

طراحی و ساخت وکتور بیانی pET32b(+)-Rh براساس سیستم pET جهت تسهیل پروسه

تخلیص پروتئین نو ترکیب



لیلا رضایی یونکی، هدا آیت* و علی محمد احدی

ایران، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه ژنتیک

چکیده

خالص سازی پروتئین‌ها یک مرحله ضروری برای بررسی عملکرد و ساختار آنها است. بمنظور تسهیل تخلیص، پروتئین‌ها غالباً به برجسب تمایلی متصل می‌شوند. هدف از این تحقیق طراحی و ساخت وکتور pET32b(+)-Rh بر اساس وکتور بیانی پرکاربرد pET-32b(+) در جهت تخلیص آسان‌تر پروتئین‌های نو ترکیب و تنها با استفاده از ستون تمایلی نیکل می‌باشد. بعد از طراحی پرایمر، با استفاده از واکنش PCR قطعه مورد نظر تکثیر یافت و در وکتور pET-32b همسانه سازی شد. وکتور نو ترکیب در باکتری اشریشیا کلای ترانسفورم گشت. بعد از غربالگری با تست کلونی- PCR و آنالیز آنزیمی، تعیین توالی شد. مطالعه عملکرد وکتور با بررسی بیان و تخلیص یک پپتید کوچک سمی دارای پیوندهای دی‌سولفیدی در وکتور pET32b(+)-Rh انجام شد. در وکتور جدید pET32b(+)-Rh، محل برجسب هیستیدینی در ناحیه انتهای کربوکسیل تیوردوکسین حذف شده و همچنین ناحیه انتهای آمینی پپتید نو ترکیب در صورت استفاده از آنزیم BamHI تغییر چندانی نخواهد کرد. برای بررسی عملکرد وکتور، بیان محلول یک پپتید سمی در آن با بررسی و تخلیص دو مرحله‌ای با استفاده از روش IMAC، منجر به تخلیص پپتید نو ترکیب شد. در این تحقیق از روش ساده و سریع کلونینگ برای دسترسی به یک وکتور تغییر یافته بیانی با استفاده از پلاسمید تجاری موجود، استفاده شد. از وکتور جدید pET32b(+)-Rh می‌توان برای بیان پپتیدهایی با ساختار پیچیده که نیازمند به تغییر پس از ترجمه و فیوژن با تیوردوکسین هستند، بهره برد و سپس از تخلیص ساده‌تر بدون نیاز به ستون کروماتوگرافی دیگر یا روش‌های پرهزینه‌ای نظیر HPLC و FPLC برای تخلیص نهایی آن استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: pET-32، pET32b(+)-Rh، تخلیص پروتئین نو ترکیب، برجسب هیستیدین، تیوردوکسین

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۳۳۲۲۴۴۰۱، پست الکترونیکی: ayat-h@sku.ac.ir

مقدمه

بیان پروتئین‌های یوکاریوتی در سیستم پروکاریوتی، وجود دارد. عدم وجود چپرون‌های یوکاریوتی، تغییرات تخصصی پس از ترجمه و وجود پیوندهای دی‌سولفیدی می‌تواند منجر به پیچش و تجمع اشتباه پروتئین شود. یکی از موفق‌ترین راهکارها برای افزایش بیان پروتئین‌های محلول، اتصال با برجسب‌های تقویت کننده حلالیت یا پپتیدهای فیوژن، مانند پروتئین اتصال دهنده مالتوز (MBP) (Maltose-binding protein)، تیوردوکسین (Trx) (Thioredoxin) و گلو تاتیون-S-ترانسفراز (glutathione S-transferase) (GST) می‌باشد (۸). این پروتئین‌های فیوژن

در طول سالهای گذشته، تولید پروتئین‌های نو ترکیب به یک فناوری مهم تبدیل شده که طیف وسیعی از کاربردها را در زمینه‌های مختلف پزشکی و صنعتی شامل می‌شود (۳). افزایش تعداد پپتیدهای درمانی، منجر به پویایی تجارت پپتیدهای نو ترکیب شده است (۱۵). تقاضا برای این پروتئین‌ها را نمی‌توان از منابع طبیعی تأمین کرد. اشریشیا کلای (Escherichia coli) اغلب بدلیل سهولت در کشت، رشد سریع و دانش گسترده از فرآیندهای ژنتیکی و فیزیولوژیکی آن، اولین انتخاب برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب است (۱۳). با این وجود مشکلات زیادی برای

در ژنوم باکتری قرار دارد و بصورت کاملاً اختصاصی به پروموتور خود متصل و رونویسی انجام می‌گیرد. پروموتور توسط IPTG القا می‌گردد و می‌توان بیان بالایی از محصول را بدست آورد. این بیان بالای سیستم pET گاهی منجر به ایجاد اجسام انکلوژن بدلیل دارا بودن تغییرات پس از ترجمه در پپتید نوترکیب و یا پیوندهای دی‌سولفیدی آن می‌شود (۱۶ و ۱۹). وکتور بیانی قوی pET-32 که با اضافه کردن تیوردوکسین بصورت فیوژن به پروتئین نوترکیب میزان بیان را افزایش داده و حلالیت و ساختار پروتئین را تصحیح می‌کند، بسیار پر استفاده است. همچنین این سیستم بیانی برای بیان پروتئین‌های سمی در اشریشیا کلای نیز بسیار کارآمد است، زیرا اضافه شدن تیوردوکسین مانع اعمال اثر سمیت پپتید در باکتری و کاهش بیان پپتید یا مرگ باکتری می‌شود. وکتور پرکاربرد (+) pET-32b دارای برچسب‌های تخلیص و شناسایی S-tag و دو برچسب His.tag در بالادست و پایین دست پپتید نوترکیب می‌باشد. تیوردوکسین جهت محلول سازی و افزایش بیان پروتئین نوترکیب در N ترمینال پپتید نوترکیب اضافه می‌شود. دو جایگاه آنزیمی ترومبین و انتروکیناز در وکتور تعبیه شده که در نهایت بعد از بیان و تخلیص، از طریق پروتئاز مربوطه تیوردوکسین با S.tag و یکی از تگ‌های His جدا می‌شود، در آخر برای تخلیص نهایی پپتید نوترکیب از روش HPLC یا FPLC و یا جداسازی تیوردوکسین متصل به S-tag استفاده می‌شود و پروتئین خالص طی دو مرحله بدست می‌آید. استفاده از S-tag برای جداسازی تیوردوکسین نیازمند به ستون کروماتوگرافی تمایلی با آنتی بادی اختصاصی دارد، همچنین می‌توان از روش‌های پرهزینه HPLC یا FPLC برای تخلیص نهایی پپتید نوترکیب از تیوردوکسین، استفاده کرد. این پژوهش برای طراحی پلاسمیدی که با آن بتوان بهره‌وری تخلیص را بالا برده و بصورت ساده تر و ارزان قیمت پروتئین نوترکیب را تخلیص کرد، طراحی شد. در پژوهش حاضر اولین توالی هیستیدینی در N ترمینال پروتئین نوترکیب

در وکتورهای بیانی تعبیه می‌شوند و باید در مراحل بعدی کار حذف شوند (۱۱). پپتیدهای فیوژن می‌تواند برای افزایش سطح بیان و حلالیت، برای ساده سازی ریفولدینگ و افزایش کارایی آن و برای جلوگیری از تجزیه پروتئین نوترکیب نیز استفاده شود (۷). یکی از برچسب‌های بسیار مورد استفاده، تیوردوکسین با وزن تقریباً ۱۲ کیلودالتون می‌باشد که یک پروتئین کوچک، بسیار محلول و از نظر حرارتی پایدار با ویژگی‌های فولدینگ قوی است (۱۴). تیوردوکسین یک پروتئین کاتالیزوری برای تسهیل ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی و افزایش حلالیت پروتئین‌ها است، بنابراین تشکیل اجسام انکلوژن را کاهش می‌دهد و برنامه‌های محلول‌سازی با استفاده از اوره را کم می‌کند (۱۰). بغیر از این، در وکتورهای بیانی از برچسب‌های تمایلی (affinity tag) نیز برای تسهیل پروسه‌های مختلف تشخیص و تخلیص استفاده می‌شود که حداقل تأثیر بر ساختار سوم و فعالیت زیستی پروتئین را دارند (۲۳). امروزه برچسب‌های تمایلی مختلفی استفاده می‌شود که شامل برچسب‌های poly-Arg، FLAG، poly-His، c-myc، S-tag می‌باشند (۱۱). از این میان برچسب‌های پلی‌هیستیدین (Polyhistidine)، برای خالص‌سازی پروتئین‌های نوترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی (IMAC) (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) که مبتنی بر تعاملات بین یک یون فلز Ni^{2+} تثبیت شده روی ماتریس و زنجیره‌های جانبی اسید آمینه هیستیدین است، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹).

طیف گسترده‌ای از وکتورهای کلونینگ تجاری برای تولید و بیان پروتئین‌های نوترکیب دارای برچسب پلی‌هیستیدین در سیستم‌های بیانی مختلف مانند اشریشیا کلای، وجود دارد (۵). سیستم بیانی pET از قدرتمندترین سیستم‌هایی است که بمنظور کلون و بیان پروتئین‌های نوترکیب در اشریشیا کلای استفاده می‌شود. زمانیکه ژن هدف در داخل وکتور کلون می‌شود، رونویسی تحت کنترل پروموتور قوی باکتریوفاژ T7 انجام می‌گیرد. RNA پلی‌مراز باکتریوفاژ T7

بهمراه دو توالی برش آنزیمی *Nco I* و *EcoR V* حذف گردید. حذف اولین تگ هیستیدینی باعث می شود که در مرحله دوم تخلیص با ستون کروماتوگرافی نیکل، تیوردوکسین تخلیص نشده و تنها پپتید نو ترکیب جداسازی شود. پس از تخلیص پروتئین نو ترکیب با دم پلی هیستیدینی و روش IMAC، با هضم آنزیمی پروتئین، دو پپتید نو ترکیب و پپتید تیوردوکسین حاصل می شود که در مرحله بعدی نیز می توان از روش IMAC برای تخلیص پپتید نو ترکیب استفاده کرد. بیان و تخلیص موفق یک پپتید کوچک با پیوندهای دی سولفیدی در وکتور جدید pET32b(+)-Rh نشان دهنده عملکرد صحیح وکتور بود.

مواد و روشها

مواد: سویه Top10F اشریشیا کلای بعنوان میزبان کلونینگ، سویه BL21 بعنوان میزبان بیانی و همچنین وکتور بیانی pET-32b(+)-Rh ساخت شرکت نواژن جهت انجام تحقیق، تامین گردید. محیط کشت LB (Luria-Bertani) برای کشت باکتری استفاده شد، آنزیم های *BamH I* و *Xho I*

بررسی جایگاه های برش آنزیمی وکتور (+)pET-32b و طراحی پرایمر: در ابتدا با استفاده از نرم افزار Gene Runner 3.05 توالی بین T7 پروموتور و T7 ترمیناتور از لحاظ جایگاه های برش آنزیمی و همچنین حفظ ترتیب نوکلئوتیدها در قالب خواندن مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید، با نرم افزار Gene Runner 3.05 طراحی پرایمر انجام گرفت. با در نظر گرفتن جایگاه آنزیمی *Msc I* پرایمر پیشرو *For MscI* با جایگاه برش (*Bal I*) *Msc I* و پرایمر معکوس *Rev BamH I* با جایگاه برش *BamH I* طراحی گردید مشخصات پرایمرهای در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی پرایمری مربوط به طراحی وکتور در این پژوهش (جایگاه شناسایی آنزیم با خط زیر آن مشخص شده است)

