

جهش زایی هدایت یافته مکانی به منظور تولید پروتئین جهش یافته Iranian rice- NSLTP2 (Oriza sativa) حاوی جهش Y45W

اعظم احمدی^۱، مهران میراولیائی^{۱*}، مجید متولی باشی^۱، عبدالرحیم صادقی^۲، حمید ابطحی^۲ و زهرا اسلامی راد^۲

^۱ اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش سلولی و مولکولی

^۲ اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲

چکیده

NSLTP (nonspecific lipid transfer protein) ها پروتئینهای گیاهی هستند که بر اساس وزن مولکولی به دو گروه nsLTP1 و nsLTP2 تقسیم بندی می شوند. این پروتئینها بسیار مقاومند و علاوه بر پتانسیل حمل داروها می توانند آنها را در برابر اکسیداسیون یا تجزیه شدن محافظت کنند. nsLTP2 برنج پروتئینی است که به دلیل توانایی ذاتی عبور از غشاء و اتصال به ترکیبات استروئیدی (از جمله برخی ترکیبات دارویی) پتانسیل استفاده در سیستمهای تحویل دارو را دارد. در این تحقیق با هدف افزایش خاصیت فلورسانس در ژن *Iranian rice nsLTP2* (Oriza sativa)، جهشهای هدایت یافته مکانی ایجاد گردید. برای ایجاد جهش از تکنیک SOE-PCR (splicing by overlap extension-polymerase chain reaction) در تبدیل اسیدآمینه تیروزین ۴۵ به تریپتوفان (Y45W) ژن nsLTP2 استفاده شد. مطالعات انجام شده بر روی سایر گونه های این پروتئین حاکی از افزایش خاصیت فلورسانس در اثر ایجاد این نوع جهش است. در مرحله بعد با تکثیر قطعات جهش یافته و تأیید جهش ایجاد شده توسط توالی یابی، محصول جهش یافته در وکتور pET32-a کلون و پس از بیان در سویه بیانی *BL21(DE3)pLYSs*، پروتئین تغییر یافته حاوی His-tag، تخلیص و وجود پروتئین با استفاده از وسترن بلات تأیید گردید. امید می رود از این پروتئین بتوان به عنوان یک انتقال دهنده دارویی به خصوص داروهای درمان سرطان استفاده شود.

واژه های کلیدی: nsLTP2 جهش زایی، SOE-PCR، سیستم تحویل دارویی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۲۴۷۵، پست الکترونیکی: m.miroliaei@sci.ui.ac.ir

مقدمه

مولکول LTP2 برنج متشکل از ۹۶ اسیدآمینه است که از این تعداد ۲۷ اسید آمینه مربوط به سیگنال پپتیدی است که در انتهای آمین (N) آن قرار گرفته است (۳). همانند سایر مولکولهای LTP، چهار باند دی سولفیدی برای تثبیت ساختار پروتئین ضروری می باشد (۱۸). عملکرد این پروتئین مداخله در فرآیندهای فیزیولوژی گیاه شامل بیوستز لایه کوتین، پیام رسانی دفاعی (۲)، مدیریت در شرایط استرس (۸) و تنظیم بتااکسیداسیون اسیدهای چرب در گلی اکسیزوم است. به علاوه، این پروتئین دارای

LTP ها پروتئینهای گیاهی مسئول انتقال فسفولیپیدها و سایر اسیدهای چرب بین غشاهای سلول هستند (۲۲ و ۱۷) که براساس وزن مولکولی به دو گروه ۱ و ۲ طبقه بندی می شوند. اسکلت پلی پپتیدی آنها شامل ۴ مارپیچ است که توسط لویپهای منعطف به هم متصل هستند. پایداری این پروتئینهای قلبیایی کوچک حاصل ۴ پیوند دی سولفیدی است که سبب استحکام ساختار می شوند (۱۴). سیستمین - های تشکیل دهنده این پیوندهای دی سولفیدی در همه گونه های گیاهی حفاظت شده هستند (۱۹).

های اسیدآمینو کلیدی در فعالیت زیستی آن را تغییر داده است.

