่ถูกเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ และนำโคลนที่ได้ไปพิสูจน์ลำดับของเบสโดยเทคนิคการหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ผลของลำดับเบสแสดงในรูปที่ 21 และพบว่าชิ้นยีนที่บรรจุในเวกเตอร์พาหะ pET32a ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน BMP-2 ของมนุษย์ และนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ต่อไป

ผลการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ในเวกเตอร์พาหะชนิด pET32a ในแบคทีเรีย Origami B ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 0.5mM IPTG โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 22 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ที่ขนาด 28 kDa ในส่วนโปรตีนรวมหลังการแตกเซลล์ (total crude lysate) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 37°C ด้วย 0.5mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 เมื่อเหนี่ยวนำเป็นระยะเวลา 1-4 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 22C จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของ rhBMP-2 ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเหนี่ยวนำที่เพิ่มขึ้น จากนั้นทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแสดงออกภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิเคราะห์การแสดงออกแยกในส่วน Cytosol และ Pellet เมื่อเหนี่ยวนำที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.1-0.4 mM (รูปที่ 23) ผลการทดลองพบว่า มีการแสดงออกของ rhBMP-2 ในส่วน cytosol (ในรูป soluble protein) เมื่อเหนี่ยวนำที่ความเข้มข้นของ IPTG ต่ำๆในช่วงประมาณ 0.1mM ในขณะที่พบการแสดงออกในส่วน pellet (ในรูป inclusion body) ที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเหนี่ยวนำด้วยความเข้มข้นของ IPTG ปริมาณที่สูงขึ้น (0.2-0.4 mM)



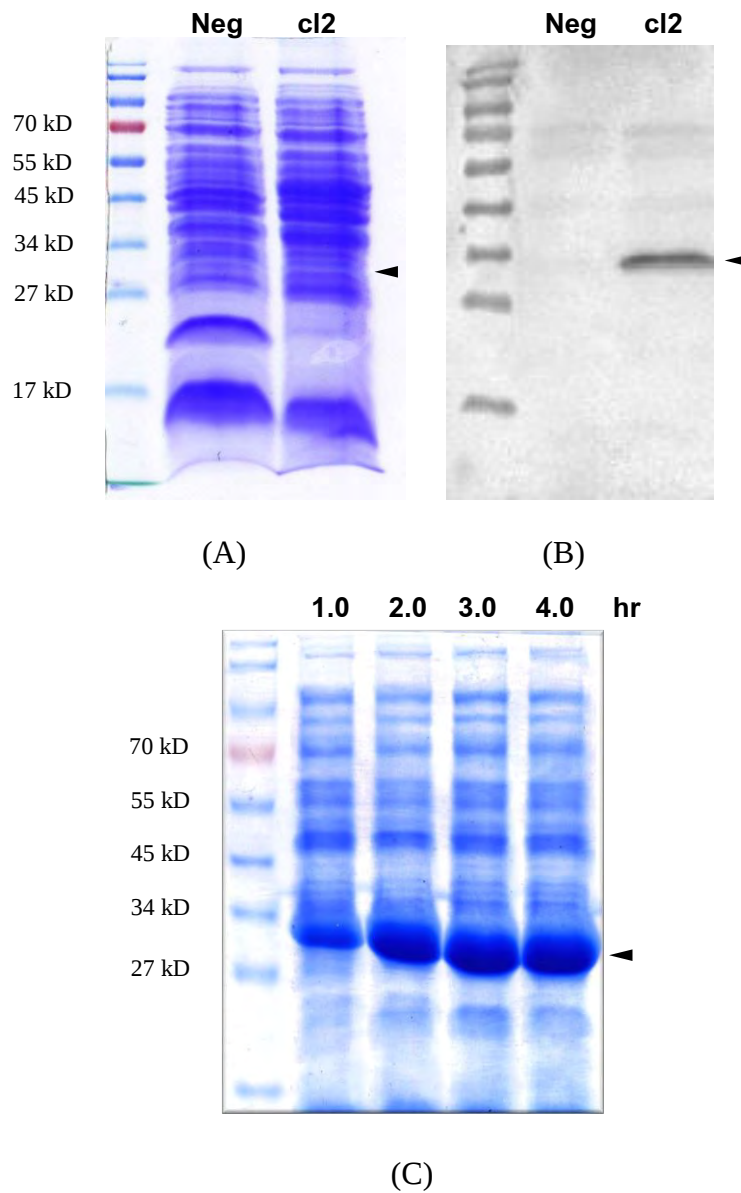
รูปที่ 19 การวิเคราะห์ Recombinant clones ที่สนใจด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction แสดงผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จาก recombinant clones ของ pET32a-BMP-2 ที่ถูกเลือกแบบสุ่ม

Lane	M	=	100 bp DNA Ladder
	1	=	Clone no. 1
	2	=	Clone no. 2
	3	=	Clone no. 3
	4	=	Clone no. 4
	5	=	Clone no. 5
	Neg	=	pET32a transformed clone (as negative control)

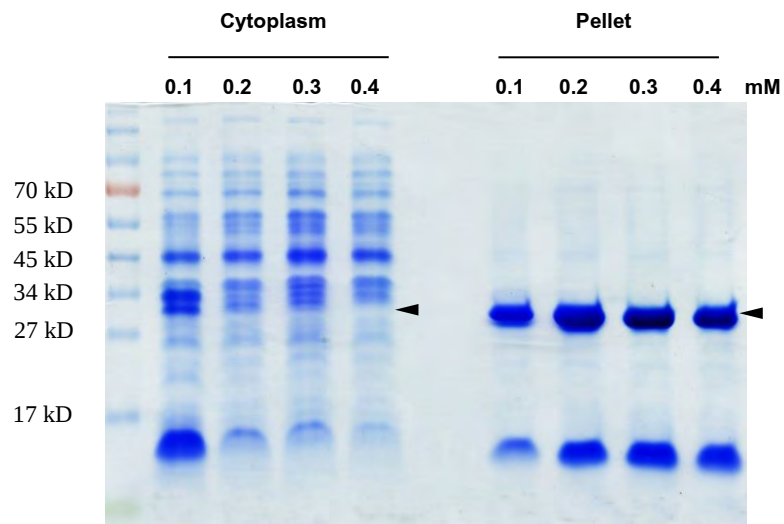


รูปที่ 20 การวิเคราะห์ Recombinant clones ที่สนใจโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เวกเตอร์พาหะชนิด pET32a ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์หลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ถูกนำมาวิเคราะห์บน 0.8% Agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide

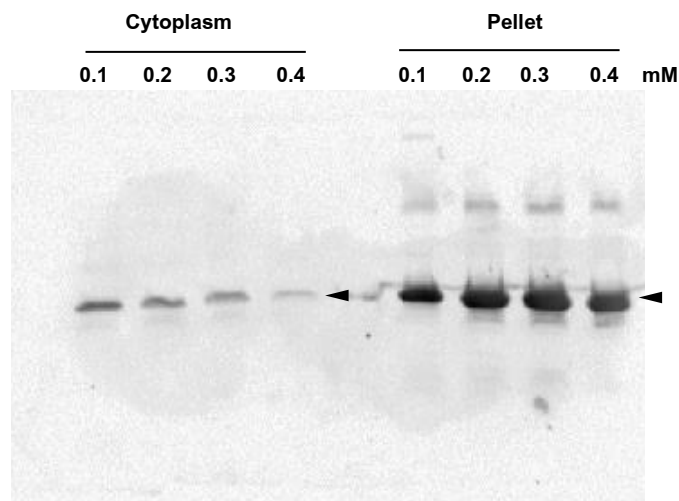
Lane M	=	1 kb DNA Ladder
Negative control	=	pET32a plasmid vector with no insert
U	=	undigested plasmid DNA
N	=	pET32a digested with <i>Nco</i> I
B	=	pET32a digested with <i>Bam</i> H I
N/B	=	pET32a double-digested with <i>Nco</i> I and <i>Bam</i> H I



รูปที่ 22 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโคลน pET32a-BMP-2/*E.coli* OrigamiB ที่อุณหภูมิ 37°C หลังการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM โดย (A) ผลการวิเคราะห์โปรตีนรวมหลังการเหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแตกเซลล์ด้วย freeze-thaw method วิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE, (B) แสดง Western blot analysis ด้วย monoclonal antibody ต่อ BMP-2 ของมนุษย์ และภาพ (C) แสดงระดับการแสดงออกของ rhBMP-2 ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังการแตกเซลล์ด้วย B-PERII method



(A)

