کلون سازی فاکتور رشد اکتیوین A انسانی و بررسی تاثیر بیان همزمان چپرون‌های سیتوپلاسمی با آن

ارد قویمی MSc[1]، زهرا حاجی حسن[2*]، فاطمه ارمغان MSc[3]

1- کارشناس ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
2- استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
3- کارشناس ارشد، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*نویسنده مسئول: hajihasan@ut.ac.ir

تاریخ ارسال: 1399/7/1 تاریخ پذیرش: 1399/11/21

چکیده

اکتیوین A یکی از اعضای خانواده فاکتور رشد تغییردهنده بتا (TGF-β) است که نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی متعدد همانند تمایز سلولی، ترمیم بافتی، رگ‌زایی، تمایز سلول‌های بنیادی، چسبندگی سلولی و آپوپتوز دارد. بنابراین با توجه به کاربردهای بالینی متعدد این پروتئین، تولید نوترکیب آن سودمند می‌باشد. از آنجایی‌که *اشرشیاکلی* یکی از محبوب‌ترین میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است، در این تحقیق از بیان سیتوپلاسمی در این سویه به‌منظور تولید مقادیر بالایی از اکتیوین A استفاده شد. به‌این منظور ابتدا cDNA ناحیه بالغ ژن اکتیوین A تکثیر و در وکتور pET28a(+) کلون شد. وکتور حاصل به سویه‌های BL21(DE3)، BL21(DE3) plysS و Rosetta gami BL21(DE3) انتقال داده شد. پس از القای پروموتر با استفاده از IPTG و بیان پروتئین، تولید اکتیوین A به وسیله روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیان اکتیوین A در سیتوپلاسم هر سه سویه رویکردی مؤثر برای دستیابی به میزان بالایی از پروتئین نوترکیب است اما در این بین، سویه BL21(DE3) مقدار بیشتری پروتئین تولید کرده است. در مرحله بعد به‌منظور دستیابی به شکل محلول اکتیوین A از بیان همزمان چپرون‌های سیتوپلاسمی TF، GroEL/ES و DnaK/J با وکتور pET28a(+) که حامل اکتیوینA بود، استفاده شد. نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات نشان داد که بیان همزمان اکتیوین A با استفاده از پلاسمید چپرونی pGro7 که دارای چپرون‌های GroEL و GroES می‌باشد، در سویه BL21(DE3) یک رویکرد مؤثر برای تولید پروتئین اکتیوین A محلول است.

کلید واژگان: *اشرشیاکلی*، پروتئین نوترکیب، پروتئین محلول، اکتیوین A

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

1- مقدمه

اکتیوین‌ها گلیکوپروتئین‌های دایمری هستند که به خانواده فاکتورهای رشد تغییردهنده بتا[1] تعلق دارند[1]. اکتیوین A انسانی، مولکول دایمری متشکل از دو زیر واحد اینهیبین بتا A می‌باشد[2]. ژن اینهیبین بتا A انسانی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 7 انسانی (7p14.1) قرار داشته و واجد 3 اگزون می‌باشد[3,4]. پس از بیان، هر زیر واحد بتا A پیش از بلوغ و در شکل اولیه، به صورت پری‌پرو پروتئین، واجد 426 اسیدآمینه می‌باشد. از این بین، اسیدآمینه‌های 1 تا 20 مربوط به سیگنال پپتید بوده و اسیدآمینه‌های 21 تا 310 پروپپتید را تشکیل می‌دهند. ناحیه بالغ با طول 116 اسیدآمینه که در این پروژه هدف کلونینگ و بیان قرار می‌گیرد، از اسیدآمینه 311 تا 426 ادامه پیدا می‌کند[5]. همچنین از بین 426 اسید آمینه اینهیبین، 14 اسید آمینه سیستئین هستند که از این بین نیز فقط 9 سیستئین در ناحیه بالغ زنجیره پلی‌پپتیدی قرار می‌گیرند. 8 سیستئین زنجیره بالغ با یکدیگر چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای برقرار می‌کنند، در حالی که تنها سیستئین باقی‌مانده، در ساختار دایمری با سیستئین زیر واحد دیگر پل دی‌سولفیدی تشکیل داده و ساختار دایمری را پایدار می‌کند[6].

نخستین بار اکتیوین در دهۀ 1980 به‌عنوان یک پروتئین غدد جنسی که سبب القای ترشح عامل محرک فولیکولی[2] می‌شود، شناسایی شد. با این حال بیان اکتیوین محدود به غدد جنسی نبوده است و بعدها مشخص شد که این پروتئین در انواع بسیاری از سلول‌ها و در تمام مراحل تکوین، حضور دارد[7]. برخی سلول‌هایی که قادر به تولید اکتیوین هستند عبارتند از: سلول‌های اندوتلیال عروقی[3]، سلول‌های مختلف بافت پوششی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک[6]. از آنجایی‌که پروتئین اکتیوین A کاربردهای بالینی بسیار مهمی در فرایندهایی همچون تکثیر سلولی، تمایز، خونسازی، پاسخ به التهاب، التیام زخم، فیبروز و ... دارد[8]، در سال‌های اخیر، تولید نوترکیب آن در رده‌های مختلف سلولی، مورد توجه بوده است. تاکنون به دلیل ساختار پیچیده و وجود پیوندهای دی‌سولفیدی، تولید این پروتئین در رده‌های مختلف سلول‌های یوکاریوتی انجام پذیرفته است. از آنجایی‌که تولید پروتئین مذکور در میزبان‌های یوکاریوتی با مشکلاتی از قبیل بیان پایین و هزینه بالا همراه است[9]، بیان سیتوپلاسمی در میزبان پروکاریوتی *E. coli* ، در راستای افزایش میزان بیان در این پروژه مورد نظر قرار گرفت. شایان ذکر است که بیان همزمان چاپرون های سیتوپلاسمی با پروتئین هدف نه تنها می‌تواند تأثیر مثبت بر پیچش صحیح و افزایش حلالیت پروتئین تولیدی داشته باشد بلکه در بسیاری موارد باعث افزایش میزان بیان هم می‌شود. چپرون TF یا همان تریگر فاکتور[4] یک چپرون مستقل از ATP بوده که با مشارکت ریبوزوم و در شرایط آزمایشگاهی، از خود فعالیت چپرونی بروز داده و همچنین واجد فعالیت پپتیدیل- پرولیل- سیس- ترنس- ایزومرازی[5] نیز می‌باشد. موقعیت و جایگاه TF در کانال خروجی پپتید از ریبوزوم و توانایی آن در میانکنش با زنجیره‌های پپتیدی کوتاه در حال سنتز سبب می‌شود که این چپرون بتواند اولین چپرونی باشد که به زنجیره پلی پپتیدی در حال سنتز، متصل شود[10]. GroEL نیز چپرونی است که

1. Transforming growth factor- β
2. Follicle-Stimulating Hormone (FSH)
3. Vascular endothelial cells
4. Trigger Factor
5. Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

عملکرد صحیح و مناسب آن وابسته به حضور GroES می‌باشد. این دو چپرون مولکولی که برای فعالیت به ATPنیاز دارند، در بسیاری از باکتری‌ها وجود دارند. این گروه چپرونی برای تاخوردگی صحیح بسیاری از پروتئین‌ها ضروری می‌باشند[11]. در گروه چپرون های DnaK-DnaJ-GrpE ، DnaK یک پروتئین مونومر 70 کیلو دالتونی و دارای دو دومین است که نقش محوری در تاخوردگی پلی پپتیدهای سنتزی مسیر *de novo* و مدیریت اثرات نامطلوب استرس دارد. در DnaK، پایانه‌ی N مسئول فعالیت ATPase است، درحالی‌که پایانه C مسئول اتصال به سوبسترا است. DnaK برای عملکرد صحیح خود نیازمند همراهی دو کوفاکتور دیگر یعنی DnaJ و GrpE است. DnaJ یک پروتئین 41 کیلو دالتونی است که هیدرولیز ATPای که به همراه سوبسترای ناقص تاخورده‌ای که در حفره DnaK قرارگرفته است را تسهیل می‌کند. GrpE یک همودایمر از زیر واحدهای 20 کیلو دالتونی است که رها شدن ADP از DnaK و سپس رها شدن سوبسترا را در زمان اتصال دوباره ATP به DnaK هدف قرار می‌دهد. سوبسترایی که از DnaK جدا می‌شود یا به صورت غیر تاخورده است که برای کامل شدن تاخوردگی، دوباره وارد چرخه DnaK-DnaJ می‌شود و یا به‌صورت اندکی تاخورده است که در جهت تکمیل فرایند پیچش وارد مسیر GroEL-GroES می‌شود[12-14].

در این پژوهش، به‌منظور ایجاد پیچش صحیح پروتئین نوترکیب اکتیوین A و همچنین افزایش میزان پروتیئن محلول سیتوپلاسمی، از بیان همزمان این پروتئین با چپرون های سیتوپلاسمی استفاده شد. چپرون‌های سیتوپلاسمی مورد استفاده در این تحقیق شامل: Trigger Factor (TF)، DnaK، DnaJ، GrpE، GroES و GroEL می‌باشند. نتایج نشان دادند که بیان همزمان چپرون‌های GroEL و GroES رویکردی مؤثر برای تولید پروتئین اکتیوین A محلول در *E. coli* است.

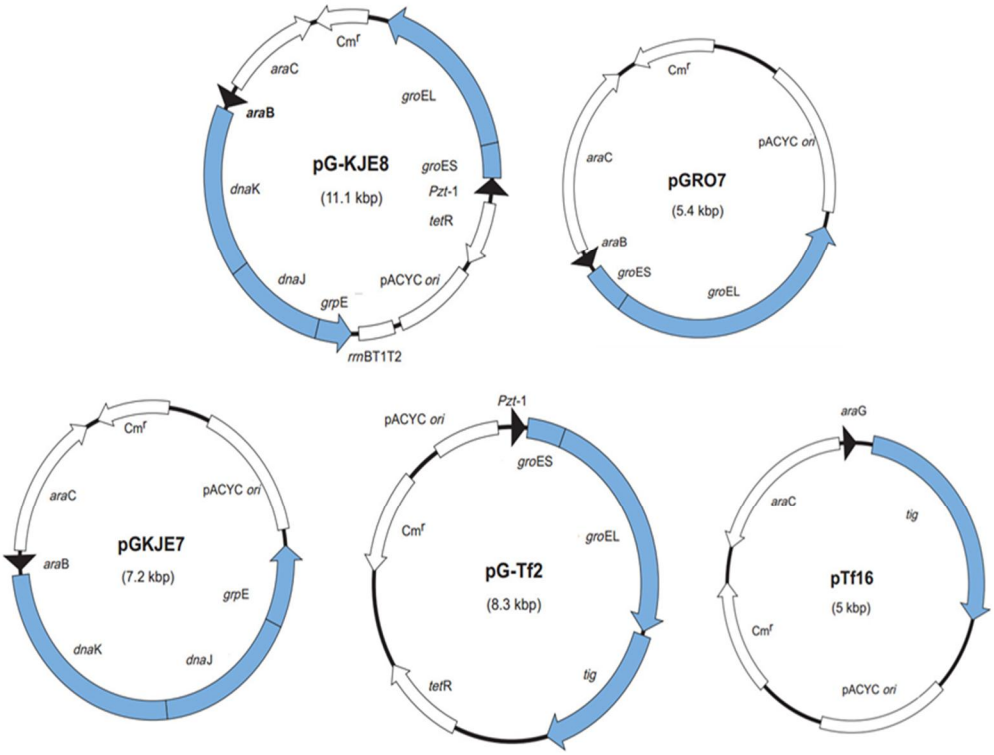
2- مواد و روش‌ها

cDNA ژن اکتیوین A انسانی از بانک اطلاعاتی NCBI با کد (NM_002192) تهیه و توسط شرکت شاین جین (Shinegene- چین) سنتز شد. پرایمرها از شرکت سیناکلون، آنزیم‌های محدودالاثر *BamHI* و *HindIII* و همچنین آنزیم *T4 DNA ligase* از شرکت جنابایوساینس (JenaBioscience-آلمان)، PCR master mix از شرکت آمپلیکون (Amplicon-آمریکا)، ژل رد از شرکت بیوتیوم (Biotium-آمریکا)، شاخص DNA، آنتی بیوتیک‌ها، آنتی بادی متصل به HRP و IPTG از شرکت سیگما (Sigma Aldrich-آمریکا)، سویه‌های باکتریایی، BL21(DE3) ، BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3)Rosetta gami و پلاسمید pET28a (+) از شرکت نواژن (Novagen-آمریکا) و سایر مواد اغلب از شرکت مرک (Merck-آلمان) تهیه شدند.

همچنین برای این پروژه از پلاسمیدهای شرکت تاکارا[6] (ژاپن) استفاده شد که ساختار و ویژگی‌های هر یک از آنها در جدول و شکل 1 قابل مشاهده است.

6 TAKARA

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل 1- ساختار پلاسمیدهای مورد استفاده. پلاسمید pG-KJE8 حامل ژن 5 چاپرون dnaK، dnaJ، grpE، groES و groEL، پلاسمید pGro7 حامل 2 چاپرون groES و groEL، پلاسمید pKJE7 حامل 3 چاپرون dnaK، dnaJ و grpE،. پلاسمید pG-Tf2 حامل 3 چاپرون tig، groES و groEL و پلاسمید pTf16 حامل ژن چاپرونی tig می باشند. تمامی پلاسمیدها دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل می باشند (Cm^r).

جدول 1- ویژگی‌های پلاسمیدهای مورد استفاده.

شماره	پلاسمید	چپرون مولکولی	پروموتر	مارکر مقاومتی	القاگر(غلظت نهایی)
1	pG-KJE8	-DnaK-DnaJ-GrpE -GroEL GroES	Pzt-1-araB	کلرامفنیکل	L-آرابینوز(0/5mg/ml) تتراسیکلین(1-5ng/ml)
2	pGro7	GroES-GroEL	araB	کلرامفنیکل	L-آرابینوز(0/5mg/ml)
3	pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	araB	کلرامفنیکل	L-آرابینوز(0/5mg/ml)
4	pG-Tf2	GroES-GroEL- Trigger Factor (TF)	Pzt-1	کلرامفنیکل	تتراسیکلین(1-5ng/ml)
5	pTf16	Trigger Factor (TF)	araB	کلرامفنیکل	L-آرابینوز(0/5mg/ml)

کلونینگ cDNA اکتیوین A درون وکتور pET28a(+)

در فرایند کلونینگ، طراحی پرایمر برای دو انتهای ژن به نحوی صورت گرفت که دو جایگاه برش برای آنزیم‌های محدود کننده *BamHI* و *HindIII* در دو انتهای آن ایجاد شود. وکتور مورد استفاده در این تحقیق وکتور pET28a(+) است که واجد جایگاه‌های برش *BamHI* و

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

HindIII می‌باشد و همچنین قادر است به توالی دخولی در صورت بیان، His-tag اضافه کند تا تخلیص و تشخیص بیان قطعه مورد نظر میسّر شود؛ شایان ذکر است که در قطعه ژنی هیچ توالی خاتمه رونویسی وجود ندارد، بنابراین پس از بیان، توالیHis-tag به انتهای پروتئین تولیدی اضافه خواهد شد. پس از تکثیر قطعه ژنی اکتیوین با استفاده از واکنش PCR و پرایمرها، خالص‌سازی محصول PCR انجام پذیرفت تا در ادامه قطعات تکثیر شده وکتور هدف تحت عمل هضم آنزیمی با دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* قرار بگیرند. سپس با محاسبه نسبت مناسب و به کمک آنزیم DNA T4 Ligase عمل اتصال بین قطعه ژن اکتیوین و وکتور pET28a(+) صورت گرفت.

به‌منظور تأیید صحت کلونینگ از روش‌های کلونی PCR، هضم دو آنزیمی و توالی یابی به کمک پرایمر T7 terminator (که توسط شرکت ماکروژن انجام شد) استفاده شد.

پس از انجام کلونی PCR و هضم دو آنزیمی، برای الکتروفورز تمامی نمونه‌های DNA از ژل آگارز 1% استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ 120 ولت انجام شد و درنهایت توسط دستگاه ژل داک با تابش نور UV باندهای DNA مورد بررسی قرار گرفت[15].

ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب به سلول‌های باکتری *E. coli*

ابتدا از سلول های باکتری *E. coli* سلول‌های مستعد تهیه شد. به‌منظور تهیه سلول‌های مستعد برای عمل ترانسفورماسیون، از محلول 100 میلی مولار کلسیم کلرید استفاده شد[15]. برای انجام فرایند انتقال پلاسمید به میزبان باکتریایی یا ترانسفورماسیون از روش القای شوک حرارتی استفاده شد. همچنین به‌منظور حذف باکتری‌های فاقد وکتور از کشت روی پلیت دارای آنتی بیوتیک استفاده شد[15].

بیان پروتئین نوترکیب اکتیوین A

به‌منظور بیان پروتئین هدف، از سه سویه BL21(DE3)، BL21(DE3)plysS و BL21(DE3) Rosetta gami سلول های مستعد تهیه شد و وکتور مربوطه به آنها ترانسفورم شد. این سویه‌ها در محیط کشت تازه LB واجد آنتی بیوتیک کانامایسین تا OD_{600} nm=0/5 در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس به‌منظور القای بیان پروتئین، IPTG با غلظت یک میلی مولار به محیط افزوده شد. پس از 4 ساعت انکوباسیون با دور 180 rpm در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه با دور 4000rpm در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند.

بیان همزمان پروتئین نوترکیب اکتیوین A با چپرون های سیتوپلاسمی

به‌منظور بیان همزمان چپرون‌ها با وکتور حامل توالی پروتئین نوترکیب لازم و ضروری است تا ابتدا به کمک ترانسفورماسیون چپرون‌های مورد نظر به سویه‌های DE3 فاقد وکتور منتقل شوند و جهت تأیید انتقال وکتورهای چپرونی به سلول های باکتری از کشت بر روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل استفاده شدند. پس از انتقال چپرون های سیتوپلاسمی به باکتری‌های فاقد وکتور و تأیید انتقال، وکتور حامل توالی پروتئین نوترکیب اکتیوین A نیز با ترانسفورماسیون به این سویه‌ها انتقال پیدا کرد تا درنهایت بیان همزمان چپرون ها با پروتئین اکتیوین A صورت پذیرد. بیان پروتئین به‌صورت محلول با استفاده از روش زیر انجام شد:

باکتری‌های حاوی وکتور نوترکیب و چپرون به طور شبانه در 5ml محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و کلرامفنیکل کشت داده شدند. میزان 200 میکرولیتر از کشت شبانه سویه های دارای وکتور نوترکیب و چپرون به 20ml محیط LB دارای القاگر مخصوص هر چپرون تلقیح (محیط دارای 4mg/ml آرابینوز و 10ng/ml تتراسایکلین برای چپرون pG-

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

KJE8، 4mg/ml آرابینوز بـرای pGro7، pKJE7 و pTf16 و 10 ng/ml تتراسـیکلین بـرای pG-Tf2) شـدند و تـا رسیدن به $OD_{600\ nm}$ بین 0/5 تا 0/7 در دمـای 37 درجـه سانتی‌گراد و دور 180rpm در انکوباتور قرار داده شـدند. سپس باکتری‌ها به مـدت 30 دقیقـه در 15 درجـه سـانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد به کشـت هـا IPTG بـا غلظت نهایی 0/5 mmol/L اضـافه شـده و بـه مـدت 24 ساعت در دمای 15 درجه سانتی گـراد قـرار داده شـدند. در نهایت سلول ها با استفاده از سـانتریفیوژ جمـع آوری گردیدند.

استخراج پروتئین‌ها

به منظور استخراج کل محتـوای پروتئینـی از اوره‌ی 8 مولار و انجـام سونیکاسـیون جهـت شکسـت پوشـش سلول‌های باکتری استفاده شد[16]. همچنین بـه‌منظـور اسـتخراج و جداسـازی پـروتئین‌هـای محلـول سیتوپلاسمی، رسوب به‌دست آمده از مرحلـه بیـان در بافر لیز کننده که از بافر فسـفات 50mM بـا pH= 7/2 شامل PMSF (0/1 mM)، $MgCl_2$ (0/5 mM)، EDTA (1 mM) و لیزوزیم (250µg/ml) تشکیل شـده اسـت، حل شد. سپس نمونه‌ها به مدت نیم سـاعت روی یـخ قرار گرفتند. در مرحله بعد سونیکاسیون انجام شـد تـا محتوای پروتئینی سـلول آزاد گـردد. بـرای جداسـازی پـروتئین هـای محلـول و غیـرمحلـول سیتوپلاسـمی سانتریفیوژ 15000 g به مدت 30 دقیقه انجام پذیرفت. سوپ رویـی حاصـله شـامل پـروتئین‌هـای محلـول و رسوب شامل قطعات نامحلول پروتئینی می‌باشد.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب اکتیوین A با اسـتفاده از ژل SDS-PAGE

برای الکتروفورز پروتئین‌ها در شرایط دنـاتوره کننـده (در حضـور SDS) و احیـایی، از روش لاملـی بـا تغییـرات استفاده شد[17]. بـه ایـن منظـور از ژل SDS-PAGE بـا غلظت 12% استفاده شد. پس از برقراری جریان و انجـام الکتروفورز، رنگ‌آمیـزی ژل بـا اسـتفاده از کوماسـی بلـو R250 انجام شد.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب اکتیوین A با اسـتفاده از روش وسترن بلات

به‌منظور انجام وسترن بلات مقادیر یکسـانی از نمونـه های پروتئینی، ابتدا توسط ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. سپس نمونه‌ها توسط جریان ثابت 200 میلی‌آمپر و به مدت 4 ساعت در 4 درجه سـانتی‌گـراد بـر روی کاغذ نیترو سلولز منتقل گردیدند. پـس از بلاکینـگ و شستشو،کاغذ با محلول آنتی‌بادی ضد His-tag با رقت 1:2000 به مدت 2 سـاعت انکوبـه گردیـد. ازمحلـول حاوی سوبسترای DAB و پر اکسـید هیـدروژن بـرای ظهور باندها استفاده شد[18].

تخلیص پروتئین نوترکیب اکتیوین A

از آنجایی‌که پروتئین اکتیوین A تولید شـده دارای دنبالـه پلی هیستیدینی در هر دو انتهای آمین و کربوکسـیل خـود می‌باشد، برای تخلیص آن از کروماتوگرافی تمایلی Ni^{+2}– NTA استفاده شد[19]. سپس دیالیز به‌صورت شبانه علیـه بافر تریس اسیدی 10 میلی مولار برای حذف ایمیـدازول از نمونه‌های پروتئینی انجام گرفت.

بررسی ساختار پروتئین نوترکیب اکتیوین A با اسـتفاده از روش اسپکتروسکوپی CD

به‌منظور تعیین ساختار دوم پروتئین اکتیـوین A تولیـد شده از روش اسپکتروسکوپی دو رنگ نمـایی دورانـی (CD) اسـتفاده شـد. بـه ایـن منظـور از دسـتگاه اسپکتروفتومتر Model-215 Aviv در محدوده UV دور استفاده شـد. پیـک محلـول 0/2 mg/ml اکتیـوین A تخلیص و دیالیز شده در محدوده ذکر شده ترسیم شد و بـا نتـایج CD اکتیـوین A بـه دسـت آمـده از بانـک

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

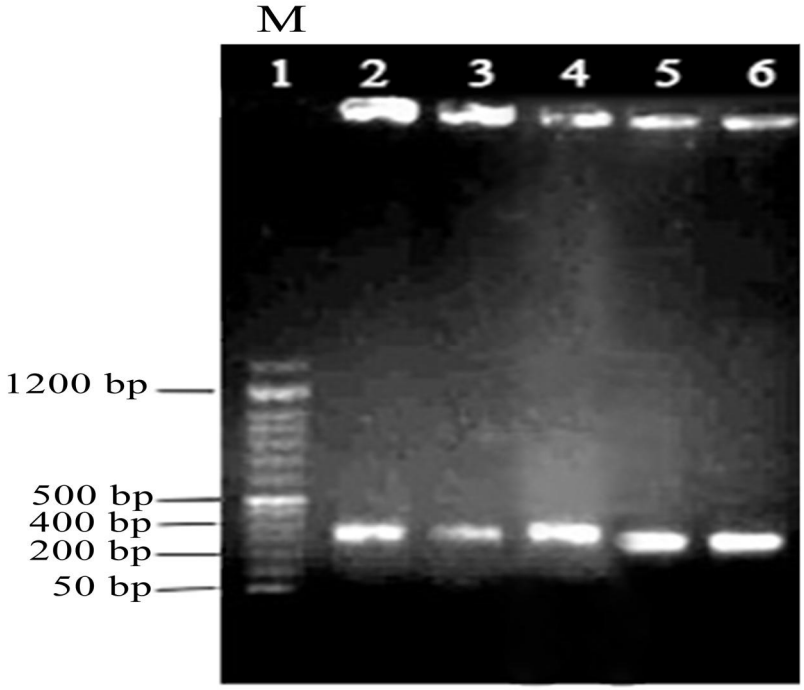
اطلاعـــاتی یـــونی پـــرات (UniProt) (P08476) (https://www.uniprot.org/) مقایسه شد.

3- نتایج

کلونینگ cDNA اکتیوین A درون وکتور pET28a(+)

کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) مطابق آنچه در قسمت روش‌هـا اشـاره شـد بـا موفقیـت انجـام پذیرفت و برای تأیید صحت انجـام آن سـه تکنیـک زیـر مورد استفاده قرار گرفتند:

1- تأیید کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) با کلونی PCR: به‌صـورت تصـادفی بـر روی برخی از کلونی‌های رشـد کـرده بـر روی پلیـت حاوی آنتـی بیوتیـک کانامایسـین تسـت کلـونی PCR انجام شد. همانطور که در شکل 2 مشاهده می‌شود تک باند 348 bp در چاهک‌ها قابل مشاهده است کـه ایـن نشان دهنده حضور قطعه ژنی اکتیوین A می‌باشد.

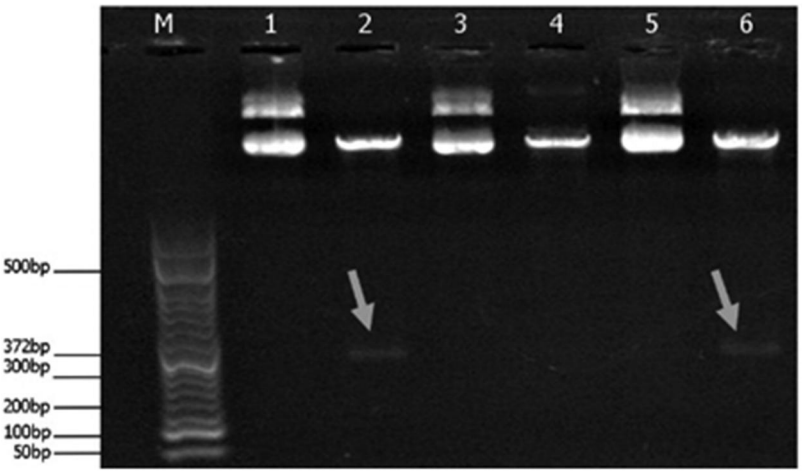


شکل 2- ژل الکتروفورز مربوط به محصولات کلونی PCR بر روی ژل آگارز 1% رنگ آمیزی شده با ژل رد[7]. چاهک 1 (M) مربوط به شاخص DNA 50bp می‌باشد. باند مربوط به محصول PCR در چاهک‌های 2، 3، 4، 5، 6 مشخص است.

7. Gel Red

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

2- تأیید کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) با روش هضم دو آنزیمی: از کلونی‌هایی که تست کلونی PCR آنها مثبت بود کشت مایع تهیه و پس از استخراج پلاسمید بر روی آنها واکنش هضم دو آنزیمی انجام شد. همانطور که در شکل 3 قابل مشاهده است، چاهک های 2 و 6 حاوی وکتور نوترکیب برش خورده با دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* می باشند و حضور باند در در ناحیه 348 bp در آنها نشان دهنده حضور قطعه ژنی اکتیوین A می باشد.



شکل 3- ژل الکتروفورز هضم دو آنزیمی بر روی ژل آگارز 1%. M نشان دهنده مارکر 50 bp می‌باشد، چاهک های 1، 3 و 5 نشان دهنده وکتورهای استخراج شده از کلونی‌های شماره 5، 1، 6 می باشد. چاهک‌های 2، 4 و 6 نشان دهنده همان وکتورها بعد از برش خوردن با دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* می باشد. حضور باند در ناحیه 348 bp که با فلش علامت زده شده نشان دهنده حضور قطعه ژنی اکتیوین A می باشد.

3- تأیید کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) با توالی یابی: میزان 20 میکرولیتر از پلاسمیدهایی که هم تست کلونی PCR آنها و هم واکنش هضم دو آنزیمی آنها مثبت بود، به‌منظور توالی یابی به شرکت ماکروژن ارسال شد. درنهایت پس از بررسی تصویر کروماتوگرام و اطمینان از صحت توالی یابی به‌منظور بررسی حضور قطعه ژنی از نرم‌افزار کلاستال امگا[8] استفاده شد. همانطور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، ژن اکتیوین A انسانی با موفقیت و بدون جهش در وکتور pET28a(+) کلون شده است.

بررسی بیان پروتئین اکتیوین A در میزبان باکتریایی *E. coli* سویه‌های BL21(DE3) و BL21(DE3)pLysS و BL21(DE3)Rosseta gami با استفاده از ژل SDS-PAGE و روش وسترن بلات و آنالیز کمی نتایج با استفاده از نرم افزار

در این پروژه، بیان پروتئین نوترکیب در سه سویه BL21(DE3)، BL21(DE3) plysS و Rosetta gami BL21(DE3) به‌صورت همزمان و مقایسه‌ای صورت پذیرفت. در مرحله اول کل محتوای پروتئینی استخراج شد و بررسی میزان بیان کل (عم از سیتوپلاسمی و پری پلاسمی) انجام شد. شکل 5 نتایج SDS-PAGE و وسترن بلات از نمونه‌های سه سویه BL21(DE3)، BL21(DE3) plysS و Rosetta gami BL21(DE3) را در مقایسه با هم نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود هر سه سویه مقادیر قابل توجهی پروتئین تولید کرده‌اند.

