

بهینه‌سازی رمزه و مقایسه‌ی بیان فاکتوررشد اکتیوین A به صورت نوترکیب در میزبان‌های باکتریایی BL21(DE3) Rosetta gami و BL21(DE3)pLysS

زهره حاجی حسن^{1*}، سید کاظم حسینی²، علیرضا زمردی پور³

1- استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران

3- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

* تهران، صندوق پستی 14395-1561

hajihasan@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/4/4 پذیرش مقاله: 94/9/23)

چکیده- پروتئین اکتیوین A متشکل از دو دایمر β A به صورت یک پری-پرو-پروتئین با طول 426 آمینواسید سنتز می‌شود که پس از حذف بخش‌های پری و پرو، پروتئین بالغ با طول 116 آمینواسید حاصل می‌شود. این پروتئین که اولین بار از مایع فولیکولی گوسفند به عنوان یک محرک قدرتمند برای تولید هورمون FSH جداسازی شد، دارای عملکردهای گوناگونی مثل حفظ و بقای سلول‌های عصبی، آپوپتوز، رشد و تمایز در انسان می‌باشد. از آنجا که پروتئین اکتیوین A دارای کاربردهای متعددی در زمینه پزشکی مانند تمایز سلول‌های بنیادی، ترمیم زخم، درمان بیماری‌های تحلیل عصبی مانند آلزایمر و ... است برای اولین بار در این تحقیق در سه سویه‌ی متفاوت باکتری *E.coli* بیان شد. از آنجا که این پروتئین در ساختار فعال و عملکردی خود دارای پیوندهای دی‌سولفیدی است، محیط احیا کننده‌ی سیتوپلاسم *E.coli* برای بیان آن مناسب نیست لذا، محیط اکسید کننده‌ی پری‌پلاسم برای تولید آن همراه با تاخوردگی صحیح مورد توجه قرار گرفت. در این تحقیق، cDNA ژن اکتیوین A انسانی بدست آمده از بانک اطلاعاتی NCBI پس از بهینه‌سازی رمزه به همراه پپتید نشانه تغییر یافته آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران در وکتور بیانی pET21b(+)، ساب کلون و سپس به روش ترنسفورماسیون به سویه‌های BL21(DE3)pLysS، BL21(DE3)Rosetta gami و BL21(DE3) انتقال یافت. پس از بیان همزمان با استفاده از القاگر IPTG، محتوای پروتئینی استخراج شده از هر سه سویه با استفاده از تکنیک‌های SDS-PAGE، دات بلات و وسترن بلات با یکدیگر مقایسه گردید. نتایج نشان دهنده بیان در هر سه سویه باکتریایی بویژه در Rosetta gami و DE3 می‌باشد.

کلیدواژگان: اکتیوین A، پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز، *E.coli*.

1- مقدمه

خانواده‌ی پروتئین‌های اکتیوین یکی از اعضای ابر خانواده فاکتورهای رشد تغییر شکل دهنده بتا ($TGF-\beta$) محسوب می‌شود [1]. این پروتئین‌ها از زیر واحدهای β همودایمر یا هتروداایمر ساخته شده‌اند که توسط پیوندهای دی سولفیدی به یکدیگر متصل می‌شوند. چهار زیر واحد β در انسان شناسایی شده که عبارتند از: βA , βB , βC و βE [2]. پروتئین اکتیوین A از دو دایمر βA به صورت همودایمر تشکیل شده است که به صورت یک پری-پروتئین با طول 426 آمینواسید سنتز می‌شود، بخش‌های پری و پرویی آن طی هضم آنزیمی جدا شده و پروتئین بالغ با طول 116 آمینواسید حاصل می‌شود. این پروتئین در سال 1986 از مایع فولیکولی گوسفند به عنوان یک محرک قدرتمند برای تولید هورمون FSH جداسازی و تخلیص شد [3,4]. پروتئین اکتیوین A با اتصال به گیرنده‌های خود در سطح غشاء سلولی و در نتیجه تنظیم بیان ژن‌های مختلف، در فرایندهای گوناگونی از جمله رشد، تمایز، التهاب، حفظ و بقای سلول‌های عصبی و غیره دارای نقش است [5]. از آنجا که پروتئین اکتیوین A دارای کاربردهای متعددی در زمینه پزشکی مانند تمایز سلول‌های بنیادی [6-8] ترمیم زخم [9]، درمان بیماری‌های تحلیل عصبی مانند آلزایمر [10] و ... است تولید آن به ویژه به صورت نوترکیب در سال‌های اخیر مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است؛ بطوری که تا به امروز این پروتئین در سلول‌های یوکاریوتی مثل CHO [11] و مخمر پیکیا پاستوریس [12] بیان و تولید شده است.

در بررسی حاضر cDNA ژن اکتیوین A انسانی پس از بهینه‌سازی رمزه در وکتور بیانی pET21b(+) کلون و سپس پروتئین مذکور در سه سویه‌ی بیانی Rosetta DE3, gami و PlysS از باکتری *E.coli* بیان شد. شایان ذکر است که به منظور تشکیل صحیح پیوندهای دی

سولفیدی و هدایت پروتئین تولیدی به فضای پری پلاسمی باکتری، از پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران تغییر یافته برای اولین بار در این تحقیق استفاده شد.

2- مواد استفاده شده و روش کار

2-1- سویه‌های باکتریایی و وکتور pET21b(+)

وکتور pET21b(+) به عنوان وکتور بیانی و سویه‌های BL21(DE3) Rosseta gami، BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3) به عنوان میزبان‌های باکتریایی از شرکت Novagene آمریکا خریداری شدند. هر سه سویه دارای ژن RNA پلیمراز T7 قابل القاء با IPTG (isopropyl thio- β -D-galactoside) می‌باشند.