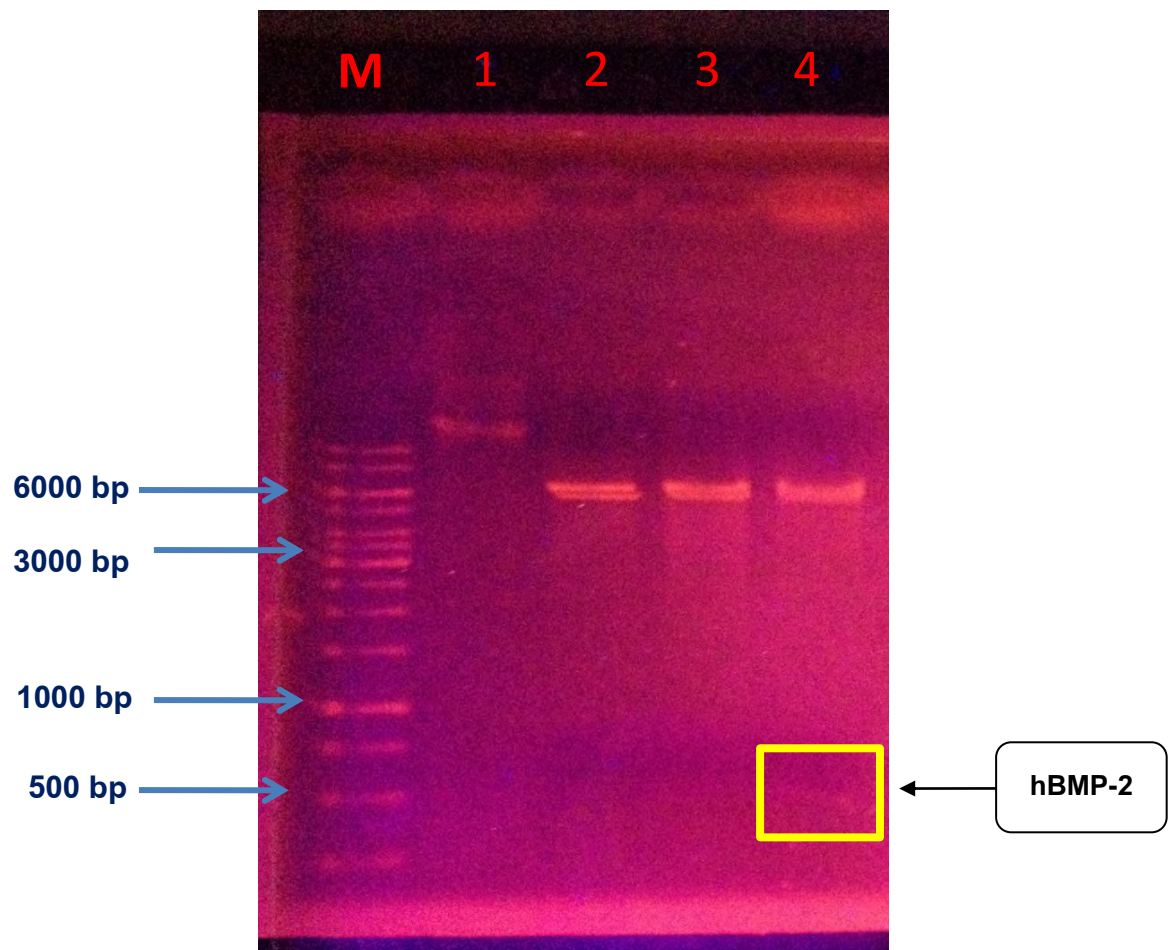


(B)

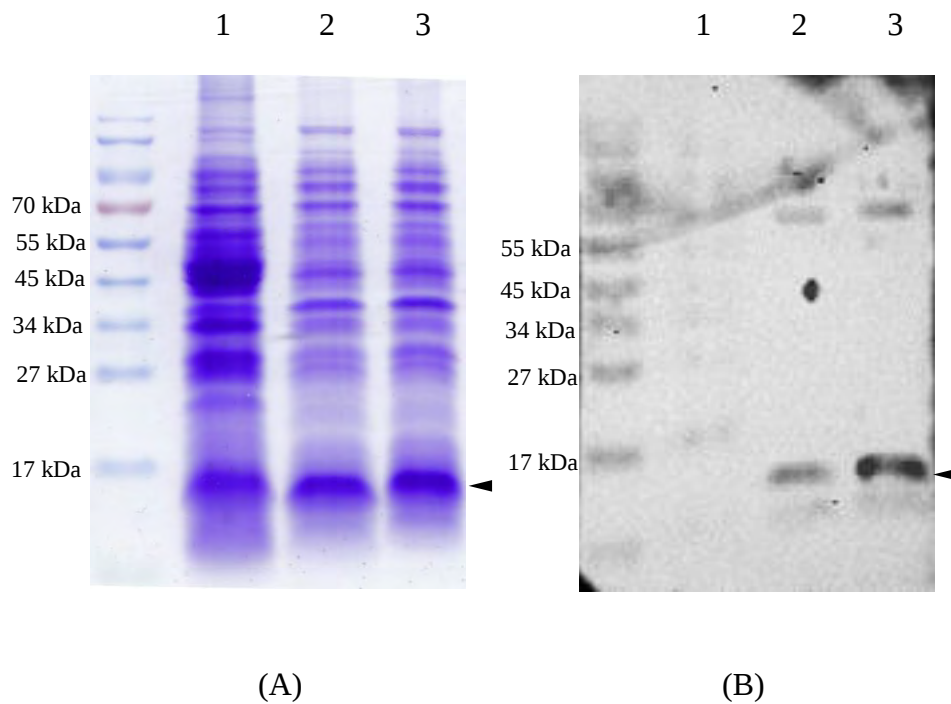
รูปที่ 23 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโคลน pET32a-BMP-2/*E.coli* OrigamiB ที่ความเข้มข้นของ IPTG ที่แตกต่างกัน เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงที่ 37°C และเขย่า 180 rpm เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบการแสดงของโปรตีนในส่วน cytoplasm และ pellet ภาพ (A) แสดง SDS-PAGE analysis และ (B) แสดง Western blot analysis

6. การถ่ายโอนยีนและการศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์พาหะชนิด pET15b ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *E. coli* BL21(DE3)

ยีนสำหรับ mature bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ที่บรรจุในเวกเตอร์พาหะ pJET1.2 ถูกถ่ายโอนเข้าสู่เวกเตอร์ pET15b เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน BMP-2 โดยทำการตัดยีน BMP-2 ของมนุษย์จากเวกเตอร์ pJET1.2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *Nco* I และ *Bam*H I จากนั้นนำชิ้นยีนมาผ่านขั้นตอนการทำให้มีความบริสุทธิ์และทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET15b ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Nco* I และ *Bam*H I เช่นเดียวกัน การเชื่อมต่อนี้ขึ้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ ligase และทำการ transformation เข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL21(DE3) แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มเพื่อนำมาตรวจสอบยีนที่สนใจโดยใช้เทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I และ *Bam*H I (รูปที่ 24) จากผลการทดลองพบว่า โคลน pET15b-BMP-2 ที่ถูกคัดเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ ผลการศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์พาหะชนิด pET15b ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E. coli* BL21(DE3) ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 0.5mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 25 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ในส่วนโปรตีนรวมหลังการแตกเซลล์ (total crude lysate) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 37°C ด้วย 0.5mM IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยโปรตีนมีขนาด 14 kDa



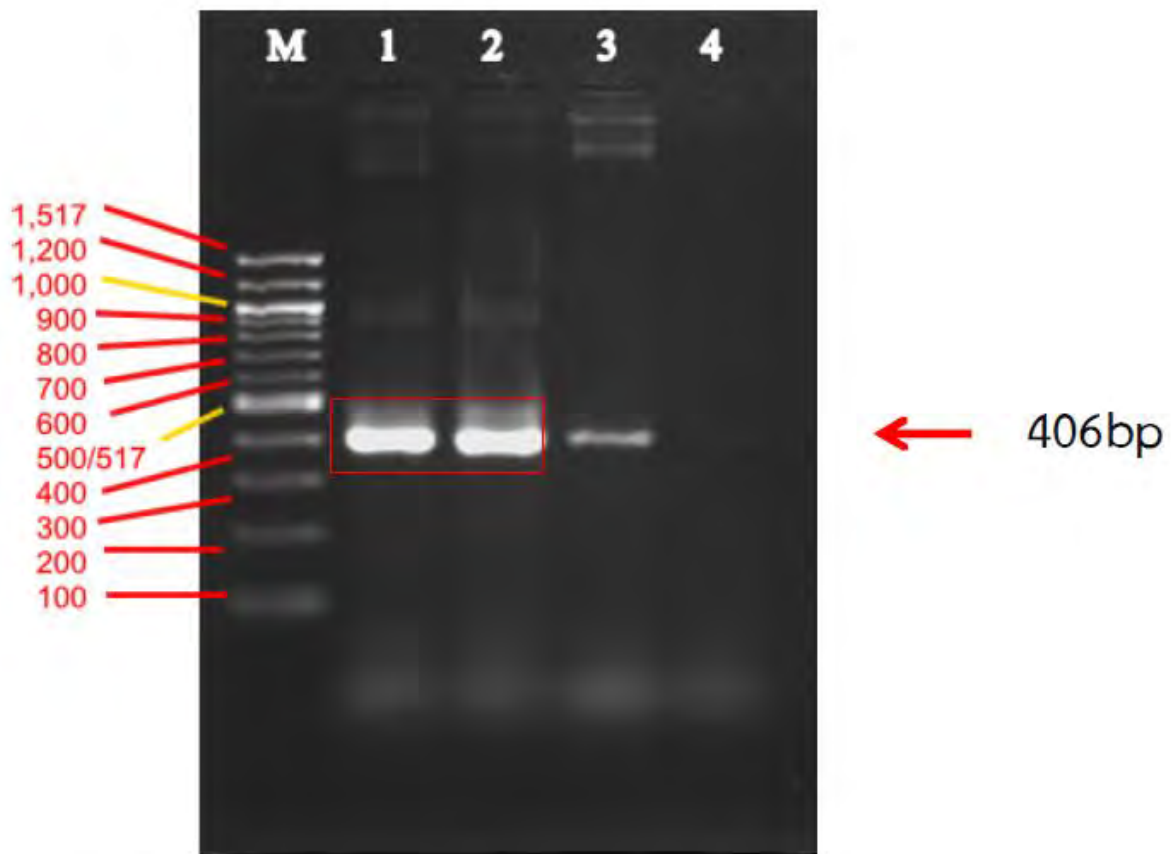
รูปที่ 24 แสดงผลการวิเคราะห์ยีน hBMP-2 ใน pET15b expression vector / *E.coli* BL21(DE3) โดยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะให้ M คือ marker ช่องที่ 1 คือ undigest ช่องที่ 2 คือ digest with *Nco* I ช่องที่ 3 digest with *Bam*H I ช่องที่ 4 คือ double with *Nco* I and *Bam*H I จากผลการตรวจสอบยืนยันด้วยวิธีเอนไซม์ตัดจำเพาะใน pET15b expression vector พบว่าได้ขึ้นยีนขนาด 406bp ซึ่งคาดว่าจะเป็ยีน BMP-2 ของมนุษย์