توالی کد کننده (۳→۵)	تعداد نوکلئوتید	نام توالی
ΔTGCTIGGCCATTCTCCGGTCTGGTGCC۳	۲۸	پرایمر پیشرو <i>For Msc I</i>
ΔTATCGGATCCGCCTTGTCGTCGTCGTCG۳	۲۸	پرایمر معکوس <i>Rev BamH I</i>
ΔGCTAGTTATTGCTCAGCGG۳	۱۹	ترمیناتور T7 پرایمر
ΔTAATACGACTCACTATAGGG۳	۲۰	پروموتور T7 پرایمر

تکثیر توالی از جایگاه آنزیمی *Msc I* تا *BamH I* با پرایمرهای سنتز شده تکثیر گردید. واکنش PCR برای هر دو مورد در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با اضافه کردن ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* پلی مرز ۵ واحد بر میکرولیتر و ۱ میکرولیتر DNA الگو انجام گرفت. تکثیر

تکثیر توالی از جایگاه آنزیمی *Msc I* تا *BamH I*: بعد از کشت ۱۶ ساعته باکتری در محیط LB مایع در دمای ۳۷°C درجه، استخراج پلاسمید pET-32b⁽⁺⁾ از باکتری Top10 با روش قلیایی انجام شد و محصول بعنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد؛ توالی بین T7 پروموتور و T7 ترمیناتور تکثیر شد و از روی محصول PCR آن، توالی بین جایگاه

غربالگری کلونی‌های واجد پلاسمید جدید بروش کلونی-PCR: برای اینکه ورود قطعه ژنی به وکتور مورد تایید قرار گیرد، از روش کلونی-PCR استفاده شد. در این روش از پلیتی که حاوی کلونی‌های حاصل از ترانسفرم بود، چند کلونی به‌مراه کلونی کنترل بطریق شطرنجی کشت داده شد. واکنش PCR، با محلول باکتری قرار گرفته بمدت ۱۰ دقیقه در دمای C ۹۶ و شرایط قبلی، انجام گرفت و روی ژل ۲٪ الکتروفورز شد. پرایمر T7 ترمیناتور و T7 پروموتور نیز بمنظور انجام کلونی-PCR و طراحی وکتور مورد استفاده قرار گرفتند. چند کلنی با نتیجه PCR مثبت در محیط LB مایع کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید از آن‌ها انجام گرفت.

آنالیز آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده: از آنجایی که پلاسمید جدید فاقد جایگاه آنزیمی *Nco I* و *EcoR V* می‌باشد، بر روی پلاسمید استخراج شده و نیز پلاسمید pET-32b بعنوان کنترل، آنالیز آنزیمی تحت اثر آنزیم‌های *BamH I* و *Nco I* صورت گرفت. برش آنزیمی با آنزیم *Nco I* روی پلاسمیدها بمدت ۴ ساعت و در دمای C ۳۷ انجام گرفت. همچنین جهت تایید سالم بودن جایگاه برش *BamH I*، پلاسمید بمدت ۴ ساعت به‌مراه کنترل تحت اثر این آنزیم قرار گرفت و بر روی ژل ۱٪ الکتروفورز شد. در نهایت پلاسمید تایید شده با آنالیز آنزیمی، تعیین توالی شد.

بررسی بیان و تخلیص پپتید نوترکیب از وکتور جدید pET32b(+)-Rh: بمنظور بررسی صحت و تمامیت وکتور جدید، ژن کدکننده توکسین IOD-NaTx جدا شده از عقرب، در پلاسمید نوترکیب pET32b(+)-Rh کلون شد (اطلاعات در دست چاپ) و به باکتری مستعد BL21 با روش شوک حرارتی ترانسفورم شد. تک کلونی از آن در محیط کشت LB کشت شبانه داده شد و بعد از تلقیح و رسیدن OD به ۰/۶ بیان آن در اثر القا با IPTG با مقدار ۱ میلی مولار در مدت ۸ ساعت و دمای C ۲۸ انجام شد.

قطعه ۱۲۳ جفت بازی بمنظور جلوگیری از جهش توسط *Pfu* پلیمرز انجام گرفت. چرخه‌های PCR برای توالی بین T7 پروموتور و T7 ترمیناتور شامل: یک مرحله واسرشت ابتدایی در دمای C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه، واسرشت شدگی در دمای C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای C ۵۸ به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه برای ۳۵ سیکل و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای C ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. برای قطعه ۱۲۳ جفت بازی به همان ترتیب فقط با ۳۰ سیکل متوالی C ۷۲، ۵۶، ۹۴ هر کدام ۴۰ ثانیه انجام پذیرفت. محصول PCR روی ژل آگارز برده شد و جهت خالص سازی توسط کیت، از روی ژل بریده شد (۱۰).

هضم آنزیمی واکنش اتصال: پلاسمید pET-32b(+) و قطعه‌ی تکثیر یافته تحت اثر آنزیم‌های *Msc I* و *BamH I* به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ هضم شدند. هر دو محصول هضم آنزیمی فوق روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند. باند ۱۲۳ جفت بازی و پلاسمید خطی شده از روی ژل با استفاده از کیت بیورد جدا شدند. مقدار ۰/۲ میکروگرم قطعه تخلیص شده از ژل با ۰/۱ میکروگرم پلاسمید در واکنش اتصال حاوی ۱ واحد لیگاز و حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر قرار گرفتند. تیوپ حاوی واکنش اتصال، بمدت یک ساعت ونیم در دمای ۱۶ و یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت.

تهیه سلول‌های مستعد و ترانسفورماسیون: باکتری Top10 در ۵ml محیط آمپی‌سیلین دار LB رشد داده شد تا OD به ۰/۴ رسید. با استفاده از CaCl₂ ۰/۱ مولار سلول‌های مستعد تهیه شد. مخلوط واکنش اتصال در باکتری مستعد ترانسفورم شد و روی پلیت‌های LB آگار آمپی‌سیلین دار، کشت داده شد و بمدت ۱۶ ساعت در انکوباتور C ۳۷ قرار داده شدند.

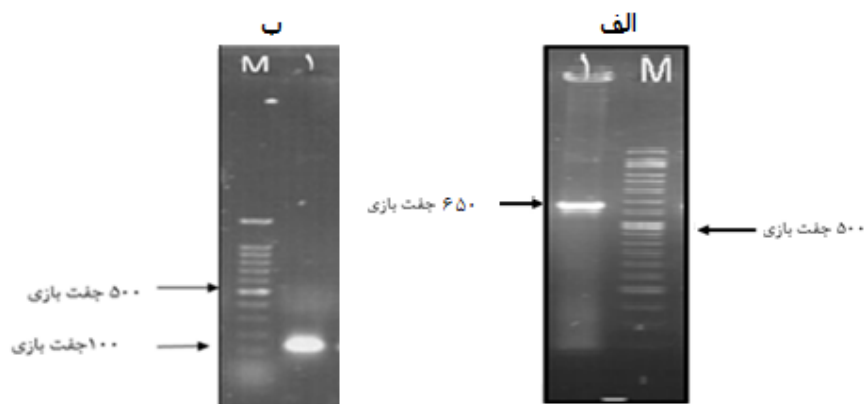
یا تداخل عمل آنزیمی یا تغییر قاب خوانش مشاهده نشود. برای عدم تغییر قاب خوانش، یک نوکلئوتید در انتهای ۵' پرایمر اضافه شد.

استخراج پلاسمید و تکثیر توالی: پلاسمید pET-32b(+) استخراج شده و سپس توالی بین T7 پروموتور تا T7 ترمیناتور با اندازه حدوداً ۶۵۰ جفت بازی تکثیر شد (شکل ۱ الف) و بعنوان الگو برای تکثیر توالی ۱۲۳ جفت بازی با پرایمرهای F و R که شامل جایگاه برش *Msc I* و *BamHI* می‌باشند، استفاده گردید (شکل ۱ ب).

باکتری‌ها جمع‌آوری شده، لیز شده و تخلیص پپتید نوترکیب فیوژن با تیوردوکسین با ستون IMAC انجام شد. بعد از هضم پپتید فیوژن با اتروکیناز، پپتید خالص IOD-NaTx با روش IMAC دوباره تخلیص شد و پپتید نوترکیب حاصل شد (جزئیات روش‌ها در مقاله در دست چاپ)

نتایج

طراحی وکتور: بمنظور تغییر وکتور pET-32b(+) طراحی پرایمر انجام شد. جایگاه‌های آنزیمی بررسی شد تا مشکل



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR: تصویر الف - باند مربوط به توالی بین T7 پروموتور و T7 ترمیناتور بر روی ژل آگارز ۱ درصد. تصویر ب - باند حاصل از پرایمرهای *Msc I* و *BamHI* Rev مربوط به توالی ۱۲۳ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۱ درصد. (M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی)

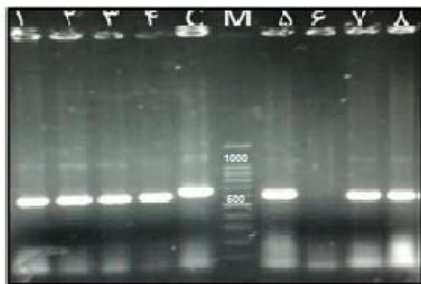
PCR: از تعداد کلونی‌هایی که ترانسفورم شده بودند ۸ کلونی کشت شطرنجی شده بود که بر روی آن‌ها کلونی-PCR با پرایمرهای T7 پروموتور و T7 ترمیناتور انجام گرفت. کلونی‌های حاوی وکتور نوترکیب که pET32b(+)Rh (حروف اول نام سازندگان وکتور) نام گرفت، با اندازه ۳۰ جفت باز کمتر از وکتور کنترل در ژل مشخص می‌باشند که در (شکل ۲) مشخص می‌باشد.

آنالیز آنزیمی: پلاسمید نوترکیب استخراج و مورد بررسی آنزیمی قرار گرفت. در این مرحله تعدادی از پلاسمیدها توسط آنزیم *Nco I* خطی شدند که نشان دهنده وکتور

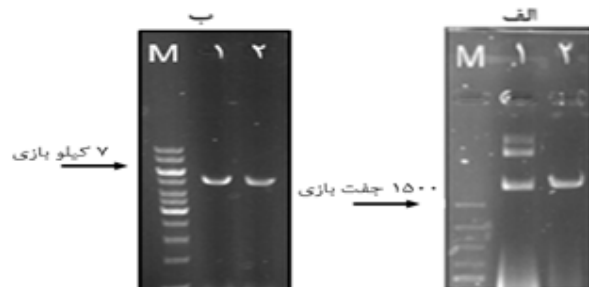
کلون سازی وکتور جدید: پلاسمید و قطعه‌ی ۱۲۳ جفت بازی هر دو تحت تاثیر آنزیم های برشگر *Msc I* و *BamHI* قرار گرفتند. قطعه ۱۲۳ جفت بازی توسط کیت تخلیص DNA، خالص سازی گشت. پلاسمید هضم شده نیز از روی ژل بریده و تخلیص گردید. پس از اتصال پلاسمید برش خورده و قطعه ۱۲۳ جفت بازی و ترانسفورم به سلول‌های مستعد، کلونی‌هایی بر روی محیط کشت رشد یافت که شامل کلونی‌های نوترکیب و غیرنوترکیب بودند.

