خالص‌سازی و محلول‌سازی همزمان جسم‌توده‌ای MO-CBP2 با استفاده از شیب اوره

فاطمه ولایتی پور[۱و۲]، سعید امین زاده[۱*]، سید عبدالحمید انگجی[۲]، فاطمه فتوحی[۱] و مرضیه قلاسی[۲]

[۱] **ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده‌ی صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرایند**

[۲] **ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده‌ی علوم زیستی، گروه زیست شناسی 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 پردردسرترین 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 مجددا 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 کارآمد ترین آن‌ها استفاده از کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل سفارز بهمراه شیب غلظت 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]

واژه های کلیدی: الکتروفورز ژل گرادیانت پلی آکریل آمید- سدیم دو دسیل سولفات، پروتئین متصل شونده به کیتین۲ از مورینگا اولیفرا، جسم توده‌ای، سرشته کردن پروتئین

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

مقدمه

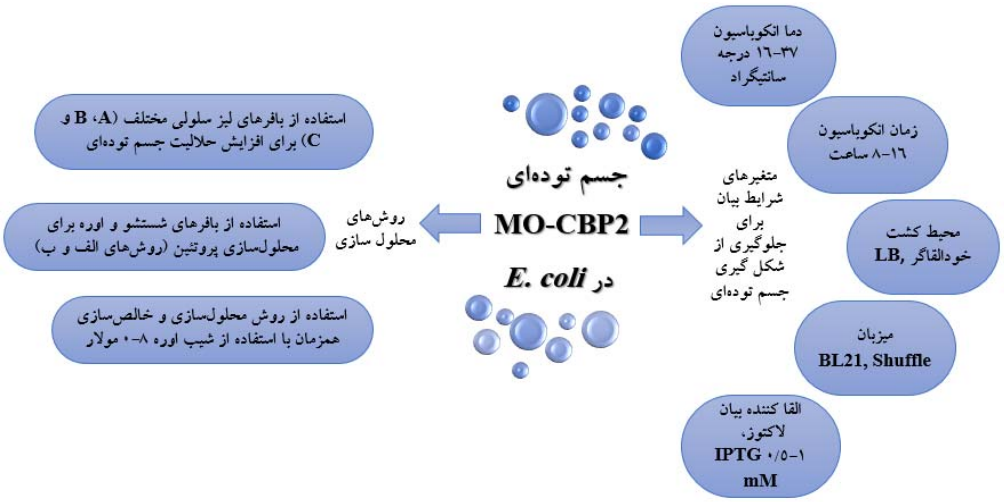
اجسام توده‌ای نه تنها در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها، بلکه در بیان بیش از حد همولوگ و هترولوگ نیز ایجاد می‌شوند. تجمع پروتئین‌ها به این شکل، برای مطالعات آزمایشگاهی چالش‌ساز است و در مقیاس بزرگتر می‌تواند مشکلات اقتصادی و فنی عمده‌ای در صنایع بیوتکنولوژی و داروسازی ایجاد کند. محیط احیایی سیتوزول باکتریایی، 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 خالص سازی 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

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 دارای۴/۱٪ قند می‌باشد که به صورن کووالانت به آن متصل است. درتوالی این پروتئین چهار سیستئین وجود دارد که احتمالا 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 می دهد که موجب بلاک شدن زنجیره می شود [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 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 پروتئین ها حساس است و پپتیدهای با ساختار سه بعدی نادرست و توده‌های محلول برای آن سمی هستند. اجسام توده‌ای می توانند یک منبع تقریبا خالص از پروتئین نوترکیب باشند[۱۶]. در مطالعات بسیاری، روش‌های مختلفی ازقبیل 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 جسم‌توده‌ای آن بودند (شکل۱).



شکل۱- بررسی روش‌های انجام شده در این مطالعه به منظور جلوگیری از تشکیل جسم توده‌ای و روش‌های محلول‌سازی آن.

مواد و روشها

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

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

سویه‌های میکروبی: *E. coli* BL21 (شماره کاتالوگ Novagen ۶۹۴۵۰)، *E. coli* Shuffle (شماره کاتالوگ NEB c۳۰۲۹)