2-2- طراحی پپتید نشانه مناسب و بهینه‌سازی توالی

cDNA ژن اکتیوین A انسانی

از پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران (Accession No. AY842512) که در آن یک اسید آمینه متیونین بین اسید آمینه‌های شماره 13 و 14 وارد شد، استفاده گردید. توالی cDNA ژن پرواکتیوین A از بانک اطلاعاتی NCBI (Accession No. NM_002192) استخراج شد. برنامه SignalP به منظور پیش‌بینی مکان برش پپتید نشانه اصلاح شده و برنامه rare codon analysis برای سازگار کردن کدون‌های اکتیوین A انسانی با باکتری *E.coli* استفاده شدند. برنامه نرم‌افزاری RNA Structure به منظور پیش‌بینی ساختار ثانویه mRNA حاصله و حذف ساختارهای حلقه - ساقه در قسمت انتهای 5' استفاده گردید. پس از جایگزینی کدون‌های نادر موجود با کدون‌های ترجیحی و مورد استفاده در *E.coli*، بهینه‌سازی توزیع درصد کدون‌ها و محتوای GC نیز انجام شد.

2-3- کلونینگ و انجام ترنسفورماسیون در سه سویه از**باکتری *E.coli***

توالی پپتید نشانه و اکتیوین A انسانی توسط شرکت شاین جین (کشور چین) سنتز و با استفاده از آنزیم‌های محدودالایثر NdeI و EcoRI در وکتور pET21b(+) ساب کلون گردید [13]. وکتور pET21b::h-activin A با استفاده از روش ترنسفورماسیون شوک حرارتی در حضور کلرید کلسیم به صورت جداگانه به سه سویه‌ی مذکور انتقال یافت و سلول‌ها در محیط LB (Luria-Bertani medium) دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت 100 mg/ml کشت و غربال‌گری شدند [13]. محیط کشت و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین از شرکت سیگما¹ آمریکا خریداری شدند. سپس برای تأیید صحت کلونینگ، استخراج پلاسمید از هر یک از سویه‌های باکتریایی صورت گرفت و پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از پرایمر T7 terminator توسط شرکت ژن فناوریان توالی‌یابی گردیدند.

2-4- بیان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A انسانی در سه**سویه‌ی BL21(DE3)pLysS، BL21(DE3) و****BL21(DE3) Rosetta gami**

میزان 1% از کشت شبانه‌ی هر یک از سویه‌های باکتریایی ناقل وکتور pET21b::h-activin A در محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و دمای 37 درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به OD 0/5-0/7 در طول موج 600 نانومتر کشت داده شد. بیان در شرایط بهینه با استفاده از غلظت 1 میلی‌مولار IPTG (خریداری شده از شرکت سیگمای آمریکا) و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 ساعت در هریک از سویه‌ها انجام شد. پس از اتمام مدت زمان بیان، سلول‌ها به مدت 15 دقیقه در 3500 rpm و دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و جمع‌آوری شدند. در

نهایت، کل محتوای پروتئینی تولید شده توسط افزودن اوره 8 مولار (خریداری شده از شرکت مرک² آلمان) استخراج گردید. بدین منظور پس از افزودن اوره به رسوب سلولی، سلول‌ها توسط حمام اولتراسونیک شکسته شده و سوسپانسیون سلولی حاصله در 37 درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه انکوبه گردید. پس از سپری شدن مدت زمان انکوباسیون، سوسپانسیون حاصل در 13000rpm به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول رویی حاوی کل محتوای پروتئینی باکتری است که برای آنالیزهای بعدی نگاهداری شد.

2-5- بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از ژل**SDS-PAGE**

به منظور الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی استخراج شده از روش لاملی و ژل SDS-PAGE 12 درصد استفاده شد. بدین ترتیب که در هر یک از چاهک‌های ژل الکتروفورز مقدار مساوی از نمونه‌های پروتئینی استخراج شده در مرحله قبل (20 میکرولیتر نمونه پروتئینی و 20 میکرولیتر بافر نمونه 2x حاوی تریس بازی- گلیسرول- مرکاپتواتانول- بروموفنل بلو- SDS) لود شد. پس از اتمام مدت زمان الکتروفورز، رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو R250 (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) انجام شد [14].

2-6- بررسی بیان پروتئین نو ترکیب با استفاده از روش**دات بلات و وسترن بلات**

به منظور بررسی اختصاصی‌تر، مقدار مساوی از نمونه‌های پروتئینی استخراج شده (از هر یک 8 ماکرولیتر) روی کاغذ نیتروسلولز (خریداری شده از شرکت میلی‌پور³

2. Merek
3. Millipore

1. Sigma

آمریکا) لکه‌گذاری شدند. سپس نقاط غیر اختصاصی موجود بر روی کاغذ توسط بافر بلوکه کننده TBS-T (Tris-HCl 50 میلی‌مولار، NaCl 150 میلی‌مولار و 0/05 درصد Tween20) حاوی 3% w/v ژلاتین بلوکه گردیدند. پس از انجام سه مرحله شستشو با بافر TBS-T، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد اکتیوین A انسانی (خریداری شده از شرکت آبکام¹) با رقت 1:1000 و آنتی بادی ثانویه متصل به HRP (خریداری شده از شرکت سیگما آمریکا) با رقت 1:2000 در بافر TBS-T حاوی 1% w/v لژلاتین مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت، کاغذ با سوبسترای رنگی DAB (خریداری شده از شرکت بیوبیسک² کانادا) در حضور پر اکسید هیدروژن به‌عنوان سوبسترای آنزیم در محیط تاریک انکوبه شد.

به منظور انجام وسترن بلات، نمونه‌های پروتئینی تفکیک شده از سویه DE3 با استفاده از ژل الکتروفورز به کمک بافر انتقال (192 میلی‌مولار گلیسین، 25 میلی‌مولار تریس و 15 درصد متانول) در جریان 200 میلی‌آمپر به کاغذ نیتروسولوز منتقل شدند [15]. پس از اتمام مرحله انتقال، مراحل بلاک کردن، شستشو و افزودن آنتی‌بادی‌ها و سوبسترا دقیقاً مطابق موارد توضیح داده شده برای دات بلات انجام شد.

