

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

ارد قویمی¹ MSc، زهرا حاجی حسن^{2*}، فاطمه ارمغان³ MSc

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 ($TGF-\beta$) 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 آنجایی که اشرشیاکلی یکی از محبوب‌ترین میزبان‌ها برای تولید پروتئین‌های نوترکیب است، در این تحقیق از بیان سیتوپلاسمی در این سویه به منظور تولید مقادیر بالایی از اکتیوین A استفاده شد. به این منظور ابتدا cDNA ناحیه بالغ ژن اکتیوین A تکثیر و در وکتور pET28a(+) کلون شد. وکتور حاصل به سویه‌های BL21(DE3) plysS، BL21(DE3) Rosetta gami و BL21(DE3) انتقال داده شد. پس از القای پروموتور با استفاده از IPTG و بیان پروتئین، تولید اکتیوین A به وسیله روش‌های SDS-PAGE و وسترن بلات تأیید شد. نتایج به دست 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 به منظور دستیابی به شکل محلول اکتیوین A از بیان همزمان چپرون‌های سیتوپلاسمی TF، GroEL/ES و DnaK/J با وکتور pET28a(+) که حامل اکتیوین A 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

1- مقدمه

اکتیوین‌ها گلیکوپروتئین‌های دایمری هستند که به خانواده فاکتورهای رشد تغییردهنده بتا¹ 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 واحد 3 آگزون می‌باشد [3,4]. پس از بیان، هر زیر واحد بتا A پیش از بلوغ و در شکل اولیه، به صورت پری‌پرو پروتئین، واحد 426 اسیدآمینه می‌باشد. از این بین، اسیدآمینه‌های 1 تا 20 مربوط به سیگنال پپتید بوده و اسیدآمینه‌های 21 تا 310 پروپیتید 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 اسیدآمینه اینهیبین، 14 اسید آمینه سیستمین هستند که از این بین نیز فقط 9 سیستمین در ناحیه بالغ زنجیره پلی‌پپتیدی قرار می‌گیرند. 8 سیستمین زنجیره بالغ با یکدیگر چهار پیوند دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای برقرار می‌کنند، در حالی که تنها سیستمین باقی‌مانده، در ساختار دایمری با سیستمین زیر واحد دیگر پل دی‌سولفیدی تشکیل داده و ساختار دایمری را پایدار می‌کند [6].

نخستین بار اکتیوین در دهه 1980 به‌عنوان یک پروتئین غدد جنسی که سبب القای ترشح عامل محرک فولیکولی² 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 عروقی³، سلول‌های مختلف بافت پوششی، مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک [6]. از آنجایی که پروتئین اکتیوین A کاربردهای بالینی بسیار مهمی در فرایندهایی همچون تکثیر سلولی، تمایز، خونسازی، پاسخ به التهاب، التیام زخم، فیروز و ... دارد [8]، در سال‌های اخیر، تولید نو ترکیب 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 آنجایی که 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 چارپون‌های 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 فاکتور⁴ یک چپرون مستقل از ATP بوده که با مشارکت ریوزوم و در شرایط آزمایشگاهی، از خود فعالیت چپرونی بروز داده و همچنین واجد فعالیت پپتیدیل-پرولیل-سیس-ترنس-ایزