

خالص‌سازی و محلول‌سازی همزمان جسم‌توده‌ای MO-CBP2 با استفاده از شیب‌اوره

فاطمه ولایتی پور^۱، سعید امین زاده^{۱*}، سید عبدالحمید انگجی^۲، فاطمه فتوحی^۱ و مرضیه قلاسی^۲

^۱ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده‌ی صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست‌فرایند

^۲ ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده‌ی علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

امروزه بیان هترولوگ پروتئین‌ها نقشی کلیدی در بیوتکنولوژی و صنعت دارد. تشکیل اجسام توده‌ای در بیان هترولوگ پروتئین‌ها، به خصوص بیان پروتئین‌های یوکاریوتی در میزبان‌های پروکاریوت که معروف‌ترین آن‌ها *E. coli* است؛ یکی از پردردسرتین چالش‌ها برای محققان می‌باشد. تشکیل جسم توده‌ای اغلب بدلیل بیان بالا، پیوندهای دی‌سولفیدی، بار و یا کانفورماسیون خاص پروتئین است. اجسام توده‌ای برخی پروتئین‌ها دارای فعالیت‌اند اما بسیاری نیز باید محلول و مجدداً سرشته شوند تا فعالیت خود را بدست آورند. روش‌های سرشته کردن مجدد پروتئین اغلب نه تنها روش‌های چند مرحله‌ای و زمان‌برند بلکه بازدهی کمی نیز دارند. در این مطالعه، برای اولین بار پروتئین MO-CBP2 از گیاه گرمسیری مورینگا اولیفرا به صورت هترولوگ بیان شد اما در باکتری *E. coli* تشکیل جسم توده‌ای داد. روش‌های مختلفی برای جلوگیری از تشکیل جسم توده‌ای و یا سرشته کردن این پروتئین به کار گرفته شد که یکی از کارآمدترین آن‌ها استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل سفارز به‌مراه شیب‌غلظت اوره ۸-۰ مولار بود که با بازدهی زیاد، موجب خالص‌سازی و سرشته شدن مجدد همزمان این پروتئین در مراحل کمتر شد. این روش که در آن می‌توان پروتئین مورد نظر را تا حدود زیادی خالص و محلول کرد می‌تواند بعنوان روشی مناسب و کارآمد پیشنهاد شود. [۲] [۱] [۳]

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز ژل گرایانت پلی آکریل آمید- سدیم دو دسیل سولفات، پروتئین متصل شونده به کیتین^۲ از مورینگا اولیفرا، جسم توده‌ای، سرشته کردن پروتئین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۲، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

اجسام توده‌ای نه تنها در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، بلکه در بیان بیش از حد همولوگ و هترولوگ نیز ایجاد می‌شوند. تجمع پروتئین‌ها به این شکل، برای مطالعات آزمایشگاهی چالش‌ساز است و در مقیاس بزرگتر می‌تواند مشکلات اقتصادی و فنی عمده‌ای در صنایع بیوتکنولوژی و داروسازی ایجاد کند. محیط‌های سیروزول باکتریایی، فقدان چپرون‌های یوکاریوتی و تغییرات پس از ترجمه، از عوامل ایجاد اجسام توده‌ای در پروکاریوت‌ها هستند. استراتژی مرسوم برای تخلیص پروتئین از اجسام توده‌ای شامل چهار مرحله‌ی کلیدی می‌باشد: جداسازی اجسام

توده‌ای، محلول‌سازی، سرشته کردن مجدد (refolding)، و خالص‌سازی پروتئین سرشته شده از طریق روش‌های کروماتوگرافی. میزان بازدهی روش‌های سرشته کردن مجدد به نوع پروتئین و جسم توده‌ای شکل گرفته بستگی دارد [۱۸] و [۹].

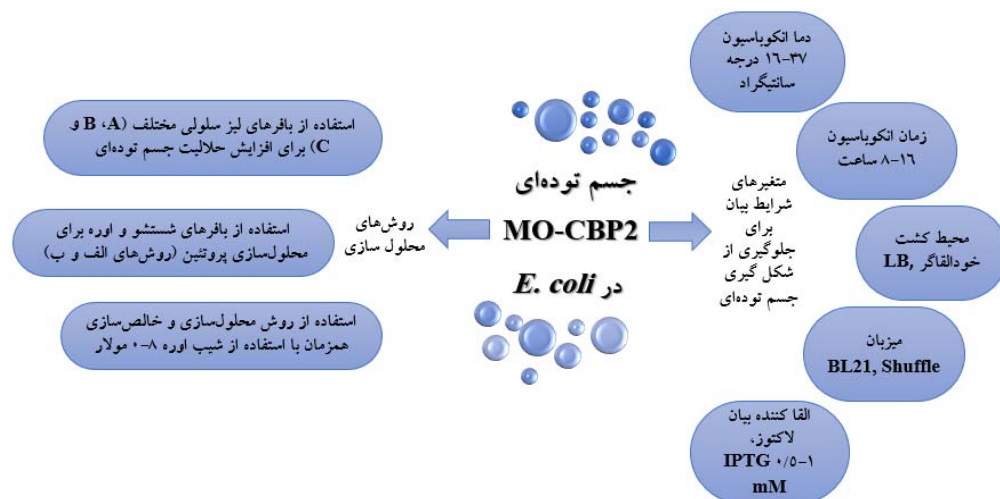
مورینگا اولیفرا یک دیپلوئید حقیقی با سایز ژنومی ۱/۲ پیکوگرم [۱۵] و $2n = 28$ می‌باشد [۱۳]. مورینگا مغذی‌ترین گیاه کشف شده است و بهره‌گیری از آن در نواحی در حال توسعه و مناطقی که از سوء تغذیه رنج

عمومی سلول به حضور پروتئین واسرشته در سلول است و به عنوان راهی برای کنترل تجمع آن‌ها می‌باشد. نشان داده شده است که سرعت رشد *E. coli* به وضعیت کانفورماسیون پروتئین‌ها حساس است و پپتیدهای با ساختار سه بعدی نادرست و توده‌های محلول برای آن سمی هستند. اجسام توده‌ای می‌توانند یک منبع تقریباً خالص از پروتئین نوترکیب باشند [۱۶]. در مطالعات بسیاری، روش‌های مختلفی از قبیل بررسی دما، شیک، غلظت IPTG، محیط کشت و... بمنظور دستیابی به بیان بهینه و محلول پروتئین بررسی شدند [۲] و [۱].

لازمه‌ی مطالعه‌ی خصوصیات زیستی و بیوشیمیایی یک پروتئین، دسترسی به ساختار سرشته شده و خالص آن می‌باشد. در این مطالعه به منظور دستیابی به پروتئین هترولوگ MO-CBP2 محلول و خالص شده، روش‌های متفاوتی به کار گرفته شدند که شامل بررسی متغیرهای شرایط بیان پروتئین و همچنین محلول‌سازی جسم توده‌ای آن بودند (شکل ۱).

می‌برند مناسب است [۵]. نتو و همکارانش در سال ۲۰۱۷ پروتئین MO-CBP2 را از دانه‌های مورینگا اولیفرا جداسازی کرده و خواص ضد قارچی آن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی‌ها پیشنهاد می‌کند که MO-CBP2 وزنی حدود ۱۲ کیلودالتون داشته و در فرم‌های اولیگومری متفاوتی وجود دارد. علاوه بر آن MO-CBP2 یک گلیکوپروتئین با pI برابر با ۱۰/۹ و دارای ۴/۱٪ قند می‌باشد که به صورت کووالانت به آن متصل است. درتوالی این پروتئین چهار سیستئین وجود دارد که احتمالاً با هم پیوند دی‌سولفیدی می‌دهند. گلوتامین فراوان‌ترین آمینو اسید است (۳۱٪) که می‌تواند به تشکیل فرم دایمر MO-CBP2 مربوط باشد. گلوتامین موجود در N-ترمینال حلقوی (cyclization) شده و پیروگلوتامات تشکیل می‌دهد که موجب بلاک شدن زنجیره می‌شود [۱۴] و [۱۰].

بیان هترولوگ پروتئین MO-CBP2 به منظور مطالعه و بررسی بیشتر آن، منجر به تشکیل جسم توده‌ای در *E. coli* شد. تشکیل جسم توده‌ای در باکتری بخشی از پاسخ



شکل ۱- بررسی روش‌های انجام شده در این مطالعه به منظور جلوگیری از تشکیل جسم توده‌ای و روش‌های محلول‌سازی آن.

مواد و روشها

EDTA، Tris، اوره، Na_2HPO_4 ، KH_2PO_4 ، برموفنل بلو، گلیسرول، بتامرکاپتواتانول، گلوکز، لاکتوز که همگی از برند مرک استفاده شدند. عصاره‌ی مخمر (IBRESCO)، IPTG (سیگما)، کانامایسین (سیگما)، سایر موارد از

مواد و دستگاه‌های مورد استفاده: Tris-HCl، Trisbase، Imidazole، NaCl ، NaH_2PO_4 ، تریپتون، Triton X-100،

سونیکیت از رسوب، از هر مرحله یک نمونه روی ژل گرادینانت ۴-۲۴٪ SDS-PAGE بارگیری شده و سپس جریان الکتریکی برقرار شد. نحوه‌ی ساخت ژل مطابق آنچه توسط مصطفایی ذکر شده صورت گرفت [۳].

محیط کشت خود القاگر (Autoinduction): مواد مورد استفاده در این محیط بافر فسفات (۷/۲ pH)، تریپتون، عصاره‌ی مخمر، NaCl، گلیسرول، گلوکز ۱۰٪ و لاکتوز ۸٪ است [۱۲].

بررسی اثر بافرهای لیز کننده سلول بر میزان حلالیت اجسام توده‌ای: وجود دترجنت‌ها در بافر لیز سلولی موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها می‌شود بنابراین برای سونیکیت از بافرهایی استفاده شد که حاوی Triton X-100 و SDS باشند. بتامرکاپتواتانول نیز احیا کننده است و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی را کاهش داده و پروتئین را دناتوره می‌کنند. DTT، DTE نیز احیا کننده‌اند اما بدلیل تمایل اتصال زیاد آن‌ها به فلز (مانند نیکل موجود در ستون تخلیص) اگر از آن‌ها در بافر لیز استفاده شود برای عبور از ستون باید تعویض بافر صورت گرفته و این مواد حذف شوند. افزودن گلیسرول به بافرهای تخلیص افزایش پایداری و جلوگیری از تجمع پروتئین‌ها می‌شود [۶] و [۲۱]. تعدادی از بافرهای لیز استفاده شده در جدول ۱ ذکر شدند:

شرکت سیگما تهیه شدند. دستگاه Ultrasound Hielscher UP400s، دستگاه Bio-RAD ECONO GRADIENT PUMP، دستگاه میکروپلیت ریدر (Labsystem multiskan MS VSS). تانک الکتروفورز عمودی (مدل STS-A 1100 پایا پژوهش پارس)، هود میکروبی (مدل II102 سرو تجهیز سکو)، مولد جریان الکتریکی (مدل TECHNE ESP600Z)، انکوباتور شیکر دار (مدل 3031 (GFL

سویه‌های میکروبی: *E. coli* BL21 (شماره کاتالوگ ۶۹۴۵۰، Novagen)، *E. coli* Shuffle (شماره کاتالوگ ۳۰۲۹، NEB)

حامل: pET-26 b(+)(شرکت Biomatik)

بیان و خالص سازی: پروتئین MO-CBP2 از دانه‌ی گیاه مورینگا اولیفرا برای اولین بار در *E. coli* سویه BI21(DE3) بصورت هترولوگ بیان شد. بیان پروتئین با القا ۱ mM IPTG در ۵۰ ml محیط کشت LB حاوی ۵۰ μg/ml ۵۰ کانامایسین، انکوباسیون ۸ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از نمونه‌گیری، باقی محیط کشت حاوی باکتری در فالكون ۵۰ ml ریخته شد و ۲۰ دقیقه در ۷۵۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی از رسوب جدا شد. رسوب در ۳ ml بافر اتصال (۵۰ mM NaH₂PO₄، ۵۰۰ mM NaCl، ۱۰ mM Imidazol) حل و سونیکیت شد. پس از سونیکیشن سلول‌ها و جداسازی سوپ

جدول ۱- بافرهای لیز سلولی استفاده شده بمنظور افزایش انحلال‌پذیری جسم‌توده‌ای

منبع	محتویات	بافر لیز سلولی
[۸]	Tween20 ۲۵ μl و Imidazol ۱۰ mM، NaCl ۳۰۰ mM، NaH ₂ PO ₄ ۵۰ mM (pH = ۸)	بافر A
[۱۱]	Triton X- ۰/۵٪، بتامرکاپتواتانول و ۰/۵٪، Imidazol ۲۰ mM، NaCl ۵۰۰ mM، NaH ₂ PO ₄ ۵۰ mM و 100 و ۱۰٪ گلیسرول (pH = ۸)	بافر B
[۱۱]	Imidazol ۱۰ mM، KH ₂ PO ₄ ۱/۸ mM و Na ₂ HPO ₄ ۱۰ mM، KCl ۲/۷ mM، NaCl ۱۴۰ mM و ۱۰٪ گلیسرول (pH = ۷/۳)	بافر C

روش‌های سرشته کردن مجدد پروتئین: روش الف)
 استفاده از بافر شستشوی حاوی ۵۰ mM Tris HCl (pH = ۷/۵) به همراه ۲۰۰ mM NaCl و بافر استخراج حاوی ۵۰ mM Tris HCl (pH = ۷/۵) و اوره ۸M بود. در این روش رسوب حاصل از سونیکیت در بافر شستشوی حاوی ۱٪ Triton X-100 و اوره ۱ M حل می‌شود. پس از دوبار سانتریفیوژ و حذف مایع رویی، رسوب در بافر شستشو حل شده و مجدد سانتریفیوژ می‌شود. سپس رسوب در بافر استخراج حل شده و یک ساعت در دمای اتاق می‌ماند. حال به محلول ۱۰ برابر حجم خود بافر استخراج افزوده و با استفاده از بافر شستشو ۱۶ ساعت دیالیز صورت می‌گیرد [۱۹].

روش ب) برای خالص‌سازی جسم توده‌ای، رسوب سونیکیت را در ۵۰ mM Tris-HCl، ۱۵۰ mM NaCl، ۱٪ Triton X-100 در pH = ۸ بطور کامل حل شد. این محلول مجدد سونیکیت شده و ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g سانتریفیوژ شد. این فرایند یک بار دیگر تکرار شد سپس رسوب با آب مقطر شستشو داده شد. رسوب شستشو داده شده مشابه با روش الف، در بافر Tris HCl حاوی اوره ۸M حل شده و پس از یک ساعت، دیالیز صورت می‌گیرد [۱۹].

روش خالص‌سازی و محلول‌سازی به صورت همزمان
 با استفاده از شیب اوره: یکی از روش‌های بازبایی و

محلول‌سازی پروتئین که تا حدود زیادی پروتئین را مجدداً سرشته و خالص می‌کند روشی است که توسط شی و همکارانش گزارش شده است [۱۷]. در این روش جسم توده‌ای به رزین تخلیص پروتئین (نیکل سفارز) متصل شده و همزمان با خالص‌سازی پروتئین با ایجاد شیب اوره، سرشته‌سازی مجدد نیز صورت می‌گیرد. رزین نیکل سفارز ابتدا با بافر اتصال حاوی ۸ M اوره شستشو داده شده و متعادل شد. جسم توده‌ای خالص شده در بافر اتصال حاوی ۸ M اوره حل و مستقیم و به آرامی روی ستون ریخته شد. ستون با ۵ برابر حجم ستون بافر اتصال حاوی ۸ M اوره و پس از آن با ۵ برابر حجم ستون بافر شستشو حاوی ۸ M اوره شستشو داده شد. افزایش غلظت ایمیدازول در بافر شستشو موجب حذف اتصالات غیر اختصاصی به رزین نیکل می‌شود. در این مرحله با ۸۰ برابر حجم ستون بافر اتصال، شیب اوره از ۸ تا ۰ مولار (ایجاد شده توسط GRADIENT PUMP) از روی ستون عبور داده شد. با برقراری شیب اوره، پروتئین MO-CBP2 متصل به ستون مجدداً سرشته می‌شود. در نهایت ستون با ۳ برابر حجم ستون بافر اتصال فاقد واسرشته‌کننده شستشو داده شد سپس با ۳ برابر حجم ستون بافر خارج‌کننده، پروتئین MO-CBP2 سرشته شده از ستون خارج شد. برای حذف ایمیدازول با استفاده از ۲۰ mM Tris HCl حاوی ۵۰ mM NaCl دیالیز صورت گرفت.

جدول ۲- بافرهای تخلیص پروتئین در روش محلول و خالص‌سازی همزمان پروتئین.

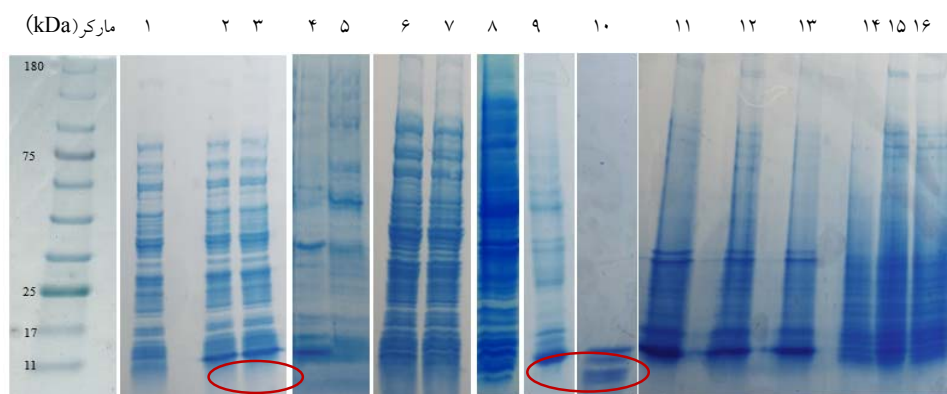
بافر اتصال (pH = ۷/۸)			بافر شستشو (pH = ۷/۸)		بافر خارج‌کننده (pH = ۷/۸)	
بافر اتصال (pH = ۷/۸)			بافر شستشو (pH = ۷/۸)		بافر خارج‌کننده (pH = ۷/۸)	
بافر اتصال (pH = ۷/۸)			بافر شستشو (pH = ۷/۸)		بافر خارج‌کننده (pH = ۷/۸)	
بافر اتصال (pH = ۷/۸)			بافر شستشو (pH = ۷/۸)		بافر خارج‌کننده (pH = ۷/۸)	
۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM
۰/۵ M	۰/۵ M	۰/۵ M	۰/۵ M	۰/۵ M	۰/۵ M	۰/۵ M
۰/۳ M	۲۰ mM	۵ mM	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM

نتایج و بحث
 بیان پروتئین و اثر متغیرهای شرایط بیان برای جلوگیری از تشکیل جسم توده‌ای: بیان پروتئین MO-CBP2 در BL21 پس از ۸ ساعت، ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۵۰ ml محیط کشت LB بررسی شد. سوپ و رسوب حاصل از

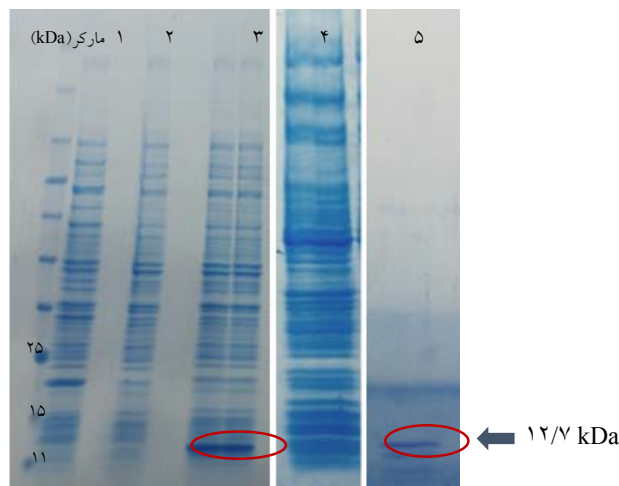
پروتئین بصورت جسم توده‌ای در رسوب سونیکیت باقی ماند (شکل ۲). سویه‌ی باکتریایی تغییر داده شد و سویه‌ی Shuffle ترانسفورم شد. در Shuffle نیز این مشکل وجود داشت و جسم توده‌ای تشکیل شد (شکل ۳ و ۲). بنابراین به دلیل بیان کمتر در Shuffle و عدم حلالیت پروتئین در آن، بیان در سویه‌ی BL21 انتخاب بهتری بود.

بررسی بازده و کارایی بافرهای لیز سلولی و روش‌های رناتوراسیون: همانطور که مشاهده می‌شود تغییر در مواد مورد استفاده در بافرهای لیزکننده اثر چندانی بر محلول شدن پروتئین ندارند (شکل ۲). چندین روش برای سرشته کردن مجدد جسم توده‌ای بکار گرفته شد از جمله روش‌های الف و ب، که اغلب بازده کمی داشتند، تنها درصد اندکی از پروتئین مجدداً سرشته شده و مقدار زیادی از پروتئین از دست می‌رفت. با استفاده از روش خالص‌سازی و محلول‌سازی همزمان پروتئین، MO-CBP2 مجدداً سرشته و به میزان زیادی خالص شد (شکل ۴).

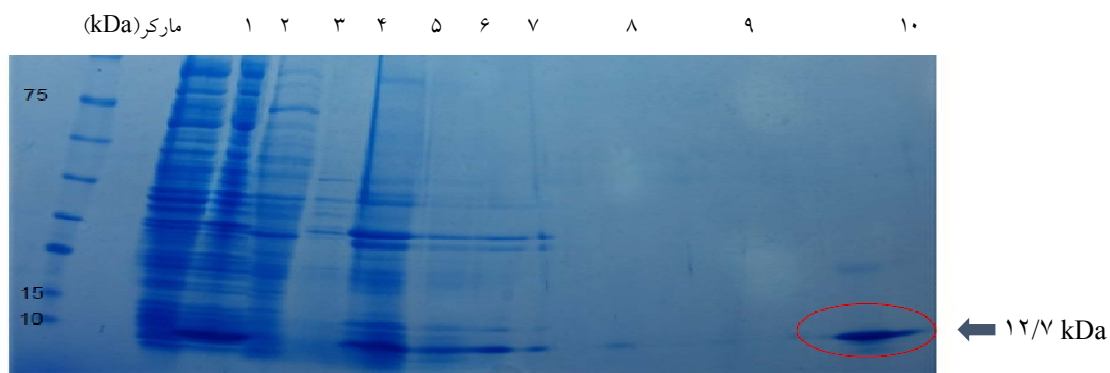
سونیکیت سلول‌ها بر روی ژل گرادایانت SDS-PAGE مشاهده شدند (شکل ۲). چنانچه در ژل مشاهده می‌شود پروتئین نوترکیب در رسوب سونیکیت قرار دارد و مقدار کمی از آن محلول است. بیان پروتئین در دمای پایین (۱۶- ۲۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۶ ساعت موجب افزایش بیان چپرون‌ها شده و در نتیجه پایداری پروتئین هترولوگ را افزایش می‌دهد [۷]. کاهش دما از سوی دیگر موجب کاهش بیان پروتئین نسبت به شرایط ۸ ساعت، ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌شود. همچنین در مواردی گزارش شده است القا IPTG در OD بالا (حدود ۱) موجب افزایش پروتئین محلول می‌گردد [۲۰]. افزودن گلوکز (۱٪ حجم نهایی) از بیان پروتئین هترولوگ به صورت نشت قبل از القا IPTG جلوگیری می‌کند. بنابراین استفاده از محیط‌های خود القاگر که حاوی گلوکز و لاکتوز است نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این شرایط باکتری ابتدا گلوکز محیط را استفاده کرده و پس از اتمام آن، از لاکتوز که القاگر بیان هترولوگ است، تغذیه می‌کند [۱۲]. همچنان