غربالگری کلونی‌های واجد پلاسمید جدید بروش کلونی -

NaTx که یک پپتید سمی با سه پیوند دی‌سولفیدی در ساختار خود است، در این وکتور کلون‌سازی و بیان شد و سپس مورد تخلیص با روش IMAC قرار گرفت.



شکل ۲- نتیجه‌ی کلونی-PCR با پرایمرهای وکتور بر روی باکتری‌ها بر روی ژل ۲ درصد. C: کلونی کنترل و ۱ تا ۸ نمونه‌های کلونی. نمونه‌های ۱ تا ۴ باند مورد نظر را حدوداً ۳۰ نوکلئوتید کمتر از کنترل نشان می‌دهند (M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی)



شکل ۳- تایید تغییر پلاسمید نوترکیب با استفاده از الگوی هضم آنزیمی *Nco I* و *BamH I*: (الف) آنزیم *Nco I* و (ب) آنزیم *BamH I* شکل الف مربوط به پلاسمید نوترکیب است که بدلیل فقدان جایگاه برش *Nco I*، خطی نشده است و ستون ۲ مربوط به پلاسمید کنترل است که بصورت خطی دیده میشود و در شکل ب نیز ستون ۱ مربوط به پلاسمید جدید و ستون ۲ پلاسمید کنترل می‌باشد که در هر دو بدلیل حضور جایگاه برش *BamH I* بصورت خطی دیده می‌شود.

ترجمه و نیز تشکیل اجسام انکلوژن در بیان‌های بالا مشکل‌ساز است. از آنجایی که دوباره تاخوردن و ری‌فولد پروتئین‌های نامحلول در اجسام انکلوژن کار دشواری است، بنابراین تولید پروتئین نوترکیب محلول از اهمیت بسیار زیادی در بیوتکنولوژی برخوردار است. برای برطرف کردن این چالش‌های بهره‌وری، پپتیدهای فیوژن و برچسب‌های مختلف برای افزایش بازده بیان و تأثیر در حلالیت و ساختار پروتئین نوترکیب در وکتورهای بیانی گنج‌انیده شده است (۲۴).

اولیه می‌باشد ولی تعدادی از آن‌ها بدلیل عدم وجود این جایگاه در پلاسمید جدید، خطی نشدند و دارای هر ۳ باند تخلیص پلاسمید می‌باشد (شکل ۳ الف). برش با آنزیم *BamH I* برای بررسی پلاسمید نیز انجام شد (شکل ۳ ب).

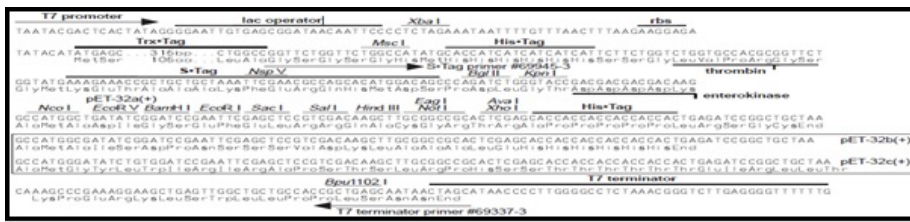
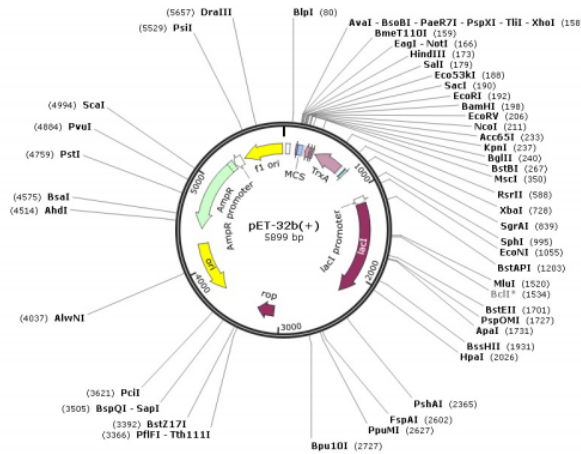
بررسی نتایج حاصل از آنالیز آنزیمی تایید کننده جایگزینی توالی جدید در پلاسمید pET32b است. همچنین نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای عمومی T7 پروموتور و T7 ترمیناتور تایید کننده نهایی پلاسمید جدید بود. شکل ۵ نشان‌دهنده تغییر اعمال شده در وکتور جدید در مقایسه با pET32b می‌باشد.

بررسی بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب: بمنظور بررسی بیان پروتئین نوترکیب در وکتور طراحی شده، پپتید-IOD

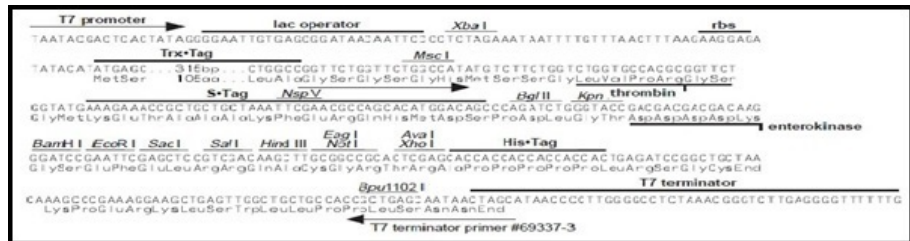
پپتید تخلیص شده مورد هضم آنزیمی با انتروکیناز قرار گرفت. برای جداسازی پپتید IOD-NaTx از تیوردوکسین حاصل از هضم، تخلیص مجدد با ستون کروماتوگرافی IMAC انجام شد که در نتیجه پپتید نوترکیب خالص بر روی ژل SDS-PAGE مشخص شد (شکل ۵).