جهش زایی آزمایشگاهی (*In vitro mutagenesis*) تکنیکی ارزشمند جهت مطالعه ساختار و عملکرد اسیدهای نوکلئیک و پروتئینها است. سه روش ایجاد جهش زایی هدایت یافته مکانی (SDM) وجود دارد که در روشهای جهش زایی به کمک PCR از پرایمرهای حاوی جهش برای سنتز توالی مورد نظر استفاده می‌شود. در برخی از تحقیقات با استفاده از ایجاد جهشهای نقطه ای در این پروتئین تغییراتی داده اند (۱۵و۴). در این مطالعه با استفاده از تکنیک SDM یا SOE-PCR (Splicing by Overlap Extention-PCR) جهش Y45W در LTP2 گیاه برنج (*Oryza sativa*) انجام شده است.

مواد و روشها

بررسیهای بیوانفورماتیک: ساختار سه بعدی پروتئین rice ns-LTP2 قبل و بعد از اعمال جهش با کمک نرم افزار molegro virtual docker (MVD)، نسخه Trial، بررسی گردید.

ایجاد جهش Y45W با استفاده از تکنیک SOE-PCR: پرایمرهای جهش زای r1 (5'-CGTAGCGCCCCAGCGCGGGTCCTTG-3' و (5'-CAAGGACCCGCGCTGGGGGCGCTACG-3') به منظور ایجاد جهش و دو پرایمر F-ltp (5'-CTGGGTACCGACGACGACACAAGGCCGGT (TGCAACGC-3' و R-ltp (5'-TAACTCGAGGTGGCAGGTGGGGAGGGC-3') به منظور کلون قطعات جهش یافته در وکتور pET32-a طراحی شدند. در انتهای 5' پرایمر F-ltp جایگاه برش آنزیم *KpnI* و جایگاه برش انتروکیناز و سپس توالی ژن *ltp* از نوکلئوتید ۷۹ تا کدون پایان قرار گرفت و در انتهای 5' پرایمر R-ltp جایگاه برش آنزیم *XhoI* قرار داده شد. به

یکسری خواص منحصر به فرد از جمله ایجاد آلرژنی (۲۴و۱۰)، خواص ضد حشره‌ای، ضد قارچی، مقاومت در برابر گرما و مواد دنا توره کننده، پایداری در برابر برخی از پروتازها (۱۳) و توانایی اتصال و انتقال یکسری ترکیبات خاص (۷و۴) می باشد.



mmrklavlvlavamvaacgggvvgvagagnagqltvetgaiagg arptaaccesslraqqgcfqfakdptrygrvynspnarkavssegalptc h

شکل ۱- نمایشی از ساختار LTP2 در سایت PDB (1L6H) و

توالی ۹۶ اسیدآمینو ای آن

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia>)

([/commons/1/1a/PDB_1L6H_EBI.jpg](http://commons/1/1a/PDB_1L6H_EBI.jpg))

توانایی اتصال و انتقال ترکیبات از طریق حفره هیدروفوبیکی که قادر به پذیرش زنجیر آسپل است اعمال می‌شود. این پروتئین به دلیل توانایی اتصال به طیف وسیعی از مولکولهای لیپیدی، پتانسیل استفاده در سیستم تحویل دارو را دارد (۲۵و۱۶).

امروزه اکثر سیستمهای تحویل دارو به دنبال افزایش کارایی از طریق حفاظت ترکیبات دارویی در برابر شرایط محیطی و تجزیه شدن هستند. حاملین دارویی نه تنها باید با کارایی بالا به دارو متصل شوند بلکه به منظور کاهش اثرات سمی دارو بر سلولها، باید دارو را در نزدیکی سلولهای هدف آزاد کنند. بر این اساس به منظور افزایش توانمندیهای این پروتئین در سیستمهای تحویل دارو لازم است در ساختار آن تغییراتی صورت پذیرد. پروژه حاضر به منظور ارتقای برخی توانمندی های زیستی این پروتئین با استفاده از تکنیک جهش زایی هدایت شده برخی ریشه

بر روی کلنیهای تولید شده در مرحله قبل، کلنی PCR انجام شد.