شکل ۲- بیان MO-CBP2 در BL21 با القا ۱ mM IPTG. (۱) زمان صفر (پیش از القا IPTG). (۲ و ۳) ۸ ساعت پس از القا در Shuffle (۰/۵ و ۱ mM IPTG). (۴ و ۵) رسوب و سوپ سونیکیت در Shuffle (۶ و ۷) ۸ ساعت بعد از القا در BL21 (۰/۵ و ۱ mM IPTG). (۸) بیان در محیط خود القاگر ۸ ساعت پس از القا. (۹ و ۱۰) محلول‌سازی پروتئین با روش الف (قبل و بعد از خالص‌سازی). (۱۱ و ۱۲ و ۱۳) رسوب حاصل از سونیکیت با استفاده از بافرهای A و B و C. (۱۴ و ۱۵ و ۱۶) سوپ حاصل از سونیکیت با استفاده از بافرهای A و B و C. همانطور که در ژل مشاهده می‌شود، در همه‌ی روش‌ها پروتئین به صورت جسم توده‌ای در رسوب سونیکیت باقی می‌ماند و محلول در سوپ نیست به جز روش الف که تا حدود زیادی محلول شد.



شکل ۳- بیان MO-CBP2 در BL21. (۱) کنترل منفی (BL21 حاوی وکتور بدون ژن مورد نظر). (۲) زمان صفر. (۳) بیان پس از ۸ ساعت. (۴) سوپ سونیکیت ۸ ساعت پس از القا. (۵) پروتئین محلول شده با استفاده از روش ب.



شکل ۴- ژل گرایانت SDS-PAGE ۲۴-۴٪ بیان MO-CBP2 در BL21. (۱) زمان صفر (پیش از القا IPTG). (۲) رسوب سونیکیت. (۳) و (۴) مایع رویی خالص سازی جسم توده ای. (۵) و (۶) و (۷) و (۸) و (۹) مراحل خالص سازی و محلول سازی همزمان پروتئین روی رزین نیکل سفارز. (۱۰) پروتئین مجددا سرشته و محلول خارج شده از ستون. همانطور که مشاهده می شود پروتئین با روش خالص سازی همراه با شیب غلظت اوره تا حدود زیادی خالص و محلول شده است.

استخراج پروتئین از BL21 و سرشته کردن مجدد آن انتخاب بهتری بود. احتمالاً بار پروتئین MO-CBP2 و همچنین تعداد پیوند دی سولفیدی آن از عوامل تشکیل جسم توده ای هستند. تشکیل جسم توده ای مزایایی نیز دارد؛ مانع پروتئولیز پروتئین نوترکیب توسط پروتئازهای سلولی می شود همچنین ممکن است بیان پروتئین هایی که برای میزبان سمی هستند را تسهیل کند [۱۷]. اوره و گوانیدیم هیدروکلراید از عوامل واسرشته کننده ی پروتئین ها هستند. قرارگیری پروتئین در معرض اوره ۸ M

بمنظور برطرف کردن مشکل بررسی های زیادی انجام شد. استفاده از لاکتوز به جای IPTG و یا کاهش دمای انکوباسیون به ۱۶-۲۵ درجه ی سانتی گراد موجب کاهش بیان پروتئین شده و تغییری در حلالیت پروتئین ایجاد نکرد. همچنین سویه ی بیانی Shuffle نیز که محیط داخلی آن برای تشکیل پیوندهای دی سولفیدی مهندسی شده است، ترانسفورم شد و برای بیان مورد بررسی قرار گرفت. این سویه نسبت به BL21 مقدار بیان کمتری داشت و همچنان عمده ی پروتئین در رسوب باقی می ماند. بنابراین

تغییر ساختار و هیدرودینامیک حلالی که پروتئین در آن حل شده است، اثر آبریز را کاهش داده و به طور غیرمستقیم منجر به بی‌ثباتی برهمکنش‌های بین مولکولی گردد [۴]. غلظت بالای اوره منجر به واسرشته‌سازی کامل پروتئین شده و با حذف تدریجی آن، پروتئین فرصت می‌یابد تا به آرامی ساختار فضایی خود را باز یابد و فرم سه بعدی صحیح را به خود بگیرد. این روش در سال ۱۹۹۷ توسط شی و همکارانش استفاده شده و آن‌ها توانستند آنزیم tRNA نوکلئوتیدیل ترانسفراز را در *E. coli* به صورت هترولوگ بیان کنند و مشکل جسم توده‌ای شدن آن را با این روش برطرف سازند [۱۷].