3- نتایج و بحث

3-1- بهینه‌سازی توالی cDNA ژن اکتیوین A انسانی و پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران

همان‌طور که ذکر شد پروتئین اکتیوین A دارای پیوندهای دی‌سولفیدی در ساختار خود است، لذا تولید پری پلاسمی آن ارجح می‌باشد. به منظور ترشح به فضای پری پلاسمی پپتید نشانه استفاده شده در این تحقیق، پپتید

نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران با اصلاحات جزئی بود که برای اولین بار به منظور ترشح یک پروتئین نو ترکیب استفاده می‌شود. از آنجا که افزایش آبگریزی قسمت میانی پپتید نشانه، جهت‌گیری آن را به سمت غشاء و نهایتاً ارزش ترشحی آن را افزایش می‌دهد یک اسید آمینه متیونین بین اسید آمینه‌های شماره 13 و 14 اضافه گردید. شکل 1 توالی اسید آمینه‌های پپتید نشانه استفاده شده و متیونین وارد شده را نشان می‌دهد. به منظور اطمینان از برش پپتید نشانه حاصل توسط آنزیم سیگنال پپتیداز باکتری *E.coli*، از برنامه SignalP استفاده گردید. همان‌طور که شکل 2 نشان می‌دهد مکان برش در هر دو پپتید نشانه (قبل از وارد شدن متیونین و پس از اضافه شدن متیونین) بین اسید آمینه آلانین انتهایی از پپتید نشانه و اسید آمینه سرین می‌باشد.

ژن‌های هترولوگ از جمله ژن اکتیوین A انسانی دارای کدون‌هایی هستند که کمتر توسط باکتری‌ها استفاده می‌شوند لذا برای جلوگیری از کاهش کارایی فرایند ترجمه، کدون‌های نادر با کدون‌هایی که برای باکتری *E.coli* بیشترین تمایل استفاده را دارند، جایگزین شدند زیرا در این میزبان، tRNA های شارژ شده با آمینو اسید، برای آن کدون‌ها فراوان‌تر می‌باشند (شکل 3).

همچنین برای افزودن نیمه عمر mRNA، محتوای GC و پیک‌های نامطلوب بهینه‌سازی شدند و ساختارهای ساقه-حلقه که کارایی اتصال ریبوزوم و پایداری mRNA را تحت تأثیر قرار می‌دهند، شکسته شدند (شکل 4).

MKQQKRLYARLLPLLALILLLPHSAAMA

MKQQKRLYARLLPMLLALILLLPHSAAMA

شکل 1 توالی اسید آمینه‌های پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران قبل از اصلاح (بالا) و پس از اضافه شدن یک اسید آمینه متیونین (پایین).

1. Abcam

2. Biobasic

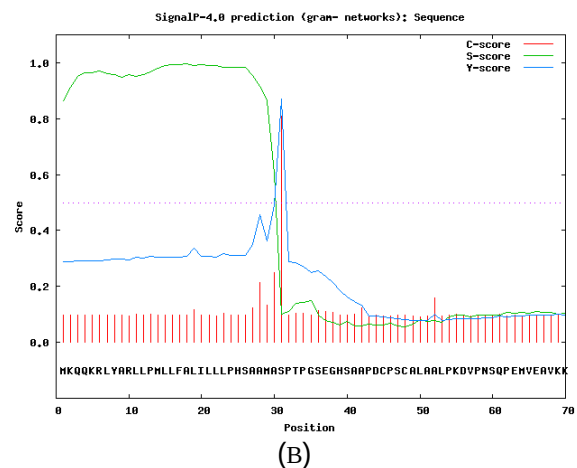
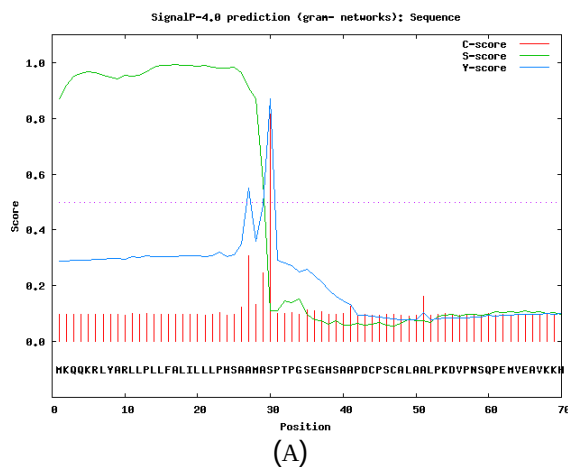
بازهای تغییر داده شده به رنگ قرمز در شکل نشان داده شده‌اند.

3-2- ترنسفورماسیون وکتور حامل ژن اکتیوین A به درون سلول‌های باکتری و تأیید صحت کلونینگ

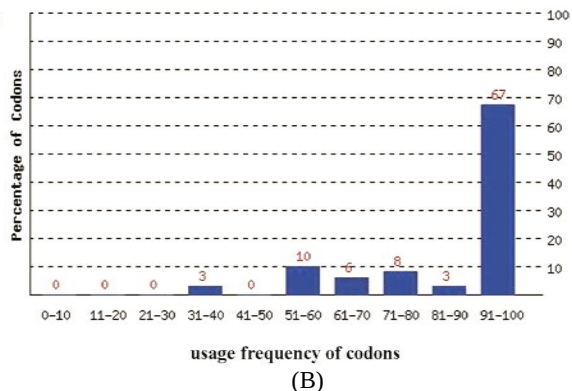
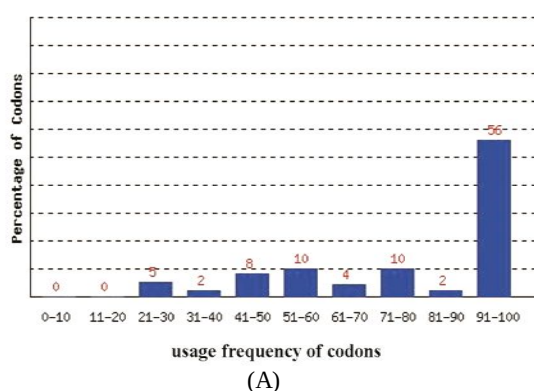
به منظور دست یافتن به بهترین نتیجه و بیشترین میزان بیان در تحقیق حاضر از سه سویه‌ی باکتری *E.coli* بطور هم‌زمان و مقایسه‌ای استفاده شد.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود در 30 نوکلئوتید ابتدایی که مکان شروع اتصال به ریبوزوم و شروع ترجمه است ساختار ساقه دیده نمی‌شود.