بیان پروتئینهای نوترکیب در باکتریهای ترانسفورم شده:
کلنیهای ترانسفورم شده نوترکیب به سلولهای مستعد pLYSs پس از کشت شبانه روزی در محیط LB برات حاوی آمپی سیلین (100µg/ml) و کلرامفنیکل (0.34µl/ml) در محیط القا کشت داده شدند. رسوبهای حاصل پس از القاء توسط IPTG بر روی ژل ۱۲ درصد SDS PAGE لود گردیدند.

تخلیص پروتئین از سلولهای بیان‌کننده پروتئین جهش یافته و وسترن بلائینگ: سلولهای بیان‌کننده پروتئینهای جهش یافته حاصل از مرحله قبل، پس از سانتریفیوژ و جداسازی رسوب توسط ستون Ni (Ni-NTA, Qiagen) تخلیص و وجود آنها با وسترن بلات توسط آنتی بادی کونژوگه علیه His-Taq (Qiagen) تأیید گردید. در تکنیک وسترن بلائینگ انجام شده در این مطالعه تنها یک نوع آنتی بادی (آنتی بادی کونژوگه با His-Taq) مورد استفاده قرار گرفت. نکته مهم در استفاده از این آنتی بادی اینکه برای رقیق نمودن آن به جای استفاده از بافر بلوکه کننده، از بافر TBS حاوی توئین با نسبت ۱:۱۰۰۰ استفاده گردید.

جدول ۱- مقایسه برخی خصوصیات نوع وحشی و نوع جهش یافته (Y45W) در LTP2 توسط MVD

نوع وحشی	نوع جهش یافته (Y45W)	
36.352	30.696	حجم حفره (A ³)
84.48	78.02	سطح حفره (A ²)
-4.427	-5.784	انرژی اتصال (Kcal/mol)

نتایج

بررسیهای انجام گرفته با نرم افزار MVD حاکی از عدم تغییر در ساختار rice-ns LTP2 قبل و بعد از اعمال جهش بود. جدول ۱ حاوی برخی از پارامترهای بررسی شده توسط این نرم افزار است.

گونه ای که پس از تکثیر، این دو جایگاه آنزیمی *XhoI* و *KpnI* در دو طرف ژن جهش یافته قرار گیرند.

تکنیک SOE-PCR توسط سه نوع واکنش مجزا با دمای اتصال ۵۹,۳ درجه سانتی گراد به نحوی انجام گردید که در واکنش اول و دوم پرایمرهای F, R و fl به ترتیب قطعات 169 bp و 99 bp را تولید کردند. سپس این قطعات به عنوان الگو برای تشکیل قطعه ای 243 bp با پرایمرهای F, R استفاده شدند.

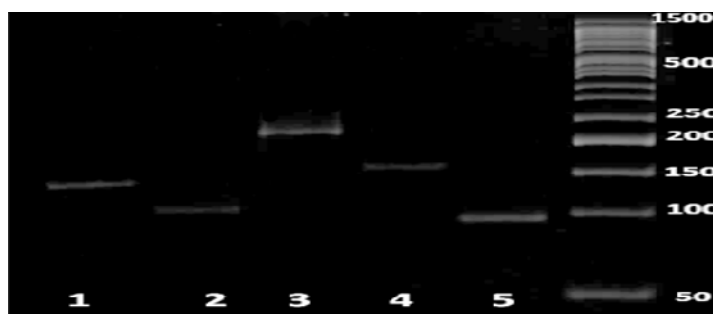
با توجه به اینکه پرایمر F-ltp نسبت به R-ltp اندازه بزرگتری دارد برای جلوگیری از تکثیر ساختارهای ثانویه از موادی مثل DMSO و بتائین استفاده شد. اندازه قطعه نهایی حاصل از تکثیر توسط این دو پرایمر 243bp است.

توالی‌یابی: به منظور تأیید ایجاد جهش محصولات PCR برای توالی‌یابی با دستگاه Applied Biosystem با واسطه شرکت سیناکلون به شرکت Source BioScience انگلستان فرستاده شد.