موجب دنا توره شدن پروتئین و بهم ریختن ساختار سه‌بعدی آن می‌شود. اوره یک عامل کائوتروپیک است از طریق تداخل در برهمکنش‌های غیرکوالانت مانند پیوندهای هیدروژنی، واندروالسی و هیدروفوبی، ساختار سوم پروتئین را به هم زده و آنروپی را افزایش می‌دهد. اوره با بخش‌های قطبی پروتئین (مانند پیوند پپتیدی) برهمکنش داده و در نتیجه موجب تضعیف سایر برهمکنش‌های بین مولکولی می‌گردد. وقتی پروتئین به تدریج واسرشته می‌شود، مولکول‌های آب و اوره به مراکز هیدروفوب پروتئین دسترسی بیشتری پیدا کرده و سرعت واسرشته‌سازی افزایش می‌یابد. همچنین اوره می‌تواند با

جدول ۳- مقایسه‌ی روش‌های استفاده شده در این مطالعه به منظور سرشته کردن مجدد پروتئین.

ردیف	روش‌های محلول‌سازی جسم توده‌ای	مزایا	معایب	منبع روش
۱	استفاده از بافرهای لیز سلولی افزایش دهنده حلالیت پروتئین	مناسب برای لیز سلول	عدم تاثیر در حلالیت جسم توده‌ای	[۸] و [۱۱] با اندکی تغییرات
۲	روش الف) بافر شستشو حاوی ۱M اوره - بافر استخراج حاوی ۸M اوره - دیالیز	مصرف محدود اوره	بازدهی کم در مقدار پروتئین محلول و خالص شده	[۱۹] با اندکی تغییرات
۳	روش ب) رسوب سونیکیت در بافر شستشو دوبار مجدداً سونیکیت می‌شود - بافر استخراج حاوی ۸M اوره - دیالیز	مصرف محدود اوره، نسبت به روش الف، پروتئین خالص‌تری حاصل می‌شود.	بازدهی کم در مقدار پروتئین محلول و خالص شده	[۱۹] با اندکی تغییرات
۴	روش محلول‌سازی و خالص‌سازی همزمان با استفاده از شیب اوره ۰.۸-۸	با انجام دو فرایند به صورت همزمان، مقدار بیشتری پروتئین با درصد خلوص زیاد حاصل می‌گردد.	مصرف زیاد اوره، نیاز به شارژ رزین پس از هر بار استفاده.	[۱۷]

نتیجه‌گیری نهایی

تشکیل جسم توده‌ای و برطرف کردن آن برای دستیابی به پروتئینی با ساختار سه بعدی صحیح و دارای عملکرد، چالشی طاقت‌فرسا در روند آزمایشگاهی است و نیاز به پروتکل‌هایی آزموده شده و با کارایی بالا عمیقاً احساس می‌شود. روش‌های مختلفی برای تیمار اجسام توده‌ای و محلول‌سازی پروتئین انجام شده است؛ اما هیچ روشی پاسخگو و برطرف کننده‌ی این مشکل برای همه‌ی پروتئین‌ها نیست و انتخاب بهترین روش به ساختار و توالی پروتئین، میزبان و شرایط آزمایشگاهی بستگی دارد.

به همین منظور با بررسی روش‌های مختلف جهت بیان محلول و یا محلول‌سازی جسم توده‌ای سعی در برطرف‌سازی این مشکل در مورد پروتئین MO_CBP2 گردید. با بررسی عوامل موثر بر بیان محلول شامل دما و زمان انکوباسیون، نوع و غلظت القاگر، نوع محیط کشت و نوع میزبان، همچنین استفاده از بافرهای لیز سلولی موثر بر انحلال‌پذیری جسم توده‌ای و به کارگیری روش‌های محلول‌سازی جسم توده‌ای، بهترین روش انتخاب شد. در این روش با استفاده از شیب اوره روی رزین نیکل سفارزه، پروتئین MO_CBP2 مجدداً سرشته و به میزان زیادی خالص گردید. با در نظر گرفتن حجم اوره‌ی مصرفی،

استفاده از شیب اوره برای خالص‌سازی و محلول‌سازی همزمان پروتئین موردنظر، بازده مناسبی داشت و می‌تواند

جزء روش‌های پیشنهادی قرار بگیرد.

کلمات اختصاری

DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythritol
IB	Inclusion Body
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria Broth
MO CBP2	Moringa Oleifera Chitin Binding Protein 2
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis

صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از آقای دکتر علی‌اصغر کارخانه، به جهت استفاده از مشاوره‌ی ایشان در این مطالعه عمیقاً سپاسگزاری می‌گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری زیست فناوری بدلیل حمایت مالی طی طرح ۷۴۷-۹۸۱۱۰۱-I و فراهم آوردن امکانات پژوهش و تحقیق

منابع

پروکاریوتی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۸(۳): 447-457. p.