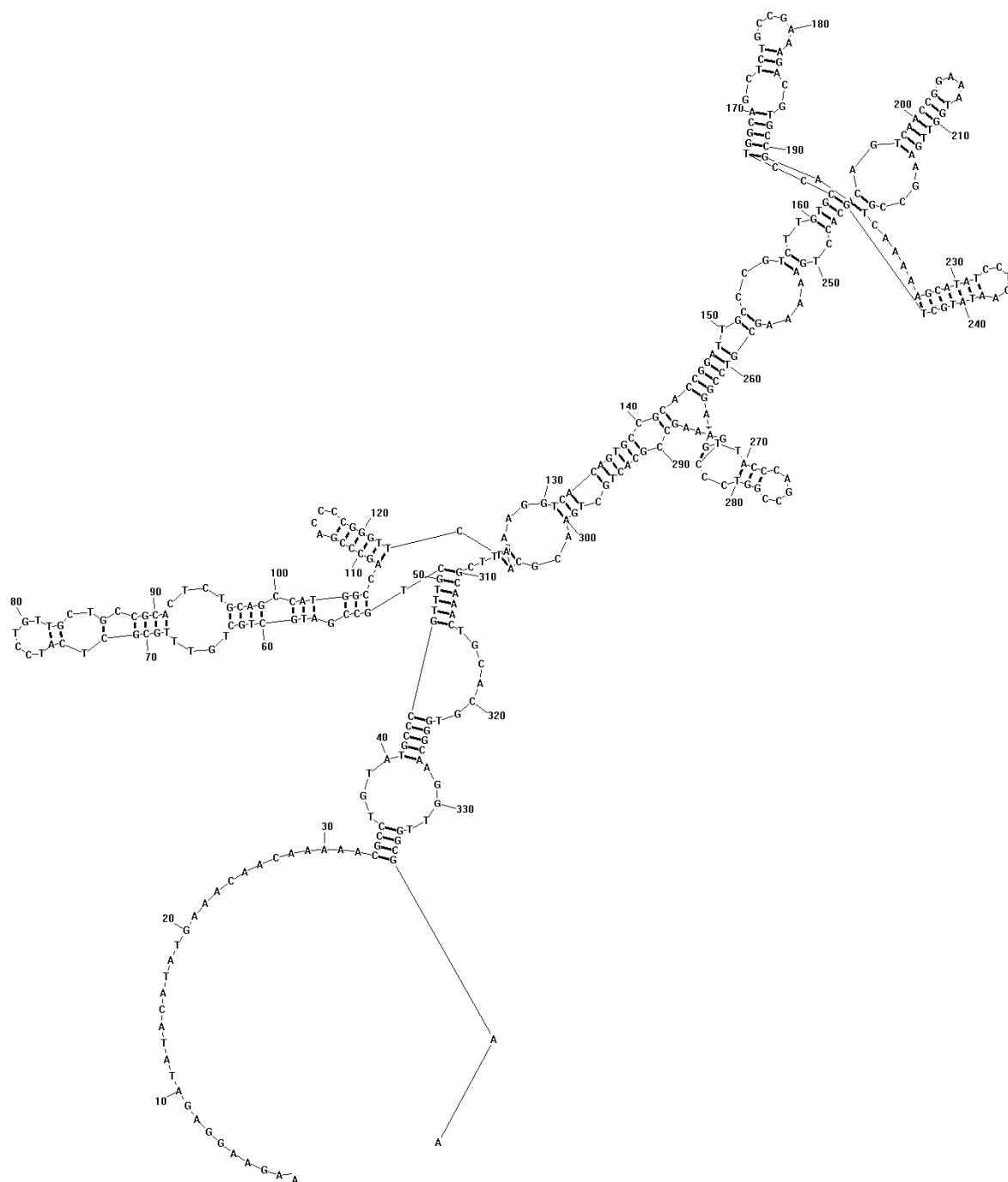
بهینه‌سازی کدون، بهینه‌سازی محتوای GC و شکست ساختارهای ساقه در قسمت‌های ابتدایی مولکول mRNA حاصل به منظور بالابردن کارایی ترجمه و میزان بیان انجام شد که نتیجه نهایی بهینه‌سازی در شکل 5 دیده می‌شود. شکل 5 مقایسه‌ای از توالی بهینه شده را با قبل از بهینه‌سازی نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود



شکل 2 پیش‌بینی محل برش پپتید نشانه آنزیم آلفا آمیلاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بومی ایران قبل از اصلاح (A) و پس از اضافه شدن یک اسید آمینه متیونین (B) با استفاده از نرم‌افزار signal p.



شکل 3 توزیع درصد کدون‌ها. برای کدون‌ی که در مورد یک آمینو اسید بیشترین فراوانی استفاده را در ارگانیزم بیانی مورد نظر دارد، مقدار 100 در نظر گرفته شده است. قسمت‌های (A) و (B) به ترتیب، قبل و بعد از بهینه‌سازی را نشان می‌دهند.



شکل 4 ساختار mRNA حاصل از A اکتیوین - پپتید نشانه::pET 21b، ترسیم شده با نرم‌افزار RNA structure

DE3، دارای پلاسمید pLysS می‌باشد که لیزوزیم T7 را که مهار کننده طبیعی RNA پلی‌مراز T7 است را کد می‌کند و بنابراین در این سویه بیان نشتی در عدم حضور القاگر وجود ندارد.