کلنیگ محصولات حاوی جهش درون وکتور pET-32a: هضم آنزیمی و الحاق: به منظور قرار دادن قطعات حاوی جهش در وکتور pET-32a ابتدا محصولات PCR و وکتور تحت اثر برش با آنزیمهای محدودکننده *xhoI* و *kpnI* قرار گرفتند. پس از ایجاد انتهای چسبیده در قطعه و وکتور برش خورده، وکتور و قطعه insert با نسبت مولی ۱ به ۳ با کمک آنزیم T4 (فرمتاز) به هم متصل شدند.

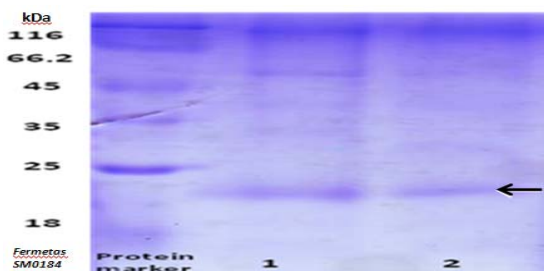
ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب به داخل باکتری *E. coli* (سویه pLYSs): محلول ligation حاصل از مرحله قبل با روش ایجاد شوک حرارتی به سلولهای مستعد pLYSs منتقل و سپس باکتری‌ها روی پلیت LB حاوی کلرامفنیکل (0.34µl/ml)، به مدت یک شبانه روز انکوبه شدند. به منظور تأیید صحت انجام ترانسفورماسیون

اندازه قطعات حاصل از تکثیر پرایمرهای ذکر شده در تکنیک SOE-PCR نشان دهنده صحت پرایمرهای طراحی شده می‌باشد.



شکل ۲- قطعات جهش یافته برای تولید جهش‌های Y45W بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد: ستون‌های ۲ و ۴ به ترتیب قطعات 99bp و 169bp (به ترتیب حاصل از تکثیر پرایمرهای R, F, fI, و tI)، ستون ۳ نشان دهنده قطعه 243bp جهش یافته Y45W حاصل از تکثیر قطعات ستون‌های ۲ و ۴ به عنوان template است. ستون‌های ۱ و ۵ مربوط به تکثیر قطعات با جهش‌های دیگر است.

غیراختصاصی افزایش داشت. در شکل ۴ این پروتئین‌های تخلیص شده توسط پیکان بر روی ژل مشخص شده است.

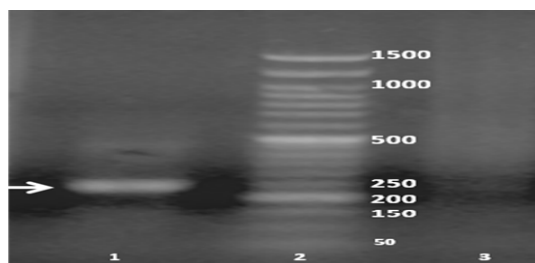


شکل ۴- پروتئین تخلیص شده جهش یافته (ژل SDS PAGE 15%)

در تکنیک وسترن بلات به منظور تأیید پروتئین‌های بیان شده حاوی برجسب 6-His، از آنتی بادی کونژوگه علیه 6-His استفاده شد. باندهای ظاهر شده حاصل از این آزمایش در شکل ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که در ستون ۶ این شکل مشخص شده است باند حدود ۲۵ کیلو دالتون نشان‌دهنده پروتئین تخلیص شده حاوی 6His-taq می‌باشد که توسط ستون نیکل تخلیص شده است و به همین دلیل نسبت به سایر ستونها که مربوط به محلول‌های پروتئینی پس از القا بدون انجام فرآیند تخلیص هستند، غلظت کمتری دارد.

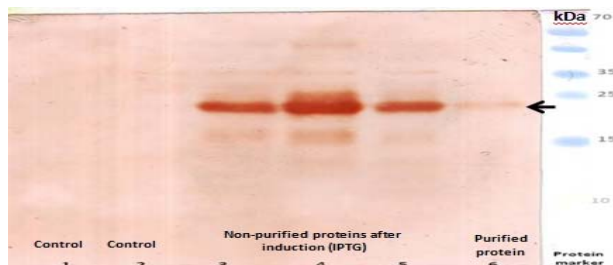
صحت حضور جهش Y45W در ژن LTP2 با تعیین توالی DNA تأیید گردید.