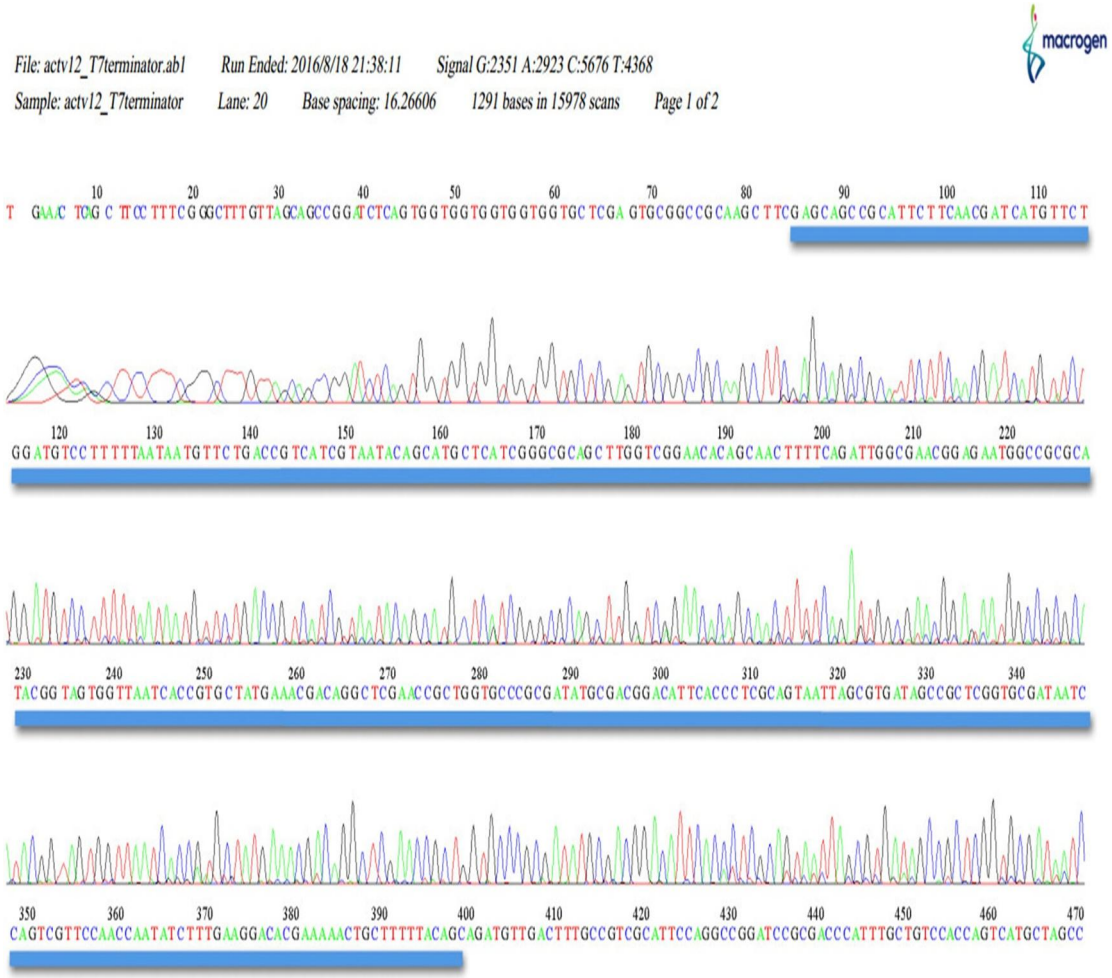
در ادامه نتایج حاصل از وسترن بلات توسط نرم‌افزار ایمج جی[9] که بر اساس میزان تغییر رنگ پیکسل‌های

8. Clustal Omega

9. ImageJ

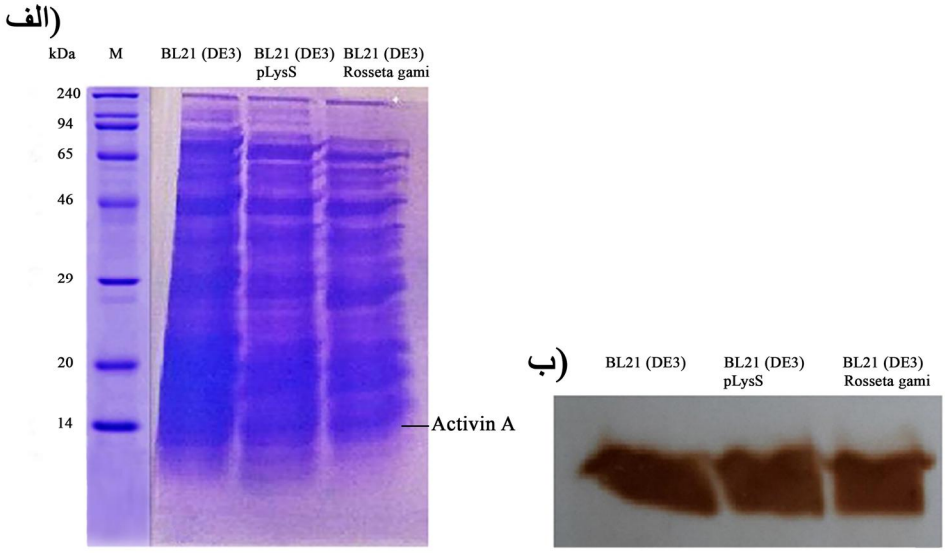
[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

موجـود در تصـویر اسـکن شـده میـزان بیـان را تخمـین می‌زند، بررسی شد. نتیجه به‌دست آمده کـه در جـدول 2 ارائه شده، نشان مـی‌دهـد بیشـترین مقـدار پـروتئین کـل متعلق به سـویه (DE3) BL21 مـی‌باشـد، بنـابراین بـرای ادامه کار از این سویه استفاده شد.



شکل 4- کروماتوگرام حاصل از توالی یابی وکتور نوترکیب pET28a(+) حاوی قطعه ژنی INHBA. توالی مربوط به ژن INHBA با رنگ آبی مشخص شده است.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل 5- طرح الکتروفورزی (الف) و وسترن بلات (ب) کل محتوای پروتئینی استخراج شده به ترتیب بر روی ژل SDS-PAGE 12 درصد رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو و با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد His-tag در سه سویه (BL21(DE3، pLysS و Rosetta gami.

جدول 2- درصد میزان بیان پروتئین(سیتوپلاسمی و پری پلاسمی) در سه سویه (BL21(DE3، pLysS و Rosetta gami اندازه گیری شده با استفاده از نرم افزار ایمج جی.

سویه استفاده شده	درصد تولید پروتئین
BL21(DE3)	40/769
pLysS	32/046
Rosetta gami	27/185

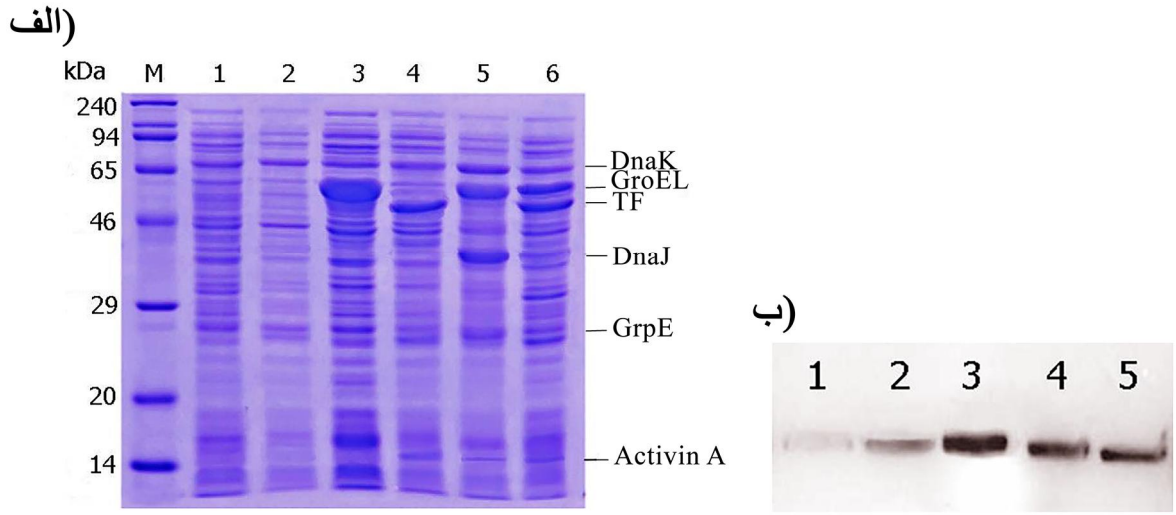
بیان همزمان پلاسمیدهای چپرونی و وکتور نوترکیب در *E. coli* BL21(DE3)