لازم به ذکر است که هر یک از این سویه‌ها تفاوت‌ها و البته مزایایی را نسبت به یکدیگر دارا می‌باشند. بطور مثال سویه BL21(DE3)، لیزوزن‌های پروفاز لامبدا هستند و دارای RNA پلی‌مراز T7 قابل القاء با IPTG می‌باشند. سویه BL21(DE3)pLysS علاوه بر تمام ویژگی‌های

Optimized 7 AAACAACAAAAACGCTGTACGCCGTCTGCTGCCGATGCTGCTGTTTCGCTCTGATTCTG
 Original 7 AAACAACAAAAACGCTTGTATGCCGTTTGTCTGCCGATGCTGCTGTTTTCGCTCTATCCTG
 Optimized 67 CTGCTGCCGCTATAGCGCCGCAATGGCTTCTCCGACCCGGTCTGAAGGTCACAGTGCC
 Original 67 TTGCTGCCGCACTCTGCAGCATGGCCTCCCGACCCAGGTTCCGAGGGCCACAGCGG
 Optimized 127 GCACCGGATTGCGCCGTCTGTGCCCTGGCAGCTCTGCCGAAAACGCTGCCGAACAGTCAA
 Original 127 GCGCCGACTGTCCGTCTGTGCGCTGGCCGCCCTCCAAAAGATGTACCGAACTCTCAG
 Optimized 187 CCGGAAATGTTGAAGCCGTCAAAAAGCATATCCTGAATATGCTGCACCTGAAAAAGCGT
 Original 187 CCAGAGATGGTGGAGGCGGTCAAAAAGCACATTTTAAACATGCTGCACCTGAAAAAGCGT
 Optimized 247 CCGGATGTTACCCAGCCGTGCCGAAAACGCGCACTGTGAACGCAATTCGCAAACTGCAC
 Original 247 CCGGATGTCACCCAGCCGTACCGAAAAGCGCGCTTCTGAACGCGATCAGAAAACTTCAT
 Optimized 307 GTGGGCAAGGTTGGCGAAAACGGTACGTTGAAATCGAAGATGACATCGGCCGTGCGGCC
 Original 307 GTGGGCAAGTCCGGGAGAACGGTTATGTGGAGATTGAGGATGACATTTGGTCTGTCGCA
 Optimized 367 GAAATGAACGAACGTGATGAAAGACCTCCGAAATATCACGTTTCCGGAATCAGGCACC
 Original 367 GAAATGAATGAATTTATGGAGCAGACCTCGGAGATCATCACGTTTCCGAGTCAGGTACA
 Optimized 427 GCGCGTAAAAACGCTGCATTTTCAAATCAGCAAGGAAGTTCTGATCTGAGTGTGTTGAA
 Original 427 GCGCGTAAAAACGCTGCACCTTCGAGATTTCAAAGGAAGGCAGTGACCTGTCAAGTGGTGGAG
 Optimized 487 CGCGCAGAAAGTGTGGCTGTTTCTGAAAGTTCCGAAGGCTAATCGTACCCGCACGAAAGTG
 Original 487 CGTGCAGAAAGTCTGGCTCTTCTGAAAGTCCGAAAGCCAAACGTAACCCGCAACCAAGTC
 Optimized 547 ACCATTCGTCTGTTCCAGCAACAGAAACACCCGCAAGGCTCACTGGATACGGGTGAAGAA
 Original 547 ACCATCCGCCTCTTCCAGCAGCAGAAACACCCGCAAGGCGAGCTTGGACACAGGCGAAGAG
 Optimized 607 GCAGAAAGGTTGGCCTGAAAAGGTGAACGTTCCGAAGTCTGCTGTCAAAAAAGTCTGT
 Original 607 GCGAGGAAAGTGGGCTTAAAGGCGAGCGTAGTGAAGTGTGCTCTCTGAGGAGTAGTA
 Optimized 667 GACGCTCGCAAGAGTACCTGGCATGCTTTTCTGTGAGCTCTAGTATCAACGCTCTGCTG
 Original 667 GACGCTCGCAAAAGCACCTGGCATGCTTTCCCTGTCTCCAGCAGCATCCAGCGCTTGTCTG
 Optimized 727 GATCAGGGCAAACTCTCACTGGACGTTCCGATTGCGTGCAGCAATGTGAGGAATCCGGC
 Original 727 GACAGGGCAAAAGCTCCCTGGACGTTTCTGATTGCTGTGAGCAGTGCAGGAGAGTGGC
 Optimized 787 GCCTCACTGGTCTGCTGGGCAAGAAAAAGAAAAAGAAAGAGAGGCGAAGGTAAGAAAG
 Original 787 GCCAGCTTGGTTCTCCTGGGCAAAAGAAAAAGAAAGAGAGGCGAAGGTAAGAAAG
 Optimized 847 AAGGGCGGTGGCGAAGGTGGCGCAGGCGCTGATGAAGAAAGGAACAATCGCATCGTCCG
 Original 847 AAAGGCGGTGGTGAAGGTGGCGCAGGTGCAGATGAGGAAAAAGAGCAGTCCGACCGCTCT
 Optimized 907 TTTCTGATGCTGCAAGCGCGCCAGAGCGAAGATCATCCGCACATTGAAGGTGCTGGCCTG
 Original 907 TTCCTCATGCTGCAGGCGCCGCGAGTCTGAAGACCACCTCATATTGAAGGCCGTGGCTTG
 Optimized 967 GAATGCGACGGCAAGTCAACATCTGCTGTAAAAAGCAGTTTTTCTGTCTTCAAAGAT
 Original 967 GAGTGTGATGCGCAAGTCAACATCTGCTGTGAAGAAACAGTTCTTTGCTGCTTCAAAGAC
 Optimized 1027 ATTGGTTGGAACTGACTGGATTATCGCACCGAGCGGCTATCACGCTAATTACTGCGAGGGT
 Original 1027 ATCGGCTGGAATGACTGGATCATTGCTCCGCTGGCTATCATGCCAACTACTGCGAGGGT
 Optimized 1087 GAATGTCGCTCGCATATCGCGGGCACCAGCGGTTCCGAGCCTGTGCTTTTATAGCAGGGT
 Original 1087 GAGTGCCCGAGCCATATTGCAGGCAAGTCCGCTCCTCACTGTCTTCCACTCAACAGTC
 Optimized 1147 ATTAACCACTACCGTATGCGCGGCCATTCTCCGTTCCGCAATCTGAAAAGTTGCTGTGTT
 Original 1147 ATCAACCACTACCGCATGCGTGGCCATAGCCGTTTCCCAACTCAAATCGTGTGCTGTG
 Optimized 1207 CCGACCAAGCTGCGCCGATGAGCATGCTGTATTACGATGACGGTCAAGAACATTATTTAA
 Original 1207 CCGACCAACTGCGTCCGATGTCATGTTGTACTATGATGATGGTCAAAACATCATTAA
 Optimized 1267 AAGGACATCCAGAACATGATCGTTGAAGAAATGCGGCTGCTCGTAA
 Original 1267 AAGGACATTCAGAACATGATCGTGGAGGAGTGTGGCTGCTCATAA