รูปที่ 25 แสดงผลการแสดงออกของโคลน pET15b-BMP-2 / *E.coli* BL21(DE3) (A) แสดงผลการ SDS-PAGE analysis และย้อมด้วยสี coomassie blue ของ hBMP-2 ที่แสดงออกในเซลล์แบคทีเรียชนิด *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ในรูปแบบของ fusion protein ที่ละลายอยู่ภายในส่วนของ supernatant โดย lane 1 คือ negative control (pET15b ใน *E.coli* XL1-blue) , lane 2 คือ pET15b-BMP-2 ใน *E.coli* BL21(DE3) ที่ผ่านการทำลาย disulfide bond ด้วย β -mercaptoethanol และ lane 3 คือ pET15b-BMP-2 ใน *E.coli* BL21(DE3) (B) แสดงผลการทดสอบด้วย Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ต่อ human BMP-2 ให้ผล positive ที่โปรตีนขนาดประมาณ 14 kDa

7. การศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ ในเวกเตอร์พลาสมิด pET15b ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle[®] T7 Express *E. coli*

เนื่องจากผู้วิจัยต้องการศึกษาการแสดงออกของ BMP-2 ของมนุษย์ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ส่งเสริมการแสดงออกของยีนในรูปแบบ soluble protein รวมทั้งส่งเสริมการสร้างพันธะ disulfide bond ภายในเซลล์แบคทีเรียภายใต้การควบคุมโดย T7 promoter ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle[®] T7 Express *E. coli* ถูกใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่บรรจุในเวกเตอร์พลาสมิด pET15b โดยเริ่มจากนำพลาสมิดเวกเตอร์ pET15b-BMP-2 ที่บริสุทธิ์ มาทำการ transformation เข้าสู่ Competent cells ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle[®] T7 Express *E. coli* แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาตรวจสอบยีนที่บรรจุอยู่โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ดังแสดงในรูปที่ 26 จากผลการวิเคราะห์พบว่า โคลน pET15b-BMP-2 ที่ถูกคัดเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์พลาสมิด pET15b ในแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle[®] T7 Express *E. coli* ศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์โปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังรูปที่ 27 และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 28 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ในส่วน Pellet (ในรูป inclusion body) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 30°C และ 37°C โดยการเหนี่ยวนำที่ 30°C จะเริ่มพบการแสดงออกของ BMP-2 ขนาด 14 kDa ที่เวลา 2 ชั่วโมงและมีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 6 ชั่วโมง



รูปที่ 26 ผลการวิเคราะห์ pET15b-BMP-2/ Shuffle[®] T7 Express *E. coli*
ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

M = 100bp DNA Ladder

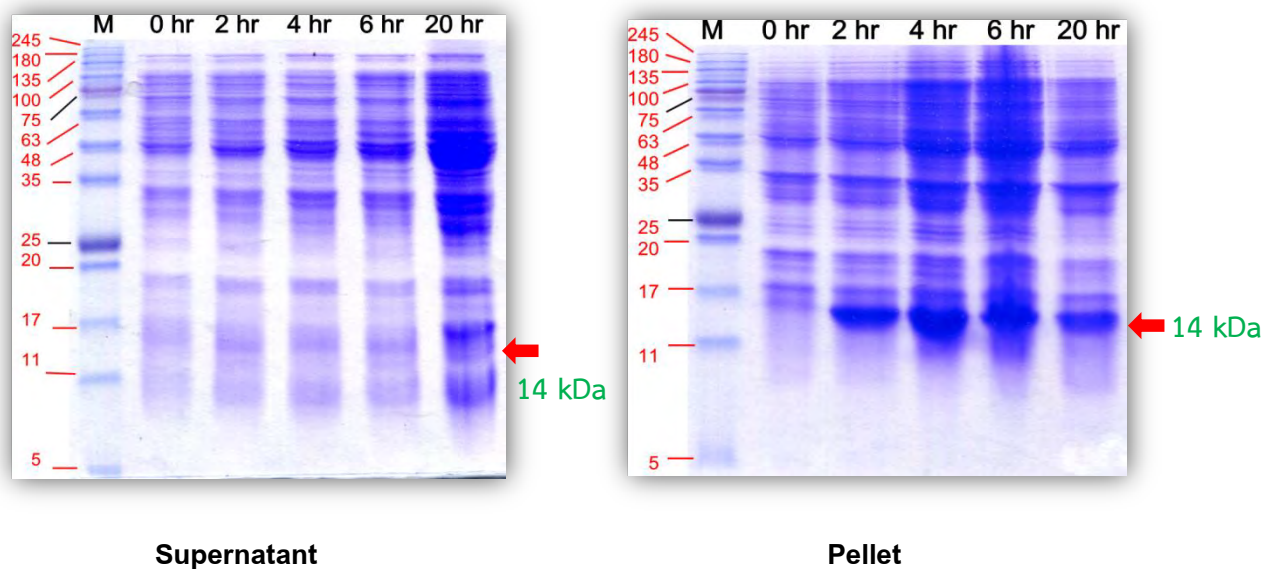
1 = pET15b-BMP-2 / SHuffle[®] T7 Express *E.coli* clone1

2 = pET15b-BMP-2 / SHuffle[®] T7 Express *E.coli* clone2

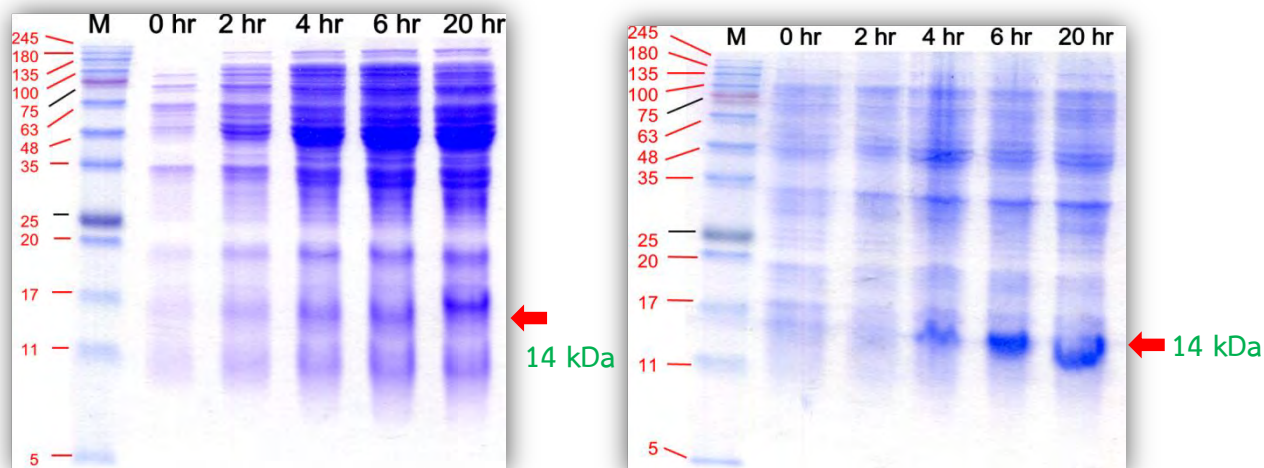
3 =vector pET15b

4 =H₂O

(A) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 30°C



(B) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 37°C

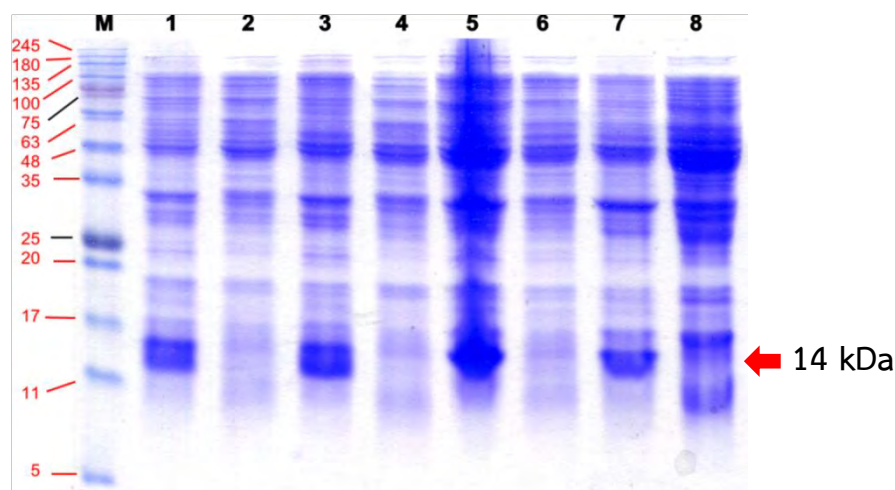


รูปที่ 27 การแสดงออกของโปรตีนโดยเวกเตอร์พาหะ pET15b-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle[®] T7 express *E.coli* ซึ่งวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-PAGE

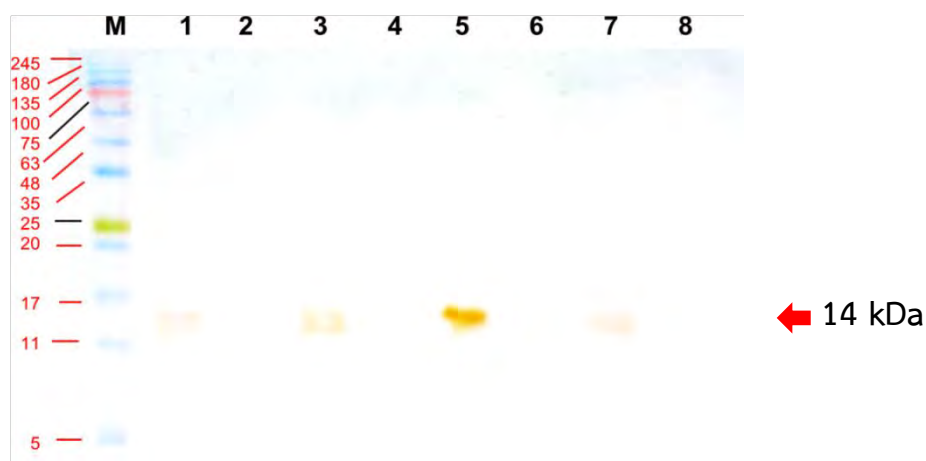
(A) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 30°C ในระยะเวลาต่างๆ

(B) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 37°C ในระยะเวลาต่างๆ

(A) SDS-PAGE



(B) Western blot



รูปที่ 28 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยเวกเตอร์พาหะ pET15b-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle[®] T7 express *E.coli* ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย 1mM IPTG (A) การวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (B) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ monoclonal antibody to human BMP-2 (1:2,000) จากนั้นใช้ Goat anti-mouse-HRP (1:2,000) และติดตามปฏิกิริยาโดยการเกิดสีของ DAB = 3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride และ hydrogen peroxide

M = Protein marker

1 = pellet 2 ชั่วโมง

2 = supernatant 2 ชั่วโมง

3 = pellet 4 ชั่วโมง

4 = supernatant 4 ชั่วโมง

5 = pellet 6 ชั่วโมง

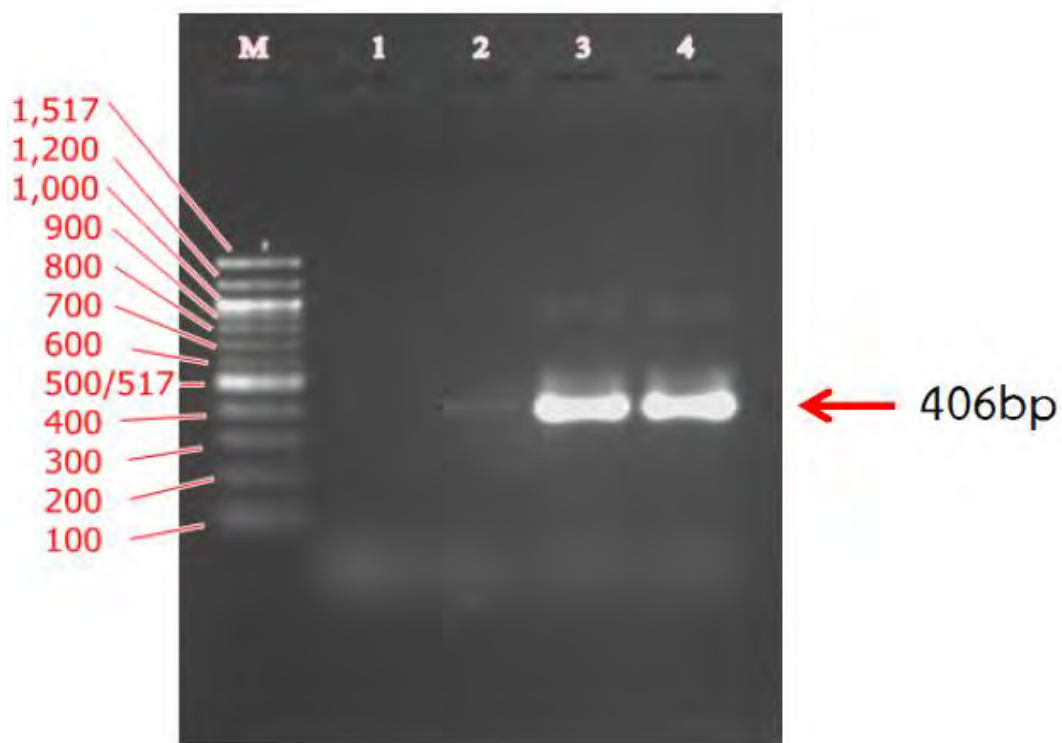
6 = supernatant 6 ชั่วโมง

7 = pellet 20 ชั่วโมง

8 = supernatant 20 ชั่วโมง

8. การศึกษาการแสดงออกสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ ในเวกเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli*

เนื่องจากผู้วิจัยต้องการศึกษาการแสดงออกของ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้ lac/UV5 และ protein A promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ส่งเสริมการแสดงออกของยีนในรูปแบบ soluble protein รวมทั้งส่งเสริมการสร้างพันธะ disulfide bond ภายในเซลล์แบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* ถูกใช้สำหรับศึกษาการแสดงออกของโปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ที่บรรจุในเวกเตอร์พาหะ pEZZ18 โดยเริ่มจากนำพลาสมิดเวกเตอร์ pEZZ18-BMP-2 ที่บริสุทธิ์ มาทำการ transformation เข้าสู่ Competent cells ของแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* แบคทีเรียที่ได้ถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ภายใต้ยาปฏิชีวนะชนิด Ampicillin โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาตรวจสอบยีนที่บรรจุอยู่โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ดังแสดงในรูปที่ 29 และผลการวิเคราะห์โคลนโดยเทคนิคการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoR* I และ *Hind* III (รูปที่ 30) จากผลการวิเคราะห์พบว่า โคลน pEZZ18-BMP-2 / Shuffle® Express *E. coli* ที่ถูกคัดเลือกบรรจุยีนที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ตรงกับขนาดของยีน BMP-2 ของมนุษย์ การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์โดยใช้เวกเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 ในแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle® Express *E. coli* ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 1 mM IPTG เป็นเวลา 0, 2, 4, 6 และ 20 ชั่วโมง และวิเคราะห์โปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังรูปที่ 31 และการติดตามด้วยเทคนิค Western blot ดังรูปที่ 32 พบว่า มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ทั้งในส่วนของ Supernatant (ในรูป soluble protein) และในส่วนของ Pellet (ในรูป inclusion body) ภายใต้การเหนี่ยวนำที่ 30°C และ 37°C โดยการเหนี่ยวนำที่ 30°C จะเริ่มพบการแสดงออกของ BMP-2 ขนาด 28 kDa ที่เวลา 2 ชั่วโมงทั้งส่วนของ Supernatant และในส่วนของ Pellet โดยระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการแสดงออกจะมีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกมาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้น และพบมีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 20 ชั่วโมง



รูปที่ 29 ผลการวิเคราะห์ pEZZ18-BMP-2 / Shuffle[®] Express *E. coli*
ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