به منظور تأیید صحت انجام ترانسفورماسیون کلنی‌های تولید شده، کلنی PCR انجام شد. محصول ۲۴۳ جفت بازی حاصل از تکثیر کلنی حاوی پلاسمید نو ترکیب، در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- کلنی PCR از کلنی‌های ترسفرم شده روی ژل آگارز 1%: باند مشخص شده با فلش نشان دهنده محصول PCR حاصل از تکثیر کلنی نو ترکیب با پرایمرهای F-Itp و R-Itp می‌باشد.

پس از بیان پروتئین‌های جهش یافته، رسوب سلولی حاصل سانتریفیوژ، لیز و پروتئین مورد نظر توسط ستون Ni تحت شرایط دناتوره کننده تخلیص شد. تحت این شرایط به دلیل در معرض بودن 6-His taq در پروتئین فیوژن بیان شده، اتصال به ماتریکس Ni-NTA بیش تر شده و کارایی فرآیند تخلیص توسط کاهش پتانسیل برای اتصالات



شکل ۵- باندهای پروتئینی ظاهر شده روی کاغذ نیتروسولوز در وسترن بلائینگ: ستون ۱ و ۲ به ترتیب حالت‌های کنترلی قبل از القاء توسط IPTG و حالت بیان فاقد وکتور نوترکیب و ستون‌های ۳، ۴ و ۵ پروتئین‌های بیان شده پس از القاء توسط IPTG (1mM) را نشان می‌دهند. ستون ۶ هم مربوط به پروتئین تخلیص شده است.

بحث

برای ایفای فعالیت پروتئین rice nsLTP2 الزامی است. با توجه به موارد ذکر شده جایگزینی تیروزین با تریپتوفان، حاوی زنجیر جانبی با دو حلقه آروماتیک، به منظور افزایش خاصیت فلورسانس rice-nsLTP2 انتخاب گردید. در مطالعات بیوفورماتیکی پروتئینها از نرم افزارهای مختلفی استفاده می‌شود (۱۱ و ۱۰). داده‌های نرم افزاری مشخص کرد ایجاد جهش Y45W علاوه بر افزایش فلورسانس، تمایل اتصال آن را هم افزایش می‌دهد (جدول ۱) و ردیابی درون سلولی از طریق بررسی خاصیت فلورسانس امکان پذیر خواهد بود (۹).

تکنیک جهش زایی در جایگاه اختصاصی (SDM) تکنیکی ارزشمند جهت تعیین نقش یک ژن یا تغییر فعالیت آن می‌باشد. در مطالعه حاضر به منظور انجام SDM، تکنیک SOE-PCR انجام گرفت و پس از طراحی پرایمرهای جهش‌زا، محصولات PCR اول و دوم، به عنوان الگو برای انجام PCR سوم با پرایمرهای رفت و برگشت اصلی (F و R) استفاده شدند. ژن کدکننده LTP2 برنج فاقد اینترون و غنی از نوکلئوتیدهای G و C است. به دلیل وجود تعداد زیاد این نوکلئوتیدها در توالی نوکلئوتیدی ژن *ltp2* (۲۰) در واکنش PCR برای جلوگیری از ساختارهای ثانویه پرایمرها از مواد شکننده DMSO و بتائین استفاده شد.