شکل 5 توالی پپتید نشانه و اکتوین A انسانی پس از انجام بهینه‌سازی در مقایسه با حالت اولیه.

بازهای تغییر داده شده به رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

شده است.

3-3- بررسی بیان پروتئین نو ترکیب اکتوین A انسانی

در میزبان‌های BL21(DE3)pLysS، Rosetta gami

BL21(DE3) و BL21(DE3) پس از القا با غلظت 1

میلی مولار IPTG با استفاده از ژل SDS-PAGE، دات

بلات و وسترن بلات

پس از بیان پروتئین تحت شرایط ذکر شده در قسمت

روش‌ها و استخراج کل محتوای پروتئینی، مقدار مساوی

از هر یک از نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE 12 درصد

سویه BL21(DE3)Rosseta gami دارای جهش در ژن

TrxB/gor می‌باشد که می‌تواند منجر به تشکیل صحیح

پیوندهای دی‌سولفیدی گردد. همچنین این سویه tRNAهای

مربوط به کدون‌های نادر در E.coli را نیز دارا است.

ترنسفورماسیون وکتور به هر یک از سه سویه باکتریایی،

مطابق روش ذکر شده در قسمت روش‌ها انجام شد. به

منظور تأیید حضور قطعه ژنی در داخل وکتور، از روش

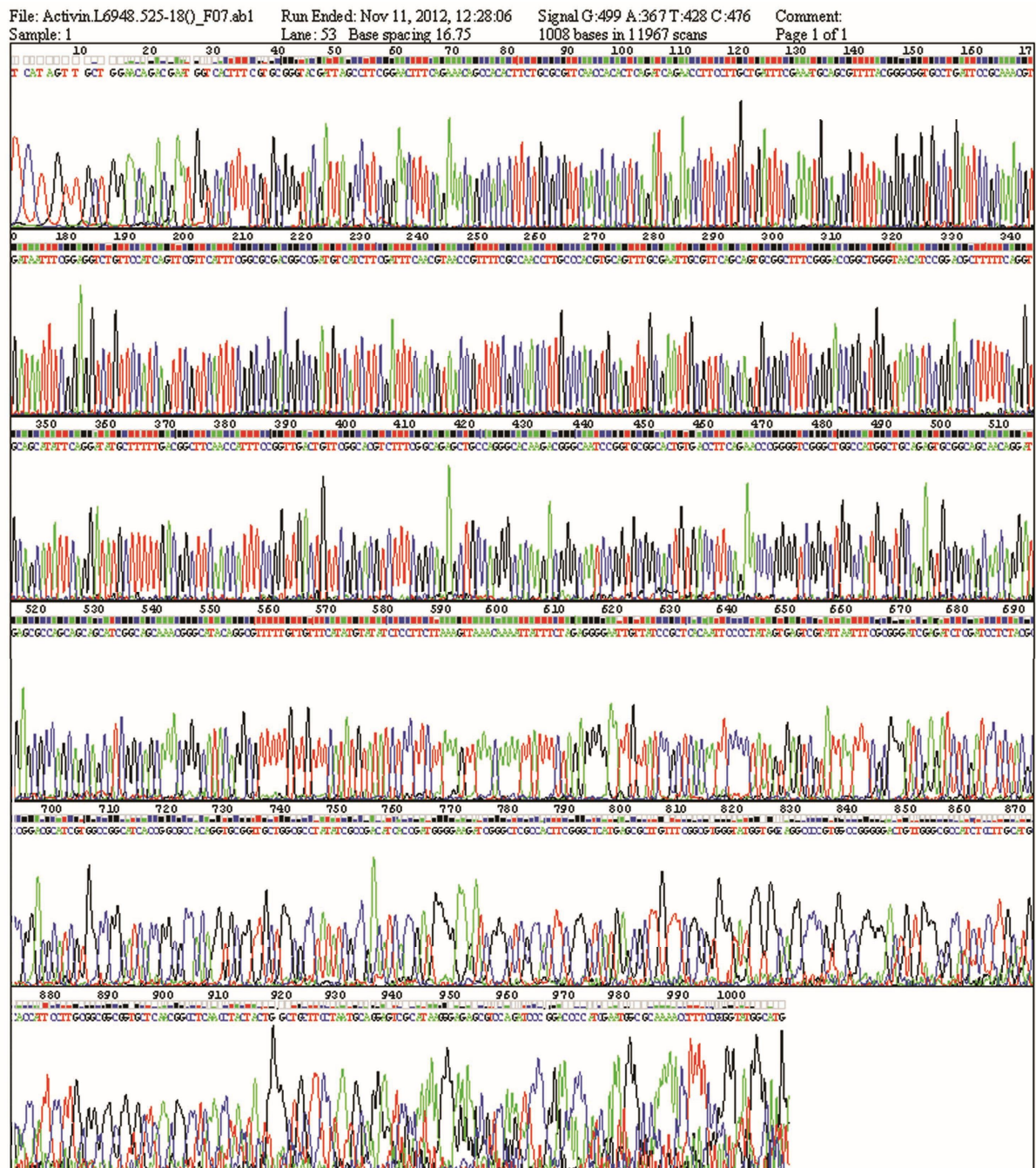
توالی‌یابی استفاده شد. شکل 6 نتیجه توالی‌یابی را نشان