بحث

سیستم بیانی پروکاریوتی برای تولید زیاد پروتئین‌های نوترکیب اولین انتخاب است اما بدلیل عدم تغییرات پس از



pET32b

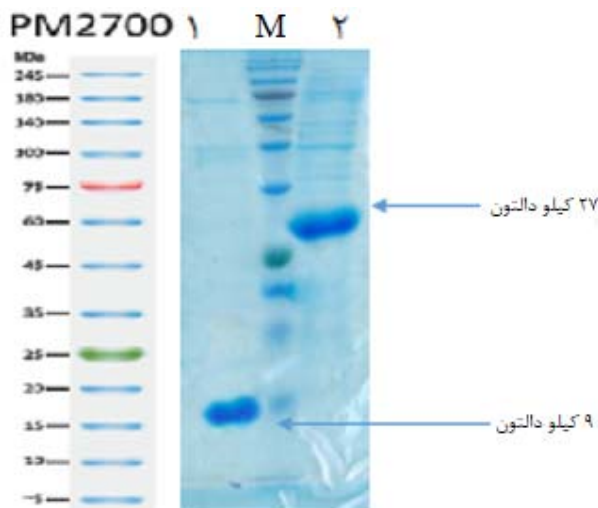


pET32b(+)-Rh

شکل ۴- شکل شماتیک وکتور pET32b(+) و توالی مربوط به کاست بیانی آن در مربع. توالی مربوط به کاست بیانی وکتور طراحی شده pET32b(+)-Rh در مربع پایین آمده است. همانطور که در شکل مشخص می‌باشد توالی His.tag اول و دو جایگاه برش *EcoRV* و *NcoI* حذف گردیده است.

یکی از بهترین برچسب‌های محلول سازی تیوردوکسین می- باشد. این برچسب برای کاهش تولید پروتئین بصورت نامحلول و شکل‌گیری باندهای دی‌سولفیدی و تشکیل ساختار سوم صحیح استفاده می‌شود (۱۴و۱۶). اکثر وکتورهای حاوی تیوردوکسین بصورت فیوژن با پپتید نوترکیب، یک تخلیص دومرحله‌ای برای جدا سازی تیوردوکسین نیاز دارند. مرحله اول معمولاً تخلیص پروتئین نوترکیب فیوژن با برچسب هیستیدینی و یا برچسب‌های دیگر با روش‌های IMAC یا کروماتوگرافی

تمایلی است و پس از این تخلیص، پپتیدهای فیوژن توسط پروتئازها بریده می‌شود (۱۲). در مرحله دوم تخلیص از روش‌های تخلیص پیچیده‌تر بر اساس اندازه و یا خواص دیگر پروتئین استفاده می‌شود که معمولاً هزینه‌بر خواهد بود. معروف‌ترین وکتور حاوی تیوردوکسین در وکتورهای بیانی pET-32 می‌باشد که از همین روش تخلیص استفاده می‌کند و بیان بهتری برای پروتئین نوترکیب موجب می‌شود (۱).



شکل ۵- تصویر تخلیص پروتئین IOD-NaTx. ستون ۲ مربوط به پروتئین فیوژن IOD-NaTx با تیوردوکسین و ستون ۱ پس از جداسازی آنتروکیناز و تخلیص مجدد پروتئین IOD-NaTx با ستون نیکل می باشد، M مارکر پروتئینی.

بدین منظور استفاده کرد که نیاز به دسترسی به دستگاه های مختلف برای پپتیدها با اندازه های مختلف را لازم می کند (۲۱). سایر روش های تخلیص تبادل یونی، تعامل آگریزی و کروماتوگرافی مبتنی بر اندازه بعنوان گام های کمکی برای تقویت بیشتر خلوص نمونه در صورت لزوم استفاده می شوند که منجر به هزینه های بیشتر می شوند (۲۰). تغییر در وکتورهای بیانی بدلائل مختلف برای افزایش راندمان تولید پپتید نوترکیب انجام شده است (۲۲). Liu و همکاران ساخت وکتورهای pET32α را برای اهداف مختلف بیانی مورد بررسی قرار دادند (۱۷). در مطالعه دیگر برای تولید مداوم و زیاد پروتئین نوترکیب وکتورهای بیانی بر اساس پلاسمید pIGDM1 توسعه یافت (۱۸). در این مطالعه نیز بهینه کردن پروسه تخلیص با تغییر وکتور مورد توجه قرار گرفت. بدلیل وجود دو توالی پلی هیستیدین در pET-32، بعد از بیان به هر دو انتهای کربوکسیل ژن مطلوب و تیوردوکسین دو توالی پلی هیستیدین می تواند اضافه شود که بعد از بیان در تخلیص نهایی پروتئین بروش کروماتوگرافی تمایلی، ایجاد اختلال می نماید. پس از برش پروتئین نوترکیب از تیوردوکسین در هر دو انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب و تیوردوکسین