پس از ایجاد جهش در ژن *ltp2* توالی جهش یافته حاصل در پلاسمید pET32-a کلون شد. طراحی پرایمرهای R و F به گونه‌ای صورت پذیرفت که توالی جهش یافته حاصل

ویژگیهای ساختاری پروتئین LTP در فعالیت زیستی آن نقش مهمی را ایفاء می‌کند. توانایی اتصال به یکسری ترکیبات خاص و انتقال آنها از طریق حفره هیدروفوبیکی که قادر به پذیرش زنجیر آسیل است اعمال می‌شود (۲۱ و ۲۳). مطالعات گذشته بر روی این مولکول حاکی از حفظ فعالیت بیولوژیکی در شرایط *in vitro* است. در سال ۲۰۰۴ Cheng پتانسیل ساختاری و بیولوژیکی این پروتئین در سیستم تحویل دارویی را عنوان نمود. وی با ایجاد موتاسیون نقطه‌ای فلورسانس پروتئین را افزایش داد (۵). بر اساس مطالعات Cheng (۶) اعمال جهش Y45W علی‌رغم عدم تغییر در ساختار پروتئین، منجر به افزایش خاصیت فلورسانس شد. خاصیت فلورسانس پروتئین پس از اتصال لیگاند تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌دهد. در تحقیق حاضر با هدف افزایش خاصیت فلورسانس، در ژن *rice nsltp2* (*Oriza sativa*) برنج ایرانی جهش‌های هدایت یافته مکانی ایجاد گردید. اسیدآمینه تریپتوفان نسبت به تیروزین محصول کوانتومی خیلی قوی تری دارد. به همین دلیل برای بهبود حساسیت یکی از ریشه‌های تیروزین با اسید آمینه تریپتوفان جایگزین شد (۵). از نظر ساختاری، به دلیل قدرت هیدروفوبیسیته مشابه در تیروزین و تریپتوفان، جایگزینی Y45 با تریپتوفان کونفورماسیون طبیعی پروتئین حفظ می‌شود (۱۲) و جهش یافته Y45W از نظر ساختاری تثبیت می‌گردد. به علاوه وجود ریشه آروماتیک

6-His توسط وسترن بلات و استفاده از آنتی بادی کونژوگه علیه 6-His انجام گرفت.

با ارتقای برخی خصوصیات در پروتئین LTP از جمله افزایش خاصیت فلورسانس (با ایجاد جهش Y45W) می‌توان قابلیت استفاده از آن را افزایش داد و با تکنیک کلینینگ توسط وکتور بیانی پروکاریوتی آن را در مقیاس وسیع تولید کرد. در تحقیقات آتی امید می‌رود پس از برش آنزیمی این پروتئین با انتروکیناز و تعیین ساختارهای سه بعدی با کمک تکنیک‌هایی مثل NMR و RP-HPLC، از آن به عنوان یک حامل دارویی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین مراتب امتنان خود از (INSF) و بخش تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه اصفهان و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل پشتیبانی تجهیزات و امکانات و کلیه همکارانی که در انجام این پژوهش یاری رساندند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

بین دو جایگاه آنزیم برش *XhoI* و *KpnI* موجود در جایگاه MCS این وکتور قرار گیرد. با کمک کلون این ژن در پلاسمید pET32-a در N-terminal domain (NTD) LTP جهش یافته توالی 6-His وارد شده و پروتئین فیوژن حاصل به راحتی توسط ستون نیکل آگارز جداسازی گردید.

به منظور بیان پروتئین‌های نو ترکیب از سیستم‌های متفاوت یوکاریوتیک (۲۶ و ۲۷) و پروکاریوتیک استفاده می‌شود. در این مطالعه سویه باکتریایی BL21pLYSs(DE3) برای بیان انتخاب شد. این سویه جهت بیان وکتورهای مثل pET که تحت کنترل پروموتور T7 هستند، مناسب است. در تحقیق حاضر با وجود سیستم بیانی و تحت کنترل موجود در سویه باکتریایی BL21pLYSs(DE3)، از خاصیت ضد باکتریایی nsLTP2 استفاده گردید. نهایتاً پروتئین بیان شده تولیدی در این سویه که به صورت فیوژن با His-taq است، تحت شرایط دنا توره کننده و به کمک ستون نیکل تخلیص گردید و تأیید نهایی حضور پروتئین جهش یافته متصل به