می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود قطعه مورد نظر

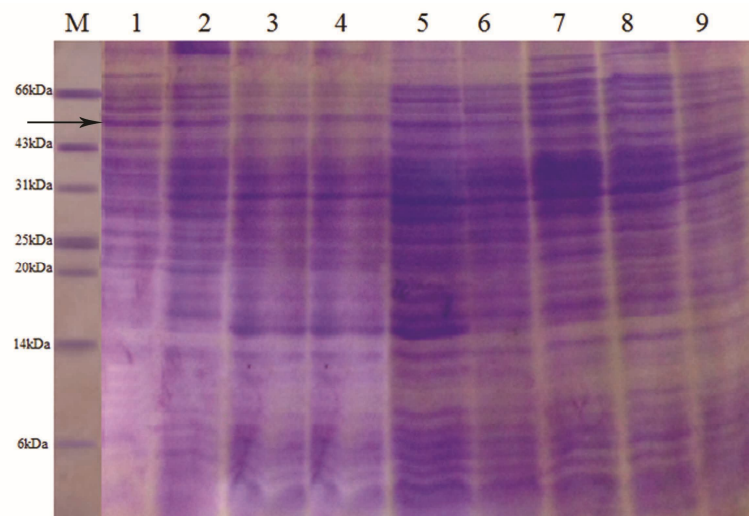
بطور کامل و با جهت‌گیری صحیح به درون وکتور وارد

الکتروفورز شدند. لازم به ذکر است که پروتئین بیان شده، می‌بایست وزن مولکولی 48 کیلودالتون داشته باشد. همان‌طور که در شکل 7 مشاهده می‌شود در محدوده ذکر شده بین نمونه‌های بیان و کنترل (پروتئین‌های استخراج شده از باکتری حاوی وکتور و بدون القاگر) در هیچ یک

از سویه‌های باکتریایی تفاوت خاصی به نظر نمی‌رسد، لذا در مرحله بعد از روش‌های اختصاصی‌تر دات بلات و وسترن بلات استفاده شد. در مرحله اول به منظور بررسی سریع و اطمینان از تولید پروتئین مذکور از روش دات بلات استفاده گردید.



شکل 6 تعیین توالی پلاسمید A activin pET21b(+) با استفاده از پرایمر T7 terminator.

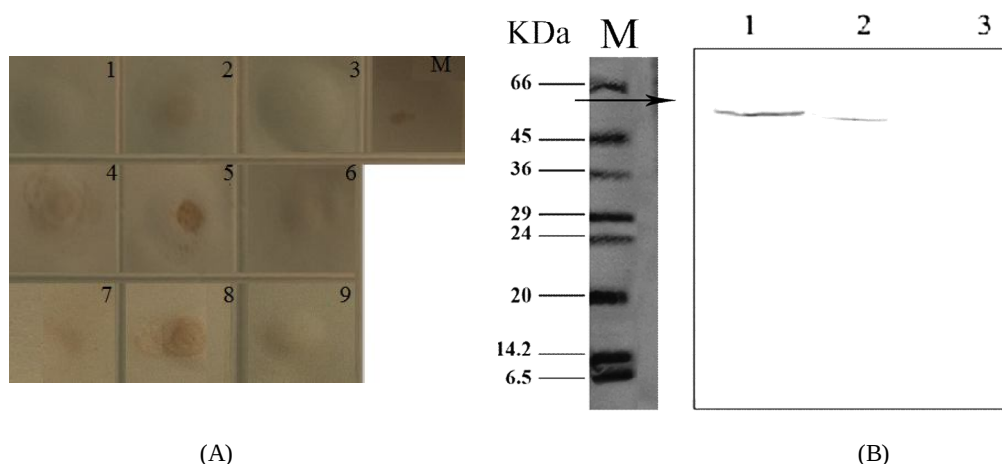


شکل 7 طرح الکتروفورزی کل محتوای پروتئینی استخراج شده روی ژل SDS-PAGE 12 درصد رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو. شماره‌های (1) الی (9) به ترتیب نشان دهنده پروتئین های حاصل از بیان در باکتری PLYS، کنترل بدون القاگر PLYS، کنترل منفی PLYS، بیان Rosetta gami، کنترل بدون القاگر Rosetta gami، کنترل منفی Rosetta gami، بیان بدون القاگر DE3، کنترل بدون القاگر DE3، کنترل منفی DE3 می باشد. (M) مارکر وزن مولکولی پروتئین می باشد.

این باکتری در عدم حضور القاگر لکه‌ای دیده نمی‌شود. از طرف دیگر، محتوای پروتئینی استخراج شده از دو سویه BL21(DE3) Rosetta gami و BL21(DE3) القا شده، بسیار پر رنگ بودند که نشان‌دهنده میزان بالای بیان در این دو سویه نسبت به سویه BL21(DE3)pLysS می‌باشد.

از آنجا که محل باند پروتئینی مربوطه از روی ژل الکتروفورز قابل شناسایی نیست و روش دات بلات نیز این امکان را فراهم نمی‌کند، از تکنیک وسترن بلات استفاده گردید. شکل 8 قسمت B که نشان دهنده واکنش اختصاصی آنتی بادی ضد اکتیوین A با پروتئین اکتیوین A تولید شده در سویه DE3 می‌باشد، محل باند پروتئینی تولید شده را نیز به درستی نشان می‌دهد. همان‌طور که در این شکل نیز ملاحظه می‌شود پروتئین‌های استخراج شده از باکتری‌های بدون وکتور (کنترل منفی) با آنتی‌بادی مربوطه واکنشی نداده و لذا باندی بر روی کاغذ نیتروسلولز مشاهده نمی‌شود.