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 Bl21(DE3)بصورت هترولوگ بیان شد. بیان پروتئین با القا IPTG ۱ mM در ۵۰ ml محیط کشت LB حاوی µg/ml ۵۰ کانامایسین، انکوباسیون ۸ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از نمونه‌گیری، باقی محیط کشت حاوی باکتری در فالکون ۵۰ ml ریخته شد و ۲۰ دقیقه در ۷۵۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی از رسوب جدا شد. رسوب در ۳ ml بافر اتصال (NaH_2PO_4 ۵۰ mM، NaCl ۵۰۰ mM، Imidazol ۱۰ mM) حل و سونیکیت شد. پس از سونیکیشن سلول‌ها و جداسازی سوپ سونیکیت از رسوب، از هر مرحله یک نمونه روی ژل گرادیانت 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 (pH = ۷/۲)، 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 پروتئین ها می‌شود [۶] و [۲۱]. تعدادی از بافرهای لیز استفاده شده در جدول۱ ذکر شدند:

جدول۱- بافرهای لیز سلولی استفاده شده بمنظور افزایش انحلال‌پذیری جسم‌توده‌ای

بافر لیز سلولی	محتویات	منبع
بافر A	NaH_2PO_4 ۵۰mM، NaCl ۳۰۰ mM، Imidazol۱۰ mM و Tween20۲۵µl (pH = ۸)	[۸]
بافر B	NaH_2PO_4 ۵۰mM، NaCl ۵۰۰ mM، Imidazol ۲۰ mM، ۰/۰۵ ٪ بتامرکاپتواتانول و ۰/۵ ٪ Triton X-100 و ۱۰٪ گلیسرول (pH = ۸)	[۱۱]
بافر C	NaCl۱۴۰ mM ، KCl ۲/۷ mM، Na_2HPO_4 ۱۰ mM و KH_2PO_4 ۱/۸ mM، Imidazol۱۰ mM و ۱۰٪ گلیسرول (pH = ۷/۳)	[۱۱]

روش‌های سرشته کردن مجدد پروتئین: روش الف) استفاده از بافر شستشوی حاوی Tris HCl ۵۰ mM (pH = ۷/۵) به همراه NaCl ۲۰۰ mM و بافر استخراج حاوی Tris HCl ۵۰ mM (pH = ۷/۵) و اوره ۸M بود. در این روش رسوب حاصل از سونیکیت در بافر شستشوی حاوی Triton X-100 ۱٪ 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 خالص سازی جسم توده‌ای، رسوب سونیکیت را در Tris-HCl ۵۰ mM، NaCl ۱۵۰ mM، Triton X-100 ۱٪ 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 خالص سازی و محلول‌سازی به صورت همزمان با استفاده از شیب اوره: یکی از روش‌های بازیابی و محلول سازی پروتئین که تا حدود زیادی پروتئین را مجددا 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 خالص سازی پروتئین با ایجاد شیب اوره، سرشته سازی 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 مجددا سرشته می‌شود. در نهایت ستون با ۳ برابر حجم ستون بافر اتصال فاقد واسرشته کننده شستشو داده شد سپس با ۳ برابر حجم ستون بافر خارج کننده، پروتئین MO-CBP2 سرشته شده از ستون خارج شد. برای حذف ایمیدازول با استفاده از بافر Tris HCl ۲۰ mM حاوی NaCl ۵۰ mM دیالیز صورت گرفت.

جدول۲- بافر های تخلیص پروتئین در روش محلول و خالص سازی همزمان پروتئین.

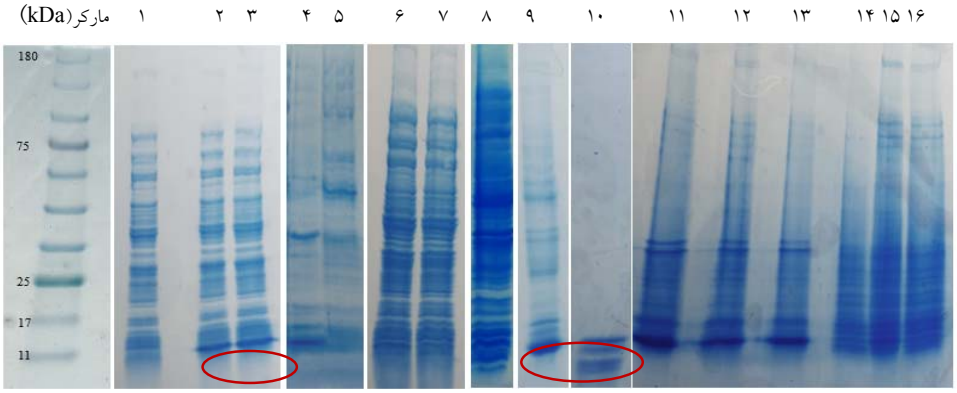
بافر ها / مواد	بافر اتصال (pH = ۷/۸)	بافر شستشو (pH = ۷/۸)	بافر خارج کننده (pH = ۷/۸)
Tris base	۲۰ mM	۲۰ mM	۲۰ mM
NaCl	۰/۵ M	۰/۵ M	۰/۵ M
Imidazole	۵ mM	۲۰ mM	۰/۳ M

نتایج و بحث

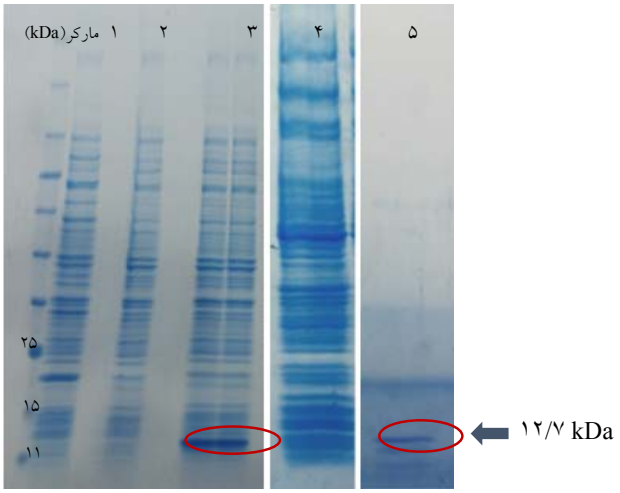
بیان پروتئین و اثر متغیـرهای شرایط بیان برای جلوگیری از تشکیل جسم توده ای: بیان پروتئین MO-CBP2 در BL21 پس از ۸ ساعت، ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد در ۵۰ml محیط کشت LB بررسی شد. سوپ و رسوب حاصل از

سونیکیت سلول‌ها بر روی ژل گرادیانت SDS-PAGE مشاهده شدند (شکل۲). 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 ی سانتی گراد) 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 سانتی گراد 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 پروتئین بصورت جسم توده‌ای در رسوب سونیکیت باقی ماند (شکل۲). سویه‌ی باکتریایی تغییر داده شد و سویه‌ی Shuffle ترانسفورم شد. در Shuffle نیز این مشکل وجود داشت و جسم توده‌ای تشکیل شد (شکل ۲و۳). بنابراین به دلیل بیان کمتر در Shuffle و عدم حلالیت پروتئین در آن، بیان در سویه‌ی BL21 انتخاب بهتری بود.

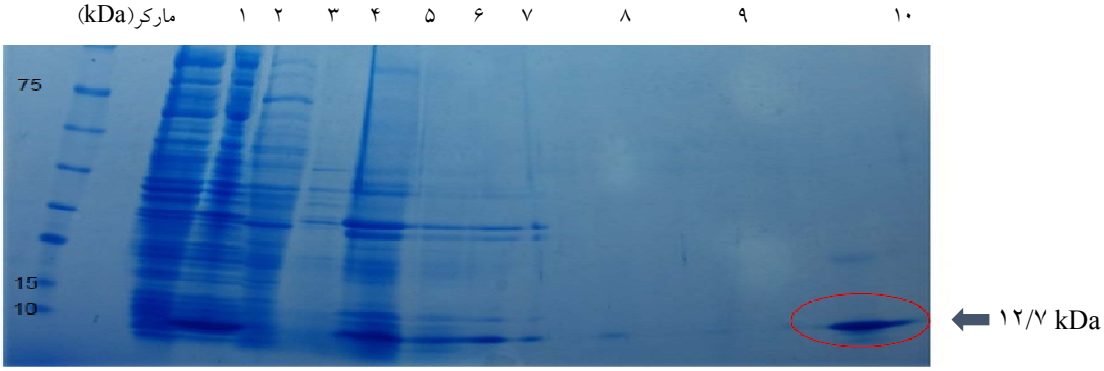
بررسی بازده و کارایی بافرهای لیز سلولی و روش‌های رناتوراسیون: همانطور که مشاهده می‌شود تغییر در مواد مورد استفاده در بافرهای لیزکننده اثر چندانی بر محلول شدن پروتئین ندارند (شکل۲). چندین روش برای سرشته کردن مجدد جسم توده‌ای بکار گرفته شد از جمله روش‌های الف و ب، که اغلب بازده کمی داشتند، تنها درصد اندکی از پروتئین مجددا سرشته شده و مقدار زیادی از پروتئین از دست می‌رفت. با استفاده از روش خالص‌سازی و محلول‌سازی همزمان پروتئین، MO-CBP2 مجددا سرشته و به میزان زیادی خالص شد (شکل۴).