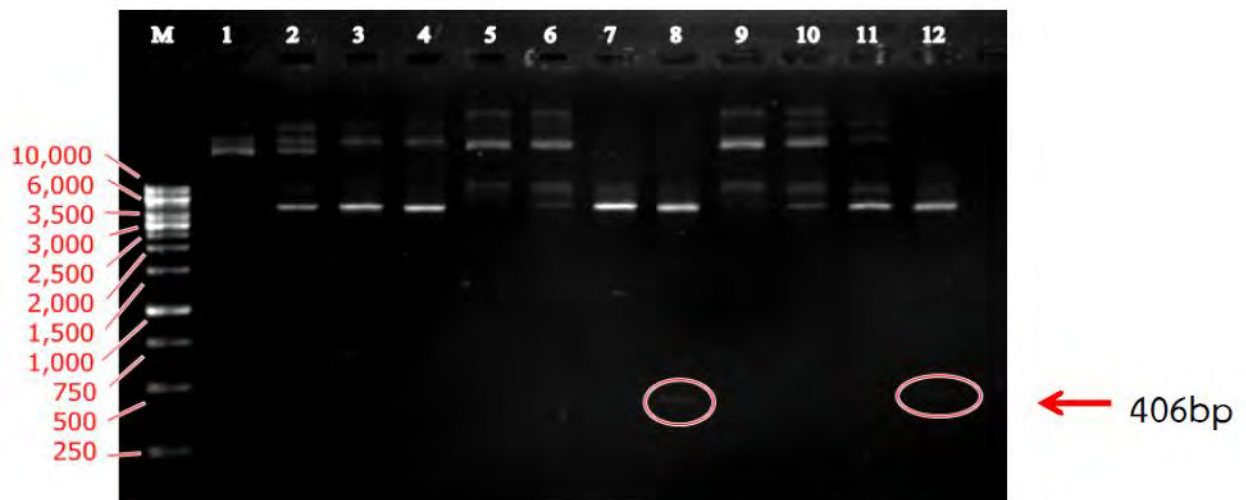
M = Marker 100bp DNA Ladder

1 = ผลิตราก PCR โดยใช้ H₂O เป็น Template

2 = ผลิตราก PCR โดยใช้ Vector pEZZ18 เป็น Template

3 = ผลิตราก PCR โดยใช้ pEZZ18-BMP-2 clone 1 เป็น Template

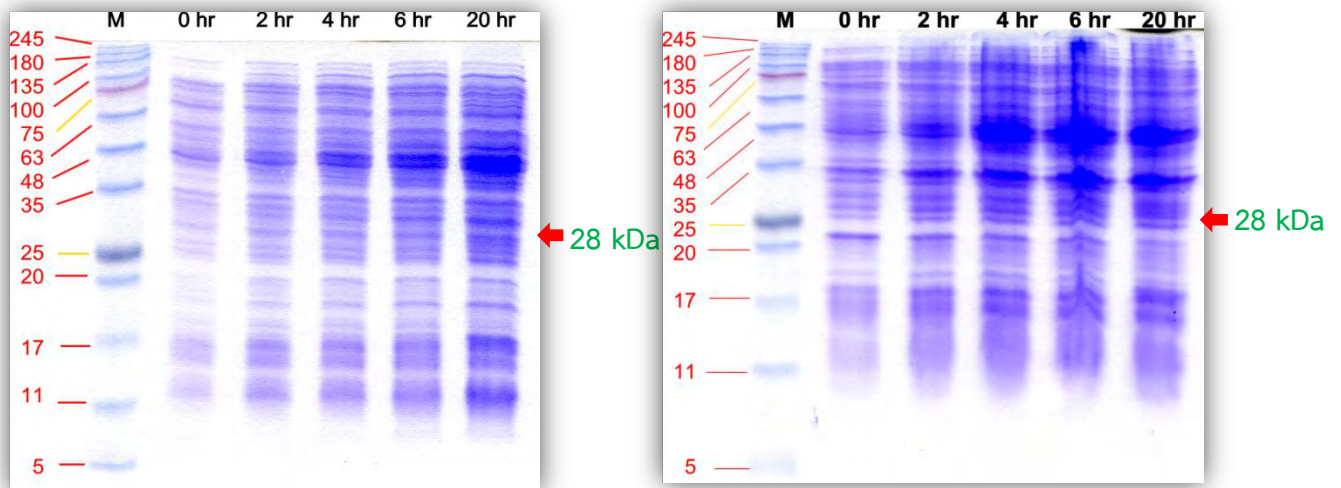
4 = ผลิตราก PCR โดยใช้ pEZZ18-BMP-2 clone 2 เป็น Template



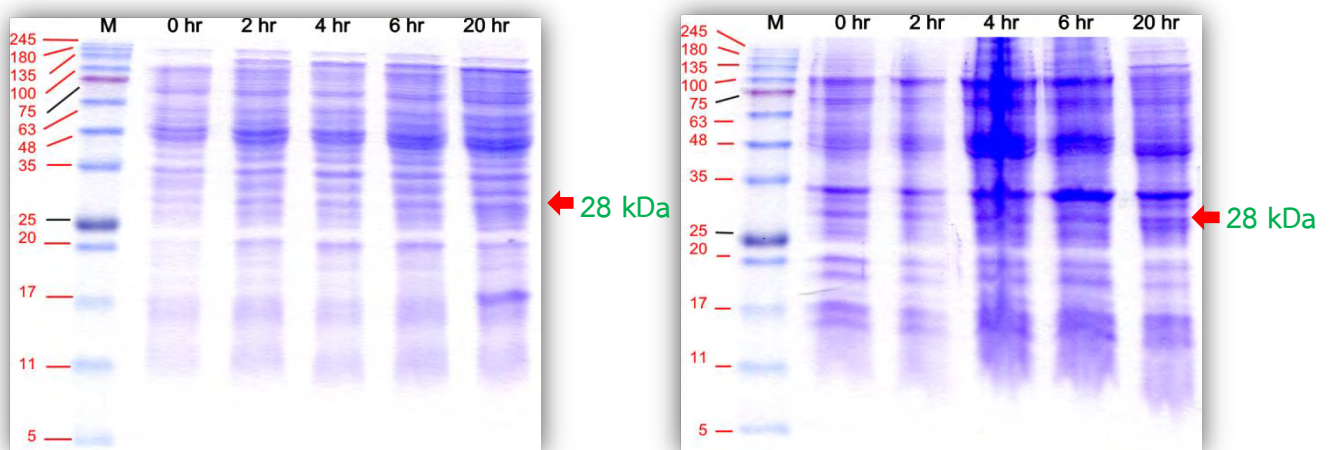
รูปที่ 30 แสดงผลจากการวิเคราะห์ pEZZ18-BMP-2 / Shuffle[®] Express *E. coli*
ด้วยเอนไซม์ *EcoR* I และ *Hind* III

- | | |
|---|--|
| 1 = pEZZ18 uncut | 7 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) + <i>Hind</i> III |
| 2 = pEZZ18+ <i>EcoR</i> I | 8 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) + <i>E</i> + <i>H</i> |
| 3 = pEZZ18+ <i>Hind</i> III | 9 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) uncut |
| 4 = pEZZ18 + <i>E</i> + <i>H</i> | 10 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) + <i>EcoR</i> I |
| 5 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) uncut | 11 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) + <i>Hind</i> III |
| 6 = pEZZ18-BMP-2 (clone1) + <i>EcoR</i> I | 12 = pEZZ18-BMP-2 (clone2) + <i>E</i> + <i>H</i> |

(A) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 30°C



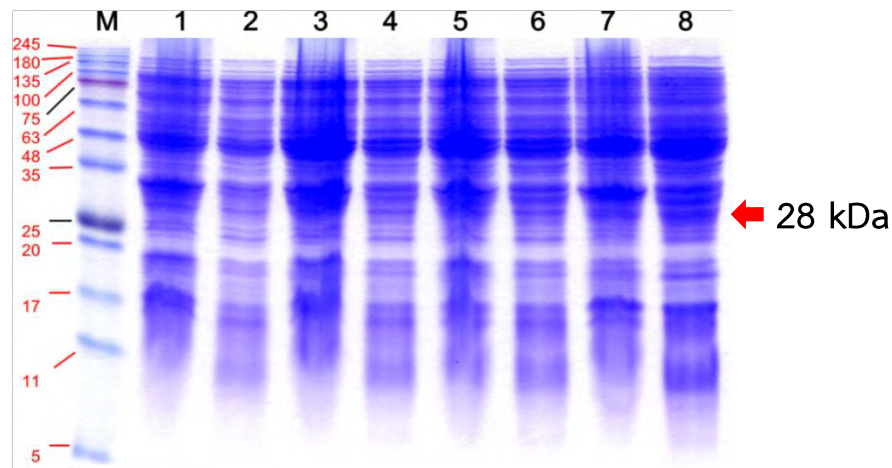
(B) การแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 37°C



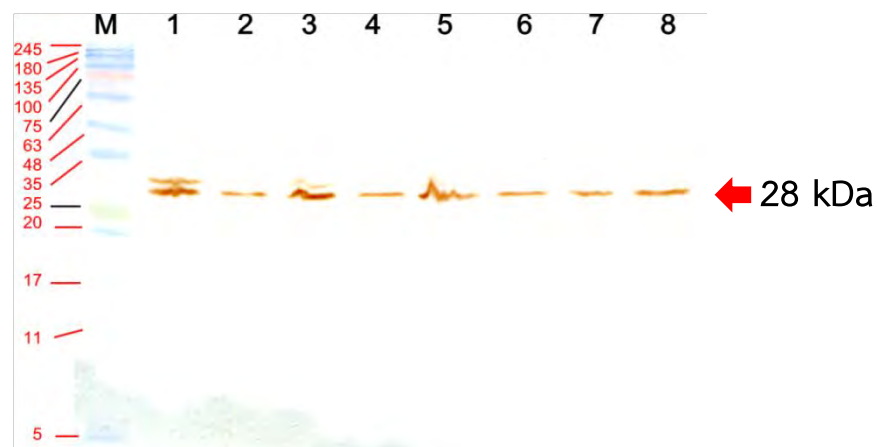
รูปที่ 31 การแสดงออกของโปรตีนโดยเวกเตอร์พาหะ pEZZ18-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle® Express *E.coli* ซึ่งวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-PAGE

- (A) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 30°C ในระยะเวลาต่างๆ
 (B) การแสดงออกของโปรตีนในส่วน supernatant และ pellet ที่อุณหภูมิ 37°C ในระยะเวลาต่างๆ

(A) SDS-PAGE



(B) Western blot



รูปที่ 32 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยเวกเตอร์พาหะ pEZZ18-BMP-2 ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ SHuffle® express *E.coli* ที่อุณหภูมิ 30°C ด้วย 1mM IPTG (A) การวิเคราะห์โปรตีนบน 15%SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (B) การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot โดยใช้ monoclonal antibody to human BMP-2 (1:2,000) จากนั้นใช้ Goat anti-mouse-HRP (1:2,000) และติดตามปฏิกิริยาโดยการเกิดสีของ DAB (3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) และ hydrogen peroxide

M = Protein marker

1 = pellet 2 ชั่วโมง

2 = supernatant ชั่วโมง

3 = pellet 4 ชั่วโมง

4 = supernatant 4 ชั่วโมง

5 = pellet 6 ชั่วโมง

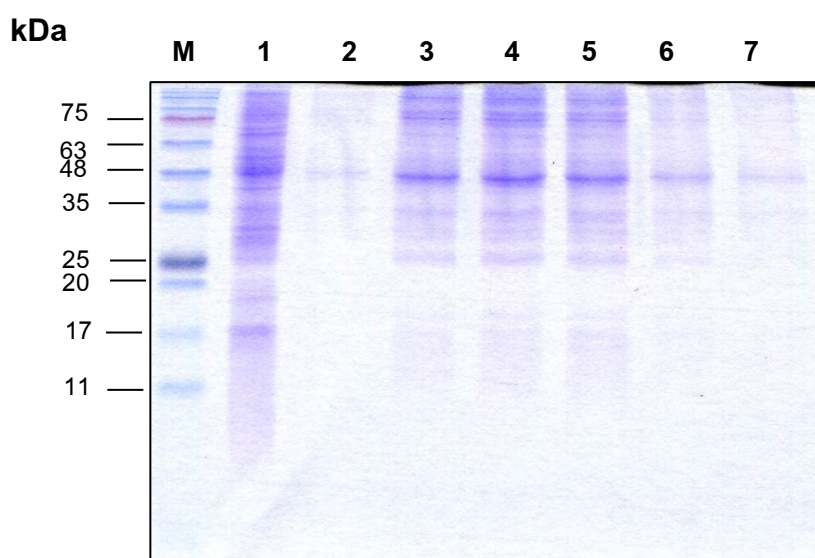
6 = supernatant 6 ชั่วโมง

7 = pellet 20 ชั่วโมง

8 = supernatant 20 ชั่วโมง

9. การแยกบริสุทธิ์สำหรับรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ด้วยเทคนิค Nickle affinity chromatography

เวกเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 ซึ่งบรรจุยีนสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์ ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ Shuffle[®] Express *E. coli* ถูกทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่อุณหภูมิ 30°C ภายใต้การเหนี่ยวนำด้วย 1mM IPTG ส่วน crude supernatant จากการแตกเซลล์ถูกทดสอบการจับกับ Ni-NTA resin และทำการชะล้างด้วย imidazole ความเข้มข้นสูง ผลการวิเคราะห์โปรตีนบน SDS-PAGE พบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์(รูปที่ 33) จึงสรุปได้ว่า เทคนิคการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ออกจากโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ สามารถอาศัยการจับกันระหว่าง histidine residues ที่ติดอยู่กับโปรตีน hBMP-2 กับ Ni-NTA affinity resin ได้



รูปที่ 33 การย้อมสี Comassie blue staining ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ด้วยเทคนิค Ni-NTA affinity chromatography ภายใต้ 15%non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 150 volts เป็นเวลา 60 นาที

- M = Protein standard marker
- 1 = Crude supernatant
- 2 = Eluted fraction 1
- 3 = Eluted fraction 2
- 4 = Eluted fraction 3
- 5 = Eluted fraction 4
- 6 = Eluted fraction 5
- 7 = Eluted fraction 6

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) ของมนุษย์เป็นโปรตีนที่สำคัญในการกระตุ้นการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อนและเซลล์กระดูกของมนุษย์ รวมทั้งการกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) เป็นเซลล์ต้นตัวอ่อนของกระดูกอ่อนและเซลล์กระดูก ดังนั้นโปรตีนชนิดนี้จึงมีประโยชน์ในด้านการรักษาโรคของกระดูกอ่อนและโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกเป็นอย่างยิ่ง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด BMP-2 ของมนุษย์ในระบบของเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย โดยได้ทำการคัดแยกยีนที่กำหนดการสร้าง mature human BMP-2 ซึ่งสกัดได้จากเซลล์กระดูกกระดูกอ่อนตัวอ่อน (Human fetal osteoblast cell line) เซลล์ถูกเลี้ยงให้ได้ปริมาณที่เพียงพอและนำมาสกัด Total RNA จากนั้นทำการเตรียมเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase และ oligo dT₁₈ primer การเพิ่มปริมาณยีนของ mature human BMP-2 ทำโดยอาศัยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ดีเอ็นเอนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์และทำการเพิ่มปริมาณอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเพิ่มลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR* I และ *Nco* I ต่อด้วยลำดับเบสสำหรับ 6xHistidine tag, Factor Xa ทางปลาย 5' และมีการเพิ่มบริเวณของเบสที่หยุดการสร้างสายโปรตีน (stop codon) และบริเวณสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Hind* III ทางปลาย 3' การออกแบบลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเพิ่มบริเวณของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว เพื่อประโยชน์ในการนำชิ้นยีนเข้าสู่เวกเตอร์พาหะและนำไปแยกบริสุทธิ์ต่อไป ผลิตภัณฑ์ที่ได้ถูกนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pJET-1.2 และทำการตรวจสอบโดยอาศัยเทคนิค PCR ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนสำหรับ BMP-2 ของมนุษย์ โคลนในพลาสมิดเวกเตอร์ถูกทำการถ่ายโอนเข้าสู่ดีเอ็นเอพาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนชนิดต่างๆ ในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน และศึกษาการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิด BMP-2 ของมนุษย์

ยีนที่จำเพาะต่อ BMP-2 ของมนุษย์ (Homo sapiens bone morphogenetic protein 2 (BMP2), mRNA) ได้ถูกค้นหามาจากฐานข้อมูลสากล Genbank sequence database จาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ผู้วิจัยได้เลือกบริเวณยีนซึ่งมีรายงานว่าเป็นลำดับเบสที่จำเป็นสำหรับการทำหน้าที่ของ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์หรือเรียกว่า mature human bone morphogenetic protein-2 เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณยีนสำหรับ mature BMP-2 ให้มากขึ้น การวิเคราะห์จากฐานข้อมูลพบว่า ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 283 ถึง 396 (114 amino acids) จำเป็นสำหรับ mature BMP-2 ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1632 ถึง 1973 (342 คู่เบส) และลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ถูกนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนสำหรับ mature BMP-2 หลังจากการเพิ่มปริมาณยีนโดยอาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (PCR) พบว่ามีการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้แถบเดียว โดยมีขนาดใกล้เคียงกับยีนสำหรับ mature BMP-2 (342 คู่เบส) ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นนี้มีความเป็นไปได้สูงว่า ดีเอ็นเอที่แยกได้เป็นยีนสำหรับ mature BMP-2 ของมนุษย์

ต่อมานำท่อนดีเอ็นเอนี้มาเพิ่มลำดับเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะและเพิ่มบริเวณของกรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว โดยเทคนิค PCR อีกครั้งเพื่อประโยชน์ในการแยกบริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการของ Ni-NTA affinity chromatography และการถ่ายโอน (subcloning) เข้าสู่เวกเตอร์พาหะที่ต้องการ ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นยีนโดยเทคนิค PCR นั้นได้ทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนการ Annealing เพื่อให้มีการจับกันอย่างจำเพาะมากขึ้นระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถแยกและเพิ่มปริมาณยีน BMP-2 ของมนุษย์อย่างมีความจำเพาะได้ผลิตภัณฑ์เป็นชิ้นดีเอ็นเอแถบเดี่ยวที่มีขนาด 342 คู่เบส โดยองค์ประกอบและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ PCR ใช้ Annealing temperature อยู่ระหว่าง 48.4°C – 54.6°C และเมื่อทำ PCR อีกครั้งเพื่อเพิ่มตำแหน่งของเบสสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ กรดอะมิโนฮิสติดีน 6 ตัว และบริเวณกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด Factor Xa ผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในขั้นตอนของ Annealing step อยู่ระหว่าง 51.4°C – 58.8°C สามารถเพิ่มดีเอ็นเอได้แถบเดี่ยวที่มีขนาด 406 คู่เบส ดังนั้นผู้วิจัยจึงประสบความสำเร็จในการแยกและเพิ่มปริมาณยีนที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์พาหะ ในเบื้องต้นการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์พาหะชนิด pJET1.2 โดยอาศัยหลักการของ Blunt-end ligation ซึ่งนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้โดยตรงมาเข้าสู่ขบวนการทำให้เกิดปลายทู่ (blunt end) ทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์พาหะ และนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย หลักการนี้มีข้อดีที่ลดขั้นตอนการแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอผ่านเจล และการที่ดีเอ็นเอจะไม่ได้รับผลกระทบจากแสงอัลตราไวโอเลต จึงลดโอกาสการเกิดความผิดปกติบนสายดีเอ็นเอ และวิธีนี้มีความสะดวก รวดเร็ว รีคอมบีแนนท์โคลนที่สนใจถูกเลือกแบบสุ่มและนำมาวิเคราะห์เบื้องต้นโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ mature BMP-2 ของมนุษย์ พบว่า โคลนที่ถูกคัดเลือกสามารถเพิ่มจำนวนได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นแถบเดี่ยว และมีขนาดใกล้เคียงกับยีนสำหรับ mature BMP-2 โคลนเหล่านี้ได้ถูกนำมาตรวจสอบเพิ่มเติมโดยอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดได้แก่ *EcoR* I และ *BamH* I ผลการวิเคราะห์พบรีคอมบีแนนท์โคลนที่แสดงขนาดของท่อนดีเอ็นเอหลังจากการตัดมีขนาดประมาณ 406 คู่เบส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้นี้มีขนาดใกล้เคียงกับยีนสำหรับ mature BMP-2 ที่ทำการเพิ่มลำดับเบสของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ถูกเพิ่มในบริเวณ 5' และ 3' ของชิ้นดีเอ็นเอ เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะพบในชิ้นดีเอ็นเอที่โคลนเข้าสู่เวกเตอร์พาหะเท่านั้น จะไม่พบในเวกเตอร์ซึ่งไม่มีชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ ดังนั้นจากการวิเคราะห์รีคอมบีแนนท์โคลนโดยอาศัยเทคนิค PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงมีความเป็นไปได้สูงว่า รีคอมบีแนนท์โคลนที่ถูกคัดเลือกมียีนที่สนใจ คณะผู้วิจัยได้ทำการหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในเวกเตอร์พาหะโดยอาศัยเทคนิคการตรวจหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ เพื่อเป็นการพิสูจน์ลำดับเบสที่ถูกต้อง ลำดับเบสที่ได้ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลนานาชาติ ผลการวิเคราะห์พบว่า ชิ้นดีเอ็นเอมีลำดับเบสตรงกับยีน mature BMP-2 ของมนุษย์ 100% จึงสรุปได้ว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ศึกษาคือ ดีเอ็นเอสำหรับยีน Bone morphogenetic protein-2 ของมนุษย์จริง

ในการศึกษาการผลิต BMP-2 ของมนุษย์ในเซลล์แบคทีเรีย ผู้วิจัยได้ทำการย้ายชิ้นยีนจากพลาสมิดเวกเตอร์ pJET1.2 เข้าสู่เวกเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ pEZZ18, pET15b และ pET32a ในเซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ

การศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียทำได้โดยนำยีน BMP-2 ของมนุษย์ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสมิดเวกเตอร์ pJET1.2 ย้ายเข้าสู่เวกเตอร์พาหะสำหรับการแสดงออกของโปรตีนทั้งสามชนิดดังกล่าว ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย lacUV5 promoter และ T7 promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อหาชนิดของ expression vector และสายพันธุ์แบคทีเรียที่เหมาะสมกับการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ได้ดียีน BMP-2 ของมนุษย์ซึ่งบรรจุอยู่ในพลาสมิดเวกเตอร์ pJET1.2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ BamHI แล้วจึงทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์พาหะ pET15b และ pET32a ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ NcoI และ BamHI เช่นเดียวกันด้วยหลักการ Sticky end ligation จากนั้นทำการ Transformation ด้วยวิธีการเปลี่ยนแปลงความร้อน (Heat shock method) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านชนิดที่เหมาะสม เวกเตอร์พาหะชนิด pET15b ซึ่งบรรจุยีน ยีน BMP-2 ของมนุษย์ถูกนำเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* BL21(DE3) และ Shuffle[®] T7 express *E.coli* ตามลำดับ สำหรับเวกเตอร์พาหะชนิด pET32a ซึ่งบรรจุยีน BMP-2 ของมนุษย์ถูกนำเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ Origami B รีคอมบิแนนท์โคลนที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้ยาปฏิชีวนะถูกตรวจสอบว่ามียีน BMP-2 ของมนุษย์ในเซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวด้วยวิธี PCR และการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด NcoI และ BamHI ผลการวิเคราะห์พบชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนได้และชิ้นยีนที่ถูกตัดออกมามีขนาดคงเดิม (406 คู่เบส) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลสำเร็จในการย้ายชิ้นยีน BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวกเตอร์ pET15b ในเซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* BL21(DE3) และ Shuffle[®] T7 express *E.coli* รวมทั้งประสบความสำเร็จในการสำหรับย้ายชิ้นยีน BMP-2 ของมนุษย์เข้าสู่เวกเตอร์ pET32a ในเซลล์เจ้าบ้านสายพันธุ์ Origami B

การศึกษาแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิด pET15b และ pET32a อาศัยหลักการของการเหนี่ยวนำ T7 promoter และใช้ lysogen ของ bacteriophage DE3 และ T7 RNA polymerase เมื่อมีการกระตุ้นด้วย isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) ภายใต้อุณหภูมิที่ 30°C และ 37°C จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ขนาด 14 กิโลดาลตัน โดยใช้เวกเตอร์พาหะชนิด pET15b ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* BL21(DE3) และ Shuffle[®] T7 express *E.coli* ในรูปแบบ inclusion bodies ในส่วน pellet เท่านั้น ไม่พบการแสดงออกในส่วน supernatant เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ในขณะที่ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิด pET32a พบว่า มีการแสดงออกของ hBMP-2 ขนาด 28 กิโลดาลตัน ในรูปแบบทั้ง soluble protein ในส่วน crude supernatant และพบ inclusion bodies ในส่วน pellet โดยจะพบการแสดงออกในรูปแบบ soluble protein ได้มากเมื่อถูกชักนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 0.1mM ดังแสดงในการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human mBMP-2 จากผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ภายใต้การควบคุมด้วย

T7 promoter โดยมี fusion protein ชนิด Thioredoxin (Trx) ร่วมด้วยพบว่า การมี Trx fusion protein ร่วมอยู่ด้วยสามารถช่วยการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ให้สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้ หากไม่มี fusion protein ชนิดนี้อยู่จะเกิดการแสดงออกในรูปแบบ inclusion bodies เท่านั้น

การศึกษาแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยอาศัยเวกเตอร์พาหะชนิด pEZZ18 อาศัยหลักการของการเหนี่ยวนำภายใต้ lacUV5 promoter และ protein A promoter ในแบคทีเรียสายพันธุ์ *E.coli* XL1-Blue และ Shuffle[®] Express *E.coli* โดยการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ human mBMP-2 พบว่าการแสดงออกของ hBMP-2 ขนาด 28 กิโลดาลตัน ทั้งในส่วน soluble protein และส่วน pellet เมื่อทำการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ภายใต้การชักนำด้วย 1mM IPTG ซึ่งการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C จะสามารถผลิต hBMP-2 ในรูปแบบ soluble protein ได้ปริมาณมากกว่า จึงสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ภายใต้การควบคุมของ lacUV5 promoter และ protein A promoter ในรูปแบบ soluble protein เมื่อมีการแสดงออกที่อุณหภูมิ 30°C เมื่อชักนำด้วย 1mM IPTG ซึ่งสรุปได้ว่าการมี fusion protein ชนิด ZZ สามารถช่วยให้โครงสร้างและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ สามารถผลิตในรูปแบบ soluble protein ได้

การศึกษากการแยกบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ ทำโดยนำส่วนของ cytosol part (soluble protein) มาแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคของ Ni-NTA affinity chromatography โดยมีหลักการคือ การเกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างกรดอะมิโนฮิสติดีนจำนวน 6 ตัว (6xHistidine tag) ซึ่งจะเกิดการสร้างพันธะกับ Ni-NTA resin อย่างจำเพาะและทำการชะล้างออกจากคอลัมน์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ imidazole จากผลการทดลองสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัยสามารถใช้เทคนิค Ni-NTA affinity chromatography สำหรับการแยกบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์โปรตีน BMP-2 ของมนุษย์ โดยสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนชนิดอื่นออกไปได้จำนวนมาก ซึ่งสามารถนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการกระตุ้นเซลล์กระดูกหรือกระดูกอ่อนต่อไป

ปัญหาและอุปสรรค

เซลล์ที่มีการแสดงออกของ Bone morphogenetic proteins ซึ่งจะนำมาสกัดยีนนั้นมีราคาสูงจึงต้องอาศัยความร่วมมือจากผู้ร่วมวิจัยภายนอกโดยผ่านทางนักวิจัยที่ปรึกษา เซลล์นี้ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษต้องใช้ระยะเวลาสั้น และมีราคาสูง รวมทั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณเพียงพอค่อนข้างช้าต้องอาศัยระยะเวลานาน นอกจากนี้เนื่องจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เกี่ยวข้องกับงานด้าน Molecular biology techniques และเป็นการเริ่มต้นการวิจัยของผู้วิจัย จึงต้องหาเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ให้ความเหมาะสมกับการทดลอง รวมทั้งใช้ระยะเวลาในการสังเคราะห์หรือชุดสกัดต่างๆระยะหนึ่ง และส่วนใหญ่มีราคาค่อนข้างสูง จึงทำให้มีอุปสรรคบ้างในช่วงเริ่มต้นของการวิจัย นอกจากนี้ช่วงเวลาในการทำวิจัยนี้ส่วนหนึ่งข้าพเจ้า ดร.วราภรณ์ เกษกาญจน์ หัวหน้าโครงการได้อยู่ในช่วงการได้รับเชิญไปทำวิจัยในฐานะ Visiting Researcher ณ มหาวิทยาลัยนาโกย่า เมืองนาโกย่า ประเทศญี่ปุ่น (ตั้งแต่วันที่ 20 ตุลาคม 2551 จนถึง 31 มีนาคม 2553 ตามที่ได้แจ้งกับทางผู้อำนวยการฝ่ายวิชาการ สกว.ได้รับทราบไปแล้วนั้น) นอกจากนี้ข้าพเจ้าได้ย้ายสังกัดจากเดิมภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ เปลี่ยนสังกัดใหม่เป็นภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ จังหวัดพิษณุโลก จึงทำให้การติดตามผลการวิจัย การแก้ไขปัญหาและอุปสรรคมีความล่าช้าไปบ้าง แต่อย่างไรก็ดีคณะผู้วิจัยก็มีความตั้งใจอุทิศสละในการดำเนินการวิจัยในโครงการนี้ให้บรรลุเป้าหมายตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

Output จากโครงการวิจัย

1. ได้ยื่นสำหรับ Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ และได้องค์ความรู้ในการศึกษารีคอมบิแนนท์โปรตีน Bone Morphogenetic Protein-2 ของมนุษย์ โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยด้านกระดูกและกระดูกอ่อนต่อไป
2. เผยแพร่ผลงานวิจัยประชุมระดับนานาชาติในรูปแบบโปสเตอร์ เรื่อง “Molecular Cloning of Gene Encoding Human Bone Morphogenetic Protein-2” The 2nd Thailand-Japan International Academic Conference (TJIA2009): Integrated Research for Sustainable Development, November 20, 2009 ณ มหาวิทยาลัยเกียวโต เมืองเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น (Abstract ในภาคผนวก)
3. เผยแพร่ผลงานวิจัยประชุมระดับชาติในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อ Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in *Escherichia coli* ในการประชุม “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 10 ระหว่างวันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี (Abstract ในภาคผนวก)

เอกสารอ้างอิง

- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 185: 98-106.
- O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 1795-1812.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from the human bone marrow. *Bone* 1992; 13: 81-95.
- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA. The function of adipocyte in the bone marrow stroma ; an update. *Bone* 1996; 19: 421-428.
- Ferrari G, Angelis GC, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Mavillo F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue engineering* 1998; 4: 415-428.
- Young JU, Barthel TS, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for achilles tendon repair. *Journal of Orthopedic Research* 1998; 16: 406-413.
- Linkhard TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 1996; 19: 1S-12S.
- O'Driscoll SW. Articular cartilage regeneration using periosteum. *Clin Orthop* 1999; S186-S203.
- Majumdar MK, Banks V, Peluso DP, Morris EA. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 2000; 185: 98-106.
- Reddi AH. Regeneration of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4: 850-855.
- Schmitt B, Ringe J, Haupl T, Nötter M, Manz R, Burmester GR, Sittinger M, Kaps C. BMP-2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation* 2003; 71: 567-577.
- Duprez DM, Coltey M, Amthor H, Brickell PM, Ticke C. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) inhibits muscle development and promotes cartilage formation in chick limb bud cultures. *Dev Biol* 1996; 174: 448-452.

- Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, Tuan RS, Hall DJ. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 2001; 67: 128-138.
- Luyton FP, Yu YM, Yanagishita M, Vukicevic S, Hammonds RG, Reddi AH. Natural bovine osteogenin and recombinant human bone morphogenetic protein-2B are equipotent in the maintenance of proteoglycans in bovine articular cartilage explant cultures. *J Biol Chem* 1992; 267: 3691-3695.
- Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 maintains the articular chondrocyte phenotype in long-term culture. *J Orthop Res* 1996; 14: 937-945.
- Aigner T, Soeder S, Haag J. IL-1 β and BMPs - Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *European Cells and Materials* 2006; 12: 49-56.
- Haynesworth SE, Goshima I, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; 13: 81-88.
- Bobis S, Jaracha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 2006; 44(4): 215-230.
- Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(1): 32-45.
- Ishikawa H, Kitoh H, Sugiura F, Ishiguro N. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthopaedica* 2007; 78(2): 285-292.
- Seller R, Zhang R, Glasson S, Kim H, Peluso D, D'Augusta D, Beckwith K, Morris E. Repair of articular cartilage one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A: 151-160.
- Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 (in press).

ภาคผนวก

Molecular Cloning of Gene Encoding Human Bone Morphogenetic Protein-2

Waraporn Kasekarn, Tawan Chokeypaichitkool, Prachya Kongtawelert

Thailand Excellence Center for Tissue Engineering, Department of Biochemistry,

Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Tel.: +66-5-394-5322-3 ext. 225, Fax: +66-5-394-0361

E-mail address: kasekarn@chiangmai.ac.th

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. To investigate the mechanism of chondrogenesis and osteogenesis underlying the role of BMP-2, the sufficient amount of recombinant human BMP-2 with functionally active is needed. Here, a gene encoding mature human BMP-2 was isolated and sequenced. Human BMP-2 expressed cell was cultured and extracted the total RNA. The complementary DNA was prepared by using reverse transcriptase and oligo dT₁₈ primer. A single band at 342 bp in length (114 amino acids) of gene encoding mature human BMP-2 was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The secondary PCR was performed to add nucleotide sequences coding for the restriction sites of *EcoR* I, 6xHistidine tag and factor Xa at 5' end, whereas *Bam*H I was incorporated at its 3' end. A 406 bp of amplified product obtained was ligated into the cloning vector using blunt-end ligation and transformed into *E.coli* host cells. Recombinant plasmids were randomly selected, characterized and verified the nucleotide sequences by using automated DNA sequencing. Analysis of insert nucleotide sequences showed the perfect similarity with human BMP-2 gene. In conclusion, we successfully cloned the gene encoding human BMP-2. This construct will be utilized for production recombinant human BMP-2, which will provide an important material for cartilage tissue engineering and might be applied for clinical therapy.

1. Introduction

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are the key regulatory factors in chondrogenic and osteogenic differentiation, and also function in repair and remodeling of the adult skeletal system [1]. BMPs have been involved in the regulation of cell proliferation, survival, differentiation, apoptosis and stem cell properties. BMPs are the multi-functional growth factors belonging to the TGF- β superfamily, their binding lead to dimerization of receptors prior to phosphorylation and signaling through the Smad pathway [2]. Among others, BMP-2 is an attractive growth factor which regulates chondrogenic development of mesenchymal progenitors and stimulates the synthesis of chondrocyte matrix components by human articular chondrocytes *in vitro*. Therefore, the more information about the action of human BMP-2 on development and its role on chondrocyte is needed to be fulfilled; however, the limitation of studies involves the lack of sufficient amount of human BMP-2. The aim of the present study

was to clone the gene encoding the human BMP-2, as an important material for production of the recombinant human BMP-2 for studying its function on chondrocyte development and proliferation and potential clinical applications.

2. Methodology

Human fetal osteoblast cell line (hFOB) was cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 50 units/ml penicillin G and 50 μ g/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Total RNA extraction was prepared and reverse transcribed into the complementary DNA (cDNA) by using the oligo (dT)₁₈ primer using the first strand cDNA Synthesis kit. The primers mBMP-2_1: 5' CAAGCCAAACACAAACAGCG 3' (forward primer), and mBMP-2_2: 5' GCGACACCCA CAACCCTC 3' (reverse primer), corresponding to sequences in the coding region of the mature human BMP-2 gene, were

selected for PCR amplification. The condition that used for PCR is 35 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min. The reaction (25µl) consisted of cDNA template, 10 pmol each of primers, 200µM of each dNTPs, 1.5mM MgCl₂ in reaction buffer, pH8.5. The amplified gene was gel-purified and used as template for re-amplification. The *Eco*RI and *Bam*HI recognition sites were introduced at its 5' and 3'ends respectively, and the recognition sequences for histidine 6 residues and factor Xa are added at its 5'end. The amplified DNA was subsequently ligated into pJET1.2/blut cloning vector and transformed into *E.coli* XL1 Blue. The recombinant clones which appeared on the culture plate were randomly screened by PCR, the desired recombinant clones were extracted the plasmid DNA and then analyzed with *Bgl*III restriction enzyme. The desired recombinant plasmid was subsequently characterized by *Eco*RI/*Bam*HI double-digestion and verified the insert DNA sequence by using automated DNA sequencing. The resulting nucleotide sequence was analyzed using Blast Similarity search tool on NCBI database. The recombinant plasmid harboring the correct nucleotide sequence was designated as pJET1.2mBMP-2(His).

3. Results and Discussion

A gene encoding for mature human BMP-2 was isolated from human fetal osteoblast cell line (hFOB). The total RNA was extracted and converted to cDNA by using oligo dT₁₈ primer. A single band at 342 bp was obtained after PCR amplification (Fig.1). In order to facilitate the cloning step, the *Eco*RI and *Bam*HI restriction sites were added at its 5' and 3'ends respectively, whereas the histidine 6 amino acids and factor Xa were fused at N-terminus to facilitate the purification step. The amplified product at 406 bp in length was observed after analysis on

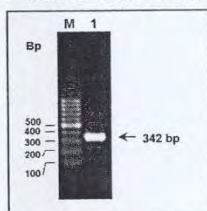


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of human BMP-2 gene from PCR amplification.

1.5% agarose gel electrophoresis. The ligated product into pJET1.2 plasmid vector was transformed into the *E.coli* XL1-Blue. Screening of recombinant clones showed that the recombinant clones containing the insert DNA fragment at approximately 406 bp, presumably to harbor human BMP-2 gene.

After restriction analysis with *Bgl*III and the restriction analysis with *Eco*RI/*Bam*HI, the results revealed that the recombinant plasmid harboring the

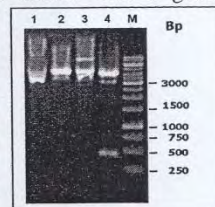


Fig.2. Agarose gel pattern of pJET1.2mBMP-2(His) characterization with restriction digestion.

DNA sequence (Fig.2). Nucleotide sequence analysis of the recombinant

plasmid was the perfect match (100%) for the mature human BMP-2 gene, confirming that the recombinant clone contained the gene encoding the human BMP-2.

4. Conclusions and Recommendations

We succeeded to isolate and construct the recombinant plasmid harboring the human BMP-2 gene. This human BMP-2 gene will be as the crucial source for construction of the recombinant human BMP-2, which can be applied for better understanding of its action and therapeutics based on cartilage tissue engineering, adult stem cell therapy, and bone or cartilage diseases in Thailand.

Acknowledgement

This research was supported by TRF-CHE Research Grant for New Scholar, Thailand Research Fund (TRF) and Commission on Higher Education (CHE), Ministry of Education (to W.K.).

References

- [1] R.S. Tuan, G. Boland, R. Tuli. Arthritis. Res. Ther. 5 (2003) 32.
- [2] Y.T. Xiao, L.X. Xiang, J.Z. Shao. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362 (2007) 550.

Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2) in *Escherichia coli*

Kasekarn, W.^{*}, Chokepaichitkool, T., Kongtawelert, P.

*Thailand Excellence Center for Tissue Engineering and Stem Cells, Department of Biochemistry,
Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*

Abstract

Bone morphogenetic proteins-2 (BMP-2) is a crucial growth factor for chondrogenic and osteogenic differentiation and regeneration. The aim of the present study is the cloning, expression, and characterization of the recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). A hBMP-2 gene was isolated from osteoblast 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 *EcoR* I, 6xHistidine tag and factor Xa were introduced at 5' end, whereas *BamH* I was incorporated at its 3' end. The amplified product was ligated into the plasmid vector and sub-cloning into the expression 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. Recombinant hBMP-2 protein was successfully expressed as the soluble protein under the control of the *lacUV5* and protein A promoters by IPTG induction. Analysis of purified protein by immunodetection and N-terminal amino acid sequencing confirmed that it was the recombinant human BMP-2. The availability of purified rhBMP-2 could be used as therapeutic agent for bone, dental and cartilage tissue repair.

Keywords: bone morphogenetic protein-2, growth factor, transforming growth factor-beta, recombinant protein, stem cells, cartilage tissue engineering

^{*}Corresponding author.

Tel.: 0-5394-5322-3 ext. 225; Fax: 0-5389-4031

E-mail: kasekarn@chiangmai.ac.th