بنابراین 8 میکرولیتر از پروتئین‌های استخراج شده از هر سه سویه باکتری بدون القا با القاگر و پس از القا با القاگر IPTG به همراه کل محتوای پروتئینی استخراج شده از باکتری‌های BL21(DE3)pLysS، Rosetta gami، BL21(DE3) pET39b::h- فاقد پلاسمید BL21(DE3) و BL21(DE3) activinA (کنترل منفی) بر روی کاغذ نیتروسلولز لکه‌گذاری شدند. شکل 8 قسمت A نتیجه تست فوق را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود ظهور لکه که نشان دهنده اتصال و واکنش اختصاصی آنتی بادی مونوکلونال ضد activin A انسانی با پروتئین اکتیوین A بیان شده می‌باشد، در هر سه سویه دیده می‌شود در حالی که پروتئین‌های استخراج شده از کنترل منفی بدون پلاسمید در تمام نمونه‌ها، بی‌رنگ بودند. پلاسمید pLysS موجود در سویه‌ی میزبانی BL21(DE3)pLysS با تولید لیزوزیم T7 باعث مهار RNA پلیمراز T7 شده و در نهایت از بیان پایه‌ای و نشی ژن اکتیوین A انسانی تحت کنترل پروموتور T7 جلوگیری می‌نماید، به همین دلیل در شکل مربوط به دات بلات در نمونه‌های استخراج شده از



شکل 8 (A) طرح دات بلات کل محتوای پروتئینی استخراج شده با استفاده از آنتی بادی ضد اکتیوین A. شماره‌های (1) الی (9) به ترتیب نشان دهنده کنترل بدون القاگر PlysS، بیان PlysS، کنترل منفی PlysS، کنترل بدون القاگر Rosetta gami، بیان Rosetta gami، کنترل منفی Rosetta gami، کنترل بدون القاگر DE3، بیان DE3، کنترل منفی DE3 می‌باشد. (M) پروتئین اکتیوین A استاندارد می‌باشد. **(B)** طرح وسترن بلات کل محتوای پروتئینی استخراج شده از سویه DE3 با استفاده از آنتی بادی ضد اکتیوین A. شماره‌های (1) الی (3) به ترتیب نشان دهنده بیان DE3، کنترل بدون القاگر DE3، کنترل منفی DE3 می‌باشد.

Human inhibin genes: genomic characterisation and sequencing. *FEBS letters*, 206, 329-334.

- [3] Mason, A.J., Niall, H.D., and Seeburg, P.H. (1986) Structure of two human ovarian inhibins. *Biochemical and biophysical research communications*, 135, 957-964.
- [4] Xia, Y., and Schneyer, A.L. (2009) The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *Journal of Endocrinology*, 202(1), 1-12.
- [5] Tsuchida, K., Nakatani, M., Hitachi, K., Uezumi, A., Sunada, Y., Ageta, H., and Inokuchi K. (2009) Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell communication and signaling*, 7, 11 pages.
- [6] Asashima, M., Nakano, H., Shimada, K., Kinoshita, K., Ishii, K., Shibai, H., and Ueno, N. (1990) Mesodermal induction in early amphibian embryos by activin A (erythroid differentiation factor). *Roux's Archives of Developmental Biology*, 198, 330-335.
- [7] Shidaifat, F., Khamas, W., and Hailat, N. (2001) Activin-A differentially regulates steroidogenesis by sheep granulosa cells. *Research in Veterinary Science*, 71, 23-25.
- [8] Silva, A.W.B., Bezerra, F.T.G., Costa, J.J.N.,

در این شکل نیز دلیل مشاهده بند در نمونه‌های بدون القاگر بیانگر بیان نشتی در سویه DE3 می‌باشد. شایان ذکر است که به منظور دستیابی به میزان بیان بالاتری از پروتئین اکتیوین A بهینه‌سازی محیط و یا استفاده از چاپرون‌ها پیشنهاد می‌شود.

4- تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه تهران تحت شماره گزنت 28669/06/03 به دکتر زهرا حاجی حسن انجام شده است. همچنین نویسندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به دلیل حمایت مالی (شماره طرح 91000470) به منظور انجام این پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

5- منابع

- [1] Litwack, G. (2011) *Activins and inhibins*. Academic press. USA.
- [2] Stewart, A.G., Milborrow, H.M., Ring, J.M., Crowther, C.E., and Forage, R.G. (1986)

- activin β (A) subunit. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 154, 45-54.
- [12] Papakonstantinou, T., Harris, S.J., Fredericks, D., Harrison, C., Wallace, E.M., and Hearn, M.T. (2009) Synthesis, purification and bioactivity of recombinant human activin A expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 64, 131-138.
- [13] Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, New York.
- [14] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [15] Demaio, A. (1996) *Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes*. In *protein blotting*. Oxford University Press. Oxford. Pp 11-30.
- Rossi, R.O.D.S., Passos, M.J., Vasconcelos, G.L., Rossetto, R., Donato, M.A.M., Magalhães-Padilha, D.M., Campello, C.C., *et al.* (2014) Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. *Livestock Science*, 160, 199-207.
- [9] Antsiferova, M., and Werner, S. (2012) The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *Journal of cell science*, 125, 3929-3937.
- [10] Abdipranoto-Cowley, A., Park, J.S., Croucher, D., Daniel, J., Henshall, S., Galbraith, S., Mervin, K., and Vissel, B. (2009) Activin A is essential for neurogenesis following neurodegeneration. *Stem cells*, 27(6), 1330-1346.
- [11] Yam, K.M., Yu, K.L., and Ge, W. (1999) Cloning and characterization of goldfish