منابع

1. Abascal, F., Zardoya, R., and Posada, D. 2005. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*. 21, 2104–2105.
2. Bharat, B. 2006. Expression of the lipid transfer protein Ace-AMPI in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses Subhankar Roy Barman Christof Sautter, *Transgenic Res*. 15:435–446
3. Carvalho, A.O. Gomes, V.M. 2007. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology. A concise review. *Peptides*, 28(5pp), 1144-1153.
4. Cheng, C.S., Chen, M.N., Lai, Y.T., Chen, T., Lin, K.F., Liu, Y.J. and Lyu, P.C. 2008. Mutagenesis study of rice nonspecific lipid transfer protein 2 reveals residues that contribute to structure and ligand binding. *Proteins*. 70, 695–706.
5. Cheng, C.S., Chen, M.N., Liu, Y.J., Huang, L.Y., Lin, K.F. and Lyu, P.C. 2004. Evaluation of plant non-specific lipid-transfer proteins for potential application in drug delivery. *Enzyme and Microbial Technology*. 35, 532-539.
6. Cheng, H.C., Cheng, P.T., Peng, P., Lyu, P.C. and Sun, Y.J. 2004. Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*, *Protein Science*. 13:2304–2315.
7. Elmorjani, K. Lurquin, V., Lelion, A., Rogniaux, H. and Marion, D. 2004. A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316, 1202–1209.
8. Gonorazky, A.G., Regente, M.C. and de la Canal, L. 2005. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds., *J Plant Physiol*. 162(6):618-24
9. Guinness, L.P., Yan, Y., Stacey, A., Simpson, D.A., Hall, L.T., Maclaurin, D., Prawer, S., Mulvaney, P., Wrachtrup, J., Caruso, F.,

- Scholten, R.E. and Hollenberg, L. C. L. 2011. Quantum measurement and orientation tracking of fluorescent nanodiamonds inside living cells, *Nature Nanotechnology*. nano. 64
10. Hartz, C., Lauer, I., Del Mar San Miguel Moncin, M., Cistero-Bahima, A., Foetisch, K., Lidholm, J., Vieths, S. and Scheurer, S. 2010. Comparison of IgE-Binding Capacity, Cross-Reactivity and Biological Potency of Allergenic Non-Specific Lipid Transfer Proteins from Peach, Cherry and Hazelnut *Int Arch Allergy Immunol.* 153:335–346
 11. Keith, J.M., 2008. *Methods In Molecular Biology, Bioinformatics, Structure, Function and Applications, Volume II*, Australia, John Walker, Hatfield, Hertfordshire. 39
 12. Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol.* 105-32
 13. Larsen, K.L. and Winther, J.R. 2001. Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *Federation of European Biochemical Societies* 488,145-148.
 14. Liu, Y.J., Samuel, D., Lin, C.H. and Lyu, P.C. 2002. Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 294, 535-540.
 15. Pellerin, V.L., Devaux, C., Ihorai, T., Marion, D., Pahin, V., Joudrier, P. and Gautier, M. 1999. Production in *Escherichia coli* and site-directed mutagenesis of a 9-kDa nonspecific lipid transfer protein from wheat. *Eur. J. Biochem.* 260, 861–868.
 16. Pii, P., Astegno, A., Peroni, E., Zaccardelli, M., Pandolfini, T. And Crimi, M. 2009. The *Medicago truncatula* N5 Gene Encoding a Root-Specific Lipid Transfer Protein Is Required for the Symbiotic Interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *MPMI* 1. 22(12), 1577–1587.
 17. Reece, R.J. 2003. *Analysis of Genes and Genomes*, John Wiley and Sons Ltd, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, chapter 7, P. 285
 18. Samuel, D. Liu, Y.J., Cheng, C.S. and Lyu, P.C. 2002. Solution Structure of Plant Nonspecific Lipid Transfer Protein-2 from Rice (*Oryza sativa*). *The Journal of Biological Chemistry.* 277. 38, 35267–35273.
 19. Salcedo, G., Sanches-Monge, R., Diaz-Perales, G. and Barber, D. 2004. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *J. Clin. Exp. Allergy.* 34: 1336-1341.
 20. Vignolsb, F., Lund, G., Pammi, S., Trkmousaygue, D., Grellet, F.C., Kaderb, J.C., Puigdom, P. and Delseny. M. 1994. Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein (Recombinant DNA; plant; *Oryza sativa*; promoter sequence; gene expression) *Gene*, 142. 1994, 2655270
 21. Wang, S.Y., J.H. Wu, T.B. Ng, X.Y. Ye and P.F. Rao, 2004. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides.* 25: 1235-1242
 22. Yeats, T.H. and Rose, J.C. 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science.* 17, 191–198.
 23. Zachowski, A., Guerbet, F., Grosbois, M., Jolliot-Croquin, A. and Kader, J.C. 1998. Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein, *Eur. J. Biochem.*, FEBS. 257, 4432448
 24. Zoccatelli, G., Pokoj, S., Foetisch, K., Bartra, J., Valero, A. Del Mar San Miguel-Moncin, M., Vieths, S. and Scheurer, S. 2010. Identification and characterization of the major allergen of green bean (*Phaseolus vulgaris*) as a non-specific lipid transfer protein (Pha v 3), *Molecular Immunology* 47. 1561–1568
 25. Zottich, U., Cunha M.D., Carvalho, A.O., Dias, G.B., Silva, C.M., Santos, I., Nascimento, N., Migual, E.C., Macado, O.L. and Gomes, V.M. 2011. Purification, biochemical characterization and antifungal activity of a new lipid transfer protein (LTP) from *Coffea canephora* seeds with α -amylase inhibitor properties. *Biochim Biophys Acta.* 1810(4):375-83.
 26. Nazari, R., Davoudi, N., and Barkhordari, F. 2011. Cloning of new form of human tissue plasminogen activator (K2S) in eukaryotic system. *Iranian journal of biology.* 24 (5): 632-639
 27. Vafa, M., Yakhchali, B., Haghazari, A., Karkhane, A.A., Rastgar-jazi, F., and Ahmadi Danesh, H. 2011. Cloning and secretive expression of *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 lipase in *Pichia pastoris* Using natural and yeast α factor signal sequences. *Iranian journal of biology.* 24 (5): 640-647

Site directed mutagenesis to produce mutant Iranian rice- NSLTP2 (*Oriza sativa*) protein that contains Y45Wmutation

Azam Ahmadi¹, Mehran Miroliaei^{1*}, Majid Motvali Bashi¹, Abdorahim Sadeghi², Hamid Abtahi², Zahra Eslami Rad²

¹ Biochemistry and Molecular Biology Division, Biology Dept., University of Isfahan, I.R. of Iran

² Center of Molecular Medicine Research, Faculty of Medicine, Medical University of Irak, Arak, I.R. of Iran

Abstract

NsLTPs (nonspecific lipid transfer proteins) are plant proteins subdivided into nsLTP1(9kDa) and nsLTP2 (7kDa) according to the molecular weight. These highly stable proteins can protect drugs against oxidation or degradations. Rice nsLTP2 due to the inherent ability to cross biological membranes and bind to steroid compounds (including some pharmaceutical compounds) have potential application for use in drug delivery systems. To enhance the biological capability of this protein in this system, structural alterations are indispensable. These alterations can be created by desired mutations in the encoding genes. Analysis by different software showed that the hydrophobic cavity of the active site plays a prominent role. After designing of mutagenic primers (Tyrosine 45 to Tryptophan (Y45W)) the method of SOE-PCR was used to perform site directed mutagenesis in the gene of rice nsLTP2. Wild type nsLTP2 was cloned into the PGEX6p2 vector. This wild type plasmid was used as a template for constructing the mutant fragment and designed mutant primers are used for amplification of mutant fragments. Mutant rice nsLTP2 are expressed in the pET32a vector in to the Ecoli BL21 (DE3) strain. After the amplification of the mutant fragments and confirmation of mutations generated by sequencing, the mutant constructs cloned into the pET32a vector and the fusion mutant protein with a His-tag was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The purpose was to create mutations with increased florescence signals. We hope that, in the future, these findings would be helpful in creating biosensors or as drug carrier vehicles.

Key words: nsLTP2, mutagenesis, SOE-PCR, Drug Delivery System