جداسازی پپتید تیوردوکسین از محلول حاوی پروتئین نوترکیب مرحله نهایی تخلیص در استفاده از این وکتور است که یا با S-tag تیوردوکسین جدا می شود و یا با روش های کروماتوگرافی خاص مانند HPLC یا FPLC پروتئین نوترکیب تخلیص می شود. مشکلات استفاده از این روش ها بیشتر مربوط به گران قیمت بودن دستگاه، هزینه بالای مواد لازم برای تخلیص و شرایط خاص آن ها می باشد. در نهایت ماهیت نمونه و تلاش برای حفظ عملکرد فعال آن ها، به چالش منجر می شود. بعنوان مثال در کروماتوگرافی FPLC از آنجایی که ساختار سوم پروتئین برای عملکردش بسیار مهم می باشد، در طول تخلیص، پروتئین نباید تحت دما، فشار بالا، pH شدید یا حلال ها قرار بگیرد. چالش دیگر FPLC مربوط به اجزای دستگاه می باشد که در تماس با محلول های بافری نمکی فاز متحرک می باشد. دستگاه های کروماتوگرافی عموماً از فولاد ضد زنگ ساخته می شوند. نمک موجود در بافرها می تواند منجر به خوردگی فلز شود و از سوی دیگر، یون های فلزی موجود در فولاد ضد زنگ می توانند ساختار پروتئین را مختل سازند. همچنین از FPLC برای جداسازی پپتیدهای کوچک نمی توان استفاده کرد و باید از تکنیک HPLC

پژوهش‌های کلون‌سازی پرکاربرد بودن آنزیم *BamH I* در پروسه‌های کلون‌سازی بدلائل مختلف نظیر در دسترس بودن، ارزان‌تر بودن و سادگی کار در مقایسه با دیگر آنزیم‌های برش‌دهنده، نحوه تغییر وکتور بصورتی انجام شد که این آنزیم بعنوان اولین آنزیم در ناحیه آمینی پپتید نوترکیب قرار گرفته و اسید آمینه‌های اضافی موجود در pET-32 اصلی در این ناحیه قرار نمی‌گیرد. با حذف دو جایگاه برش آنزیم‌های *Nco I* و *EcoR V* از وکتور، بعد از استفاده از آنزیم انتروکیناز، در ابتدای ژن مطلوب، تنها دو اسید آمینه اضافه قرار می‌گیرد که احتمال تغییر در ساختار پروتئینی آن را کم کرده و انتهای آمینی ساده ایجاد خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از روش ساده و سریع کلونینگ برای دسترسی به یک پلاسمید جدید pET32b(+)Rh با استفاده از پلاسمیدهای تجاری موجود، استفاده شد. این وکتور که دارای پپتید فیوژن تیوردوکسین می باشد باعث افزایش میزان حلالیت پروتئین نوترکیب می‌شود. همچنین استفاده از pET32b(+)Rh از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد چرا که نیاز بروش‌های تخلیص پرهزینه در مرحله دوم تخلیص را از بین می‌برد. وکتور جدید می‌تواند در تولید کم هزینه‌تر پروتئین‌های نوترکیب که دارای باندهای دی‌سولفیدی هستند نظیر اکثر پروتئین‌های یوکاریوتی استفاده شود و پروسه تخلیص نهایی را با استفاده از ستون نیکل ساده‌تر کند.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله نویسندگان مقاله از دانشگاه شهرکرد بدلیل حمایت مالی و معنوی برای انجام این پژوهش تشکر می‌کنند.

جداشده، تگ هیستیدینی وجود خواهد داشت و امکان استفاده از ستون نیکل برای جدا کردن پروتئین نوترکیب وجود ندارد. بنابراین در این پژوهش، پلاسمید تغییر یافته pET32b(+)Rh بمنظور تسهیل فرایند خالص‌سازی ساخته شد. در این وکتور توالی پلی هیستیدین انتهای کربوکسیل تیوردوکسین، حذف شده و در نتیجه پروتئین با یک توالی پلی هیستیدین منفرد در انتهای کربوکسیل، بیان می‌شود که فرایند تخلیص آن ساده می‌باشد و با توجه به مطالعات زیاد انجام گرفته این توالی معمولاً تداخلی در عملکرد پروتئین ایجاد نخواهد کرد (۶). حضور یک توالی هیستیدین در وکتور pET32b(+)Rh امکان خالص‌سازی کم هزینه تر محصول را در یک پروسه دو مرحله‌ای با استفاده از ستون‌های تمایلی نیکل فراهم کرد و نیاز به روش‌های کروماتوگرافی دیگر را از بین برد. در اینجا برای بررسی عملکرد وکتور از پپتید سمی IOD-NaTx با سه پیوند دی‌سولفیدی در ساختار استفاده شد که در بیان بالا در باکتری فولدینگ نادرست داشته و تشکیل اجسام انکلوژن می‌دهد. بیان IOD-NaTx در وکتور pET32b(+)Rh بدلیل ترکیب فیوژن تیوردوکسین با آن، در فاز محلول دیده شد، همچنین اتصال تیوردوکسین به آن مانع از اثر سمی IOD-NaTx بر میزبان شد. پس از تخلیص با توالی هیستیدینی در ستون نیکل در مرحله اول، هضم با انتروکیناز و جداسازی ناحیه تیوردوکسین از آن، انجام شد و سپس تخلیص مجدد با ستون نیکل برای جداسازی پپتید از تیوردوکسین صورت گرفت.

تغییر دیگری که در وکتور جدید اعمال شد حذف دو جایگاه برش آنزیم‌های *Nco I* و *EcoR V* از سایت کلون سازی بود که بدین صورت آنزیم *BamH I* بعنوان اولین آنزیم محل کلون سازی قرار می‌گرفت. با توجه به

منابع

شده از آنتی ژن های انگل لیسمانیا اینفانتوم. دوماهنامه طب جنوب. ۲۳ (۲): ۱۵۲-۱۴۳.