به‌منظور دست‌یابی به پروتئین محلول دارای عملکرد، رویکرد بیان همزمان با چپرون مورد استفاده قرار گرفت. در همین راستا به‌منظور بیان همزمان پروتئین اکتیوین A با چپرون‌های سیتوپلاسمی، پلاسمیدهای چپرونی PG-TF2، pTf16، pGro7، pKJE7 و PG-KJE8 که حاوی چپرون های سیتوپلاسمی می‌باشند به درون سلول‌های مستعد BL21(DE3) انتقال داده شدند و سپس وکتور نوترکیب حامل ژن اکتیوین A نیز به‌وسیله ترانسفورماسیون به این سلول‌ها منتقل شد. پس از بیان پروتئین، استخراج به روش محلول انجام شد. همانطور که در شکل6 الف (مربوط به نتایج SDS-PAGE) مشاهده می‌شود، باند مربوط به پروتئین اکتیوین A در ناحیه 15 کیلودالتون در نمونه‌های مربوط به سویه‌های حاوی چپرون‌های pGro7، pG-TF2 وpG-KJE8 وجود دارد. به‌منظور بررسی بیشتر، از روش وسترن بلات استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که در سویه‌های دارای پلاسمید چپرونی pGro7 میزان پروتئین محلول قابل توجه بوده است و همچنین در سویه‌های pG-KJE8 و pG-TF2 نیز بیان با سطح کمتر اما به خوبی انجام پذیرفته است. این در

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

حالی است که سویه‌های واجد پلاسمیدهای pKJE7 و pTF16 فاقد سطوح بیانی قابل توجه بوده‌اند (شکل 6 ب).

در ادامه نتایج به دست آمده از وسترن بلات توسط نرم افزار ایمج جی بررسی شدند. همانطور که در جدول 3 ارائه شده است، تفاوت محسوسی در میزان بیان پروتئین محلول سیتوپلاسمی در حضور پلاسمیدهای چپرونی مختلف وجود دارد. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین مقدار پروتئین محلول سیتوپلاسمی متعلق به بیان همزمان وکتور pET 28a(+) با پلاسمید چپرونی pGro7 می‌باشد.



شکل 6- الف) طرح الکتروفورزی پروتئین‌های محلول بر روی SDS ژل 12% رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو. M، مارکر وزن مولکولی را نمایش می دهد؛ 1- پروتئین‌های محلول سلول *E. coli* فاقد چپرون؛ 2- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pKJE7؛ 3- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pTf16؛ 4- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pGro7؛ 5- پروتئین‌های محلول سلول واجد پلاسمید pG-KJE8و 6- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pTf2. ب) وسترن بلات پروتئین‌های محلول با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد His-tag. 1- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pKJE7؛ 2- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pTf16؛ 3- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pGro7؛ 4- پروتئین‌های محلول سلول‌واجد پلاسمید pG-KJE8 و 5- پروتئین های محلول سلول‌واجد پلاسمید pTf2.

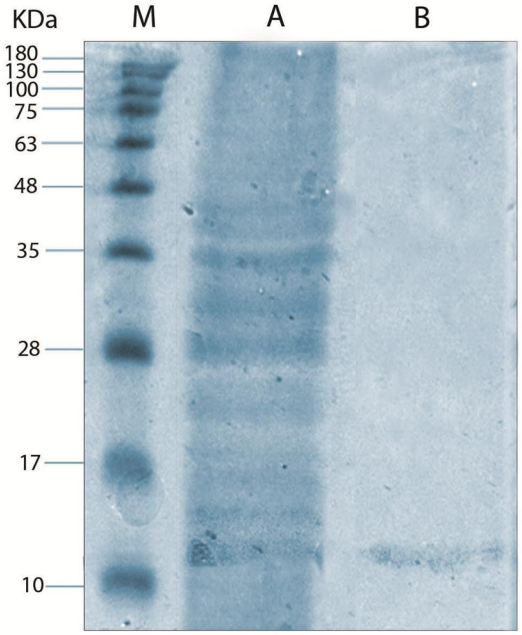
جدول 3- درصد میزان بیان پروتئین‌های محلول در حضور چپرون‌های سیتوپلاسمی اندازه‌گیری شده با استفاده از نرم‌افزار ایمج جی.

پلاسمیدهای چپرونی استفاده شده	درصد تولید پروتئین‌های محلول
pKJE7	3/703
pTf16	11/804
pGro7	34/678
pKJE8	23/509
pTf2	26/306

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

تخلیص پروتئین نوترکیب اکتیوین A و بررسی ساختار دوم

به‌منظور اطمینان از صحت ساختار دوم پروتئین اکتیوین A تولید شده، پروتئین بیان شده با بهترین پلاسمید چپرونی مرحله قبل یعنی pGro7 استخراج و سپس با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی Ni^{+2}–NTA تخلیص شد (شکل 7). سپس ساختار دوم پروتئین خالص شده توسط دستگاه اسپکتروسکوپی CD مورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که در جدول 4 مشاهده می‌شود و پروتئین اکتیوین A تولید شده از لحاظ ساختاری شباهت بسیاری به اکتیوین A تجاری (P08476) دارد.



شکل 7- طرح الکتروفورزی پروتئین‌های نوترکیب اکتیوین A قبل (A) و بعد از تخلیص (B) بر روی SDS ژل 12% رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو. M، مارکر وزن مولکولی می باشد.

جدول 4- مقایسه درصد ساختارهای دوم اکتیوین A نوترکیب و اکتیوین A گزارش شده در یونی پرات.

ساختار دوم (%)	اکتیوین A نوترکیب	اکتیوین A گزارش شده در یونی پرات
آلفا هلیکس	22 %	20 %
بتا شیت	35 %	50 %
چرخش بتا	19 %	13 %

4- بحث

اکتیوینA در برخی زمینه‌های‌درمانی و آزمایشگاهی به‌طور مؤثری ایفای نقش می‌کند که این امر سبب اهمیت بالای تولید آن می‌شود. استفاده از منابع طبیعی به علت عدم تطابق ساختاری با نمونه انسانی، ایمنی‌زایی، دشواری، گرانی و زمان بر بودن تخلیص دارای محدودیت است[20]. یکی از روش‌های‌تولید این پروتئین، تولید به صورت نوترکیب می‌باشد که می‌تواند نیاز مبرم به این

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

پروتئین را برطرف کند. در راستای انجام آزمایش‌های بالینی بیشتر و استفاده از پروتئین به‌عنوان عامل درمانی، مقدار زیادی از این پروتئین مورد نیاز است. یکی از راه های تولید این پروتئین در مقیاس بالا استفاده از سیستم پروکاریوتی *E. coli* به‌عنوان میزبان بیانی می‌باشد. از مهم‌ترین دلایل انتخاب این میزبان می‌توان به رشد سریع، بیان آسان، مقرون به صرفه بودن و در دسترس بودن ابزارهای ژنتیکی لازم برای انتقال ژن اشاره کرد. از معایب این ارگانیسم نیز می‌توان به عدم توانایی در تولید شکل فعال برخی از پروتئین‌ها یا عدم انجام پیچش‌های مناسب و لازم به دلیل کمبود چپرون‌های مولکولی اشاره کرد.