۳- مصطفایی، ع.، ۱۳۸۲، راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

۱- افشین، ح.، et al., ۲۰۲۰، کلون‌سازی و بیان ژن بتا (۱-۳) (۱-۴) گلوکاناز در باکتری اشیرشیاکلی جهت تولید مکمل خوراک دام. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۳(۱): 64-74. p.

۲- سامانی، ی.پ.، et al., ۲۰۱۵، بیان هترولوگ آنزیم کیتیناز ۳۶ کیلو دالتونی از قارچ *Trichoderma atroviride* در میزبان

4- Bennion, B.J. and V. Daggett, 2003, *The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **100**(9): p. 5142-5147.

5- Bichi, M.H., , 2013, *A review of the applications of Moringa oleifera seeds extract in water treatment*. Civil and Environmental Research. **3**(8): p. 1-10.

6- Bondos, S.E. and A. Bicknell, 2003, *Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification*. Analytical biochemistry, **316**(2): p. 223-231.

7- Chew, F., et al., 2020, *Recovery of inclusion body protein in Escherichia coli: Effects of solubilization methods and process condition*. MS&E, **736**(2): p. 022120.

8- Esmaili, I., H.M.M. Sadeghi, and V. Akbari, 2018, *Effect of buffer additives on solubilization and refolding of reteplase inclusion bodies*. Research in pharmaceutical sciences, **13**(5): p. 413.

9- Fink, A.L., , 1998, *Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid*. Folding and design. **3**(1): p. R9-R23.

10- Freire, J.E., et al., 2015, *Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from Moringa oleifera seeds, is a member of the 2S albumin family*. PLoS One, **10**(3): p. e0119871.

11- Kaur, J., A. Kumar, and J. Kaur, 2017, *Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli: Roadblocks and reinforcements*. International journal of biological macromolecules,

12- Malekian, R., et al. , 2019, *High-yield Production of Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor in E. coli BL21 (DE3) By an Auto-induction Strategy*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. **18**(1): p. 469.

13- Muluvi, G.M., et al., 1999, *Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in Moringa oleifera Lam*. Molecular Ecology, **8**(3): p. 463-470.

- 14- Neto, J.X., et al., 2017, *A Chitin-binding Protein Purified from Moringa oleifera Seeds Presents Anticandidal Activity by Increasing Cell Membrane Permeability and Reactive Oxygen Species Production*. *Frontiers in microbiology*, **8**: p. 980.
- 15- Ohri, D. and A. Kumar, 1986, *Nuclear DNA amounts in some tropical hardwoods*. *Caryologia*, **39**(3-4): p. 303-307.
- 16- Ramón, A., M. Señorale, and M. Marín, 2014, *Inclusion bodies: not that bad...*. *Frontiers in microbiology*, **5**: p. 56.
- 17- Shi, P.-Y., N. Maizels, and A.M. Weiner, 1997, *Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies*. *Biotechniques*, **23**(6): p. 1036-1038.
- 18- Singh, A., V. Upadhyay, and A.K. Panda, 2015, *Solubilization and refolding of inclusion body proteins*, in *Insoluble Proteins*, Springer. p. 283-291.
- 19- Singh, A., et al. 2015, *Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process*. *Microbial cell factories*, **14**(1): p. 41.
- 20- Singhvi, P., et al. 2020, *Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins*. *Trends in Biotechnology*, **38**(5): p. 474-486.
- 21- Villaverde, A. and M.M. Carrió, 2003, *Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies*. *Biotechnology letters*, **25**(17): p. 1385-1395.

Simultaneous refolding and purification of MO-CBP2 IBs using urea gradient

Velayatipor F.^{1,2}, Aminzadeh S.¹, Angaji S.A.², Fotouhi F.¹ and Ghollasi M.²

¹ National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, Bioprocess Engineering Research Group, Shahrak-e Pajoohesh km 15, TehranKaraj Highway, Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Nowadays heterologous expression of proteins plays a key role in biotechnology. Inclusion body formation in heterologous expression of proteins, especially expression of eukaryotic proteins in prokaryotic hosts including *E. coli*, is one of the most laborious challenges for researchers. High expression of protein, its specific conformation, disulfide bonds and protein charge are account for inclusion body formation. It has been reported that some inclusion bodies have biological activity but in most cases they should be renatured and soluble. Refolding processes are often not only multi-steps and time-consuming but also have low yields. In this study for the first time MO-CBP2 from *Moringa Oleifera* seed, successfully expressed heterologously in the *E. coli* but formation of inclusion bodies was a great challenge. Different methods were carried out for refolding the protein, more efficient one was Nickel sepharose column affinity chromatography with urea gradient 8-0 M that result in simultaneous refolding and purification of the protein in fewer steps. This method yields a considerable amount of pure and renatured protein and it is recommended as a convenient and efficient method.

Key words: Gradient SDS-PAGE, Inclusion body, MO-CBP2, Protein Refolding, protein Renaturation