۱ طاهرزاده، م، فولادوند، م، کاظمی، ب. ۱۳۹۹. مقایسه وکتورهای بیانی pET32a و pET25b در بیان توالی پلی اپتوبی سنتز

- وارسته درخشان گیاه لوبیا و تعیین توالی ژن کدکننده آن. زیست شناسی ایران. ۱۷ (۲): ۱۳۷-۱۲۶
- 3 Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., & Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology letters*, 29(5), 677-684.
 - 4 Bogomolovas, J., Simon, B., Sattler, M., & Stier, G. (2009). Screening of fusion partners for high yield expression and purification of bioactive viscotoxins. *Protein expression and purification*, 64(1), 16-23.
 - 5 Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Methods in enzymology* (Vol. 326, pp. 245-254). Academic Press.
 - 6 Bucher, M. H., Evdokimov, A. G., & Waugh, D. S. (2002). Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 58(3), 392-397.
 - 7 Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., & Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification*, 43(1), 1-9.
 - 8 Dyson, M. R., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Perera, R. L., & McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC biotechnology*, 4(1), 32.
 - 9 Ford, C. F., Suominen, I., & Glatz, C. E. (1991). Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein expression and purification*, 2(2-3), 95-107.
 - 10 Hamedifar, H., Salamat, F., Saffarion, M., Ghiasi, M., Hosseini, A., Lahiji, H. & Mahboudi, F. (2013). A novel approach for high level expression of soluble recombinant human parathyroid hormone (rhPTH 1-34) in *Escherichia coli*. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 5(3), 193.
 - 11 Hedhammar, M., Gräslund, T., & Hober, S. (2005). Protein engineering strategies for selective protein purification. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 28(11), 1315-1325.
 - ۲ حسین زاده، ا، زمانی، م، مطلبی، م. ۱۳۸۳. مطالعه اثر مهارکنندگی پروتئین های ممانعت کننده فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز در
 - 12 Kim, D. S., Kim, S. W., Song, J. M., Kim, S. Y., & Kwon, K. C. (2019). A new prokaryotic expression vector for the expression of antimicrobial peptide abaecin using SUMO fusion tag. *BMC biotechnology*, 19(1), 13.
 - 13 Kyratsous, C. A., Silverstein, S. J., DeLong, C. R., & Panagiotidis, C. A. (2009). Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 440(1-2), 9-15.
 - 14 LaVallie, E. R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E. A., Collins-Racie, L. A., & McCoy, J. M. (2000). Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology*, 326, 322-340.
 - 15 Lax, R. (2010). The future of peptide development in the pharmaceutical industry. *PharManufacturing: The international peptide review*, 2, 10-15.
 - 16 Liu, H., & Naismith, J. H. (2009). A simple and efficient expression and purification system using two newly constructed vectors. *Protein expression and purification*, 63(2), 102-111.
 - 17 Liu, Z. Q., & Yang, P. C. (2012). Construction of pET-32 α (+) vector for protein expression and purification. *North American journal of medical sciences*, 4(12), 651.
 - 18 Mikiewicz, D., Plucieniczak, A., Bierczynska-Krzysik, A., Skowronek, A., & Wegrzyn, G. (2019). Novel expression vectors based on the pIGDM1 plasmid. *Molecular biotechnology*, 61(10), 763-773.
 - 19 Rai, M., & Padh, H. (2001). Expression systems for production of heterologous proteins. *Current science*, 1121-1128.
 - 20 Raran-Kurussi, S., & Waugh, D. S. (2016). A dual protease approach for expression and affinity purification of recombinant proteins. *Analytical biochemistry*, 504, 30-37.
 - 21 Runde S., (2016). FPLC versus Analytical HPLC: Two Methods, One Origin, Many Differences, *The Column*, 12(15): 12-16.
 - 22 Soleyman M. R., Khalili M., Soleiman Meiguni A. R., Baazm M., (2019) Optimization of PET Expression Vector for Fusion of Recombinant Protein and Elastin-Like Polypeptide

- Biopolymer, *Journal of Arak university of medical science*, 22 (5): 44-55
- 23 Terpe, K., (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(5), pp.523-533.
- 24 Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology journal*, 7(5), 620-634.

Design and construction of pET32b(+) Rh expression vector based on pET system to facilitate purification

Rezaei Younaki L., Ayat H. and Ahadi A.M.

Dept. of Genetics, Faculty of basic science, Shahrekord University, I.R. of Iran

Abstract

Purification of proteins is an essential step to determining their function and structure. Proteins are often combined with a tag to facilitate purification processes. The aim of this study was to design and construct pET32b(+)Rh vector based on pET-32b(+) expression vector to simplify purification of recombinant proteins only by Ni²⁺ column. The primer design was performed taking into account the targeted changes. Using PCR reaction, the desired fragment was amplified and cloned in pET-32b(+) vector. The recombinant vector was transformed into *Escherichia coli*. After screening by colony-PCR and restriction enzyme analysis, sequencing was performed. Vector function study, was performed by investigating the expression and purification of a toxic peptide IOD-NaTx with disulfide bonds in pET32b(+)Rh vector. In new pET32b(+)Rh vector, the histidine tag site at the C- terminal of thioredoxin was removed and the N-terminal of the recombinant peptide would not change much if *BamH* I is used for cloning. To evaluate the function of the vector, the soluble expression of a toxic peptide was successfully determined and two-step purification using IMAC method resulted into the pure recombinant peptide. In this study, the simple and fast method of cloning was used to construct a modified expression vector using a commercial plasmid. The new pET32b(+)Rh vector can be used to express complex peptides with disulfide bonds fused with thioredoxin. The recombinant protein could be purified simply without need to costly methods such as HPLC and FPLC or other chromatography columns.

Keywords: pET-32, pET32b(+) Rh, recombinant protein purification, Thioredoxin, histidine tag