تولید پروتئین‌های عملکردی در *E. coli* نیازمند تعادلی ظرفیتی بین رونویسی DNA ، ترجمه پروتئین و تاخوردگی پروتئین است. بیان بالای پروتئین نوترکیب در *E. coli* می تواند تا 30 درصد از کل پروتئین تولید شده در سلول میزبان را به خود اختصاص دهد در حالیکه میزان چپرون ها و تعدیل کننده های[10] موجود در سلول میزبان ثابت و مشخص است. علاوه‌بر این تاخوردگی صحیح بسیاری از پروتئین‌ها نیازمند شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی سولفیدی است. بنابراین بیان بسیاری از پروتئین‌ها در *E. coli* مقدار زیادی از پروتئین‌های تا نشده (Unfold) یا اشتباه تا شده[11] را در سیتوپلاسم ایجاد می‌کند؛ در این حالت شرایط به گونه‌ای است که این پروتئین‌ها تمایل دارند تجمع یابند و اینکلوژن بادی‌ها را ایجاد کنند[21].

اینکلوژن بادی‌ها به صورت غیرفعال و غیرمحلول هستند و در بعضی شرایط یک مانع قابل توجه در به دست آوردن پروتئین فعال هستند. در این حالت تجمعات غیرفعال و نامحلول اینکلوژن بادی در درون سلول رسوب می‌کنند. به منظور تاخوردگی مناسب پروتئین نوترکیب، اینکلوژن بادی‌های استخراج شده باید توسط سیستم بافری احیا کننده- اکسید کننده مناسب رناتوره شود. از آنجا که فرایند دناتوراسیون و رناتوراسیون برای اینکلوژن بادی‌ها فرایندی غیرمطمئن، پرهزینه و زمان بر می‌باشد، بنابراین لازم بود تا با استفاده از بیان همزمان چپرون‌های سیتوپلاسمی اقدام به تولید سیتوپلاسمی پروتئین نوترکیب، به‌صورت محلول شود تا ضرورتی بر انجام فرایندهای متعدد بعدی روی اینکلوژن‌بادی‌ها نباشد. بنابراین در این پروژه به‌منظور تولید پروتئین اکتیوین A به میزان بالا و به‌صورت محلول از دو رویکرد استفاده شد، اولین رویکرد استفاده از سویه‌های مختلف بیانی *E. coli* بود و رویکرد دوم بیان همزمان با چپرون‌های سیتوپلاسمی بود. از آنجایی که در مقالات متعددی نشان داده شده که میزان بیان پروتئین می‌تواند در سویه‌های مختلف *E. coli* متفاوت باشد و ممکن است برای هر پروتئین یک سویه بهتر از سویه های دیگر باشد[22,23]، به همین دلیل در این تحقیق از سه سویه (BL21(DE3، BL21(DE3)plysS و BL21(DE3) Rosetta gami استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان بیان پروتئین در سویه (BL21(DE3 از بین سه سویه استفاده شده بیشتر می‌باشد.

نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده که بیان چپرون های سیتوپلاسمی هم بر میزان تولید کلی پروتئین تاثیر می‌گذارند و هم باعث افزایش حلالیت و بهبود تاخوردگی پروتئین‌ها می‌شوند. بنابراین هدف دوم در این پروژه تولید پروتئین اکتیوین A به میزان بالا اما به صورت محلول و دارای عملکرد بود. به همین منظور برای تولید پروتئین اکتیوین A با ساختار صحیح در سیتوپلاسم از بیان همزمان با پلاسمید های چپرونی pTf16،PG-TF2 ، pGro7،pKJE7 و PG-KJE8 که به ترتیب حاوی چپرون های سیتوپلاسمی (Trigger Factor (TF، DnaK، DnaJ، GrpE، GroES و GroEL می‌باشند، استفاده شد. نتایج نشان دادند که بیان همزمان چپرون های GroES و

10. Modulators
11. Misfolded

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

GroEL گزینه‌های مناسبی برای بیان پروتئین اکتیوین A به‌صورت محلول هستند. از آنجایی‌که این چپرون‌ها نقش مهم و کلیدی درتاخوردگی صحیح پروتئین‌ها بازی می‌کنند، بیان همزمان آنها باعث افزایش تولید پروتئین اکتیوین A که دارای ساختاری پیچیده می‌باشد، به‌صورت محلول شده است[24]. بنابراین می‌توان گفت که این چپرون‌ها هم باعث افزایش بیان و تولید پروتئین شده‌اند و هم سبب افزایش حلالیت آن است.

نتایج مشابهی در سال 2020 در ارتباط با تولید سوکروز فسفریلاز[12] در سویه BL21(DE3) به دست آمده است. در این مطالعه پروتئین به‌طور همزمان با پلاسمیدهای چپرونی pGro7 ، pG-KJE8 وpG-TF2 بیان شد؛ نتایج نشان داد که پلاسمید چپرونی pGro7 که دارای چپرون‌های GroES-GroEL می‌باشد، بیشترین تأثیر را در تولید و بیان این پروتئین دارد. میزان فعالیت آنزیمی SPase در شرایط بهینه 7/05U/ml به‌دست آمده است در صورتی‌که میزان فعالیت این پروتئین وقتی با پلاسمیدهای چپرونی pGro7 ، pG-KJE8 وpG-TF2 بیان می‌شود به ترتیب 28/6، 59/2 و 64/5 U/mg افزایش پیدا کرده است، همچنین نشان داده شد که این دو چپرون بیشترین اثر را در فرایند پیچش صحیح پروتئین و حفاظت پروتئین در مقابل تاخوردگی نادرست و تجمعات نامحلول دارند[25]. در بررسی دیگری در سال 2019 نشان داده شد که چپرون‌های GroEL–GroES باعث تاخوردگی صحیح و همچنین افزایش فعالیت آنزیمی Chondroitinase (ChSase)AC II از 3/12 U/ml به 9/15 U/ml در سویه BL21(DE3) شدند[26]. در سال 2018 سامپون و همکاران نشان دادند که چپرون‌های GroEL–GroES در *pastorisPichia* تولید کلی فیتاز را افزایش داده و سبب افزایش تاخوردگی صحیح شده‌اند، در این گزارش میزان فعالیت فیتاز در شرایط بهینه و حضور چپرون های GroEL–GroES از 34 U/ml به 52 U/ml افزایش پیدا کرد. [27]. همچنین در سال 2016 نشان داده شد که در *E. coli* بیان همزمان با پلاسمید چپرونی PG-KJE8 که حاوی چپرون DnaK، DnaJ، GrpE، GroES و GroEL می‌باشد باعث افزایش قابل توجهی در تولید سارکوزین اکسیداز[13] به صورت محلول می شود[28]. در سال 2014 در مطالعه‌ای به بررسی اثر چپرون‌ها بر روی کلاژن شبه انسانی[14] پرداخته شد. در این بررسی نشان داده شد که TF نه تنها باعث بهبود و افزایش تولید HLC می شود بلکه موجب تاخوردگی صحیح این پروتئین در *E. coli* نیز می شود[29].

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که بیان همزمان چپرون‌های سیتوپلاسمیGroES و GroEL میزان بیان پروتئین اکتیوین A محلول را بطور قابل توجهی افزایش داده است. این بررسی نشان داد که چپرون‌ها نه تنها باعث بهبود تاخوردگی پروتئین‌ها می‌شوند بلکه می‌توانند موجب افزایش بیان و افزایش تولید کلی پروتئین نیز شوند زیرا آنها از ایجاد تجمعات نامحلول پروتئین جلوگیری می‌کنند.

5- سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه تهران به دلیل فراهم کردن امکانات پژوهشی و حمایت مالی از این پروژه (به شماره طرح 28669/06/06) کمال تشکر را دارند.

منابع

1- Florio, P., Luisi, S., Marchetti, P., Lupi, R., Cobellis, L., Falaschi, C., Sugino, H., Navalesi, R., Genazzani, A.R., and Petraglia, F. (2000) Activin A stimulates insulin secretion in cultured human pancreatic islets. J. Endocrinol. Invest. 23, 231-234.

2- Mason, A.J., Farnworth, P.G., and Sullivan, J. (1996) Characterization and determination of the

12. Sucrose phosphorylase (SPase)

13. Thermomicrobium roseum sarcosine oxidase

14. Human-like collagen (HLC)

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

3- Paulsson, K., Heidenblad, M., Strombeck, B., Staaf, J., Jonsson, G., Borg, A., Fioretos, T., and Johansson, B. (2006) High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. J. Leuk. 20, 840-846.

4- Tanimoto, K., Yoshida, E., Mita, S., Nibu, Y., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1996) Human activin βA gene Identification of novel 5′ exon, functional promoter, and enhancers. J. Biol. Chem. 271, 32760-32769.

5- Mason, A.J. (1994) Functional analysis of the cysteine residues of activin A. J. Mol. Endocrinol. 8, 325-332.

6- Phillips, D.J., de Kretser, D.M., and Hedger, M.P. (2009) Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. Cytokine. growth. Factor. Rev. 20, 153-164.

7- Pauklin, S., and Vallier, L. (2015) Activin/Nodal signalling in stem cells. J. Dev. 142, 607-619.

8- Sozzani, S., and Musso, T. (2011) The yin and yang of Activin A. Blood. 117, 5013-5015.

9- 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. Expr. Purif. 64: 131-138.

10- Hoffmann, A., Bukau, B., and Kramer, G. (2010) Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res. 1803, 650-661.

11- Saibil, H. (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 14, 630-642.

12- Bertelsen, E.B., Chang, L., Gestwicki, J.E., and Zuiderweg, E.R. (2009) Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 8471-8476.

13- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. J. Sci. 295, 1852-1858.

14- Sharma, S.K., De Los Rios, P., Christen, P., Lustig, A., and Goloubinoff, P. (2010) The kinetic parameters and energy cost of the Hsp70 chaperone as a polypeptide unfoldase. Nat. Chem. Biol. 6, p.914.

15- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012) Working with synthetic oligonucleotide probes, Molecular cloning: a laboratory manual. 10.11–10.16.

16- Hajihassan, Z., Sohrabi, M., Rajabi Bazl, M., and Eftekhary, H.S. (2016) Expression of human nerve growth factor beta and bacterial protein disulfide isomerase (DsbA) as a fusion protein (DsbA:: hNGF) significantly enhances periplasmic production of hNGF beta in *Escherichia coli*. Rom. Biotech. Lett. 21, 11850-6.

17- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

18- Demaio, A. (1996) Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes. Protein blotting. Oxford University Press, Oxford, PP 11-32.

19- Hajihassan, Z., Abdi, M., Roshani Yasaghi, E., and Rabbani-Chadegani, A. (2017) Optimization of recombinant beta-NGF purification using immobilized metal affinity chromatography. Minerva Biotecnol, 29, 126-132.

20- Chen, Y., Phillips, D.J., McMillan, J., Bedford, P., Goldstein, J., Wu, H., Hedger, M.P., and Smith, J.A. (2011) Pattern of activin A and follistatin release in a sheep model of cardiopulmonary bypass. Cytokine. 54, 154-160.

21- Huang, C.J., Lin, H., and Yang, X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39, 383-399.

22- Cao, W., Li, H., Zhang, J., Li, D., Acheampong, D.O., Chen, Z., and Wang, M. (2013) Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: Antiangiogenic activity study. Protein. Expr. Purif. 90, 55-66.

23- Papaneophytou, C.P., Rinotas, V., Douni, E., and Kontopidis, G. (2013) A statistical approach for optimization of RANKL overexpression in *Escherichia coli*: purification and characterization of the protein. Protein. Expr. Purif. 90, 9-19.

24- Baneyx, F. and Palumbo, J. L. (2003) Improving heterologous protein folding via molecular chaperone and foldase co-expression. E. biological activities of noncleavable high molecular weight forms of inhibin A and activin A. J. Mol. Endocrinol. 10, 1055-1065.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

27- Summpunn, P., Jomrit, J., and Panbangred, W. (2018) Improvement of extracellular bacterial protein production in Pichia pastoris by co-expression of endoplasmic reticulum residing GroEL–GroES. J. Biosci. Bioeng. 125, 268-274.

28- Tong, Y., Feng, S., Xin, Y., Yang, H., Zhang, L., Wang, W., and Chen, W. (2016) Enhancement of soluble expression of codon-optimized Thermomicrobium roseum sarcosine oxidase in *Escherichia coli* via chaperone co-expression. J. Biotechnol. 218, 75-84.

29- Jia, Q., Fan, D., Ma, P., Ma, X., and Xue, W. (2014) The different roles of chaperone teams on over-expression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli*. J. Taiwan. Inst. Chem. Eng. 45, 2843-2850.

coli Gene Expression Protocols, Springer, Humana Press, PP 171-197.

25- Yao, D., Fan, J., Han, R., Xiao, J., Li, Q., Xu, G., Dong, J., and Ni, Y. (2020) Enhancing soluble expression of sucrose phosphorylase in *Escherichia coli* by molecular chaperones. Protein. Expr. Purif. 169, 105571.

26- Fang, Y., Fu, X., Xie, W., Li, L., Liu, Z., Zhu, C., and Mou, H. (2019) Expression, purification and characterisation of chondroitinase AC II with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase tag and chaperone (GroES-GroEL) from Arthrobacter sp. CS01. Int. J. Biol. Macromol. 129, 471-476.

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Biotechnology-Tarbiat Modares University

Cloning of human growth factor Activin A and the effects of cytoplasmic chaperons co-expression with it

Ghavimi O.[1] MSc, Hajihassan Z.[*1] PhD, Armaghan F.[1] MSc

1- Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences &Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran[1]
*Corresponding author: Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences &Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran hajihasan@ut.ac.ir
Postal code: 1439957131
Phone: +98 (21) 86093294
Fax: +98 (21) 88497324

Received: 2020/9/22 Accepted: 2021/2/9

Abstract:
Activin A, a member of the transforming growth factor-β (TGF-β) superfamily, plays a central role in numerous physiological processes such as cell differentiation, tissue repair, angiogenesis, differentiation of stem cells, cell adhesion and apoptosis. Because of its various clinical usages, recombinant production of it is beneficial. Since *E. coli* is one of the most popular hosts for recombinant protein production, in this study, cytoplasmic expression in this strain was used to produce high levels of Activin A. So, the cDNA of the Activin A mature region was amplified and then cloned in pET28a(+) vector. The resulting vector was transformed to BL21(DE3), BL21(DE3)plysS, and BL21(DE3)Rosetta-gami strains. After induction the promoter by using IPTG, Activin A production was confirmed by SDS-PAGE and Western blotting assays. The results showed that the expression of Activin A in the cytoplasm of all three strains was an efficient approach to obtain high levels of recombinant protein, but BL21(DE3) strain produced more protein. At the next step in order to achieve soluble form of Activin A, co-expression of cytoplasmic chaperones TF, GroEL/ES, and DnaK with pET28a (+) vector was used. The SDS-PAGE and Western blotting results showed that co-expression of Activin A with cytoplasmic plasmid pGro7 containing GroEL and GroES chaperones, in BL21(DE3) strain is an efficient approach for producing of soluble Activin A.

Keywords: *E. coli*, Activin A, Recombinant protein, Soluble protein

[Downloaded from biot.modares.ac.ir on 2024-10-12]