شکل۲- بیان MO-CBP2 در BL21 با القا IPTG ۱ mM. ۱) زمان صفر(پیش از القا IPTG). ۲و۳) ۸ ساعت پس از القا در Shuffle (۰/۵ و IPTG ۱ mM). ۴و ۵) رسوب و سوپ سونیکیت در Shuffle. ۶و۷) ۸ ساعت بعد از القا در BL21 (۰/۵ و IPTG ۱ mM). ۸) بیان در محیط خود القاگر ۸ ساعت پس از القا. ۹و۱۰) محلول سازی پروتئین با روش الف (قبل و بعد از خالص سازی). ۱۱و ۱۲و ۱۳) رسوب حاصل از سونیکیت با استفاده از بافرهای A و B و C. ۱۴و ۱۵و۱۶) سوپ حاصل از سونیکیت با استفاده از بافر های A و B و C. همانطور که در ژل مشاهده می شود، در همه‌ی روش ها 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.



شکل۳- بیانMO-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.



شکل۴- ژل گرادیانت SDS-PAGE ٪۲۴-۴. بیان MO-CBP2 در BL21. ۱) زمان صفر (پیش از القا IPTG). ۲) رسوب سونیکیت. ۳و ۴) مایع رویی خالص سازی جسم توده ای. ۵و ۶ و ۷ و ۸ و ۹) مراحل خالص‌سازی و محلول‌سازی همزمان پروتئین روی رزین نیکل سفارز. ۱۰) پروتئین مجددا سرشته و محلولِ خارج شده از ستون. همانطور که مشاهده می‌شود پروتئین با روش خالص سازی همراه با شیب غلظت اوره تا حدود زیادی خالص و محلول شده است.

بمنظور برطرف کردن مشکل بررسی‌های زیادی انجام شد. استفاده از لاکتوز به جای IPTG و یا کاهش دمای انکوباسیون به ۱۶ –۲۵ درجه‌ی سانتی گراد موجب کاهش بیان پروتئین شده و تغییری در حلالیت پروتئین ایجاد نکرد. همچنین سویه‌ی بیانی Shuffle نیز که محیط داخلی آن برای تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی مهندسی شده است، ترانسفورم شد و برای بیان مورد بررسی قرار گرفت. این سویه نسبت به BL21 مقدار بیان کمتری داشت و همچنان عمده‌ی پروتئین در رسوب باقی می‌ماند. بنابراین استخراج پروتئین از BL21 و سرشته کردن مجدد آن انتخاب بهتری بود. احتمالا بار پروتئین MO-CBP2 و همچنین تعداد پیوند دی‌سولفیدی آن از عوامل تشکیل جسم توده‌ای هستند. تشکیل جسم توده‌ای مزایایی نیز دارد؛ مانع پروتئولیز پروتئین نوترکیب توسط پروتئازهای سلولی می‌شود همچنین ممکن است بیان پروتئین‌هایی که برای میزبان سمی هستند را تسهیل کند [۱۷]. اوره و گوانیدیوم هیدروکلراید از عوامل واسرشته کننده‌ی پروتئین‌ها هستند. قرارگیری پروتئین در معرض اوره ۸ M

موجب دناتوره شدن پروتئین و بهم ریختن ساختار سه‌بعدی آن می‌شود. اوره یک عامل کائوتروپیک است از طریق تداخل در برهمکنش‌های غیرکووالانت مانند پیوندهای هیدروژنی، واندروالسی و هیدروفوبی، ساختار سوم پروتئین را به هم زده و آنتروپی 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 تغییر ساختار و هیدرودینامیک حلالی که پروتئین در آن حل شده است، اثر آبگریز 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].

جدول۳- 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 حاوی۸M 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 مجددا سونیکیت می‌شود- بافر استخراج حاوی۸M 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 ۰M-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 کارآیی بالا عمیقا احساس می‌شود. روش‌های مختلفی برای تیمار اجسام توده‌ای و محلول سازی 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 جسم‌توده‌ای، بهترین روش انتخاب شد. در این روش با استفاده از شیب اوره روی رزین نیکل سفارز، پروتئین MO_CBP2 مجددا 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

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری زیست فناوری بدلیل حمایت مالی طی طرح ۷۴۷-I-۹۸۱۱۰۱ و فراهم آوردن امکانات پژوهش و تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می گردد. همچنین از آقای دکتر علی‌اصغر کارخانه، به جهت استفاده از مشاوره‌ی ایشان در این مطالعه عمیقا سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

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

۲- سامانی, ی.پ., et al. ۲۰۱۵.بیان هترولوگ آنزیم کیتیناز ۳۶ کیلو دالتونی از قارچ *Trichoderma atroviride* در میزبان پروکاریوتی. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران), ۲۸(۳): p. 447-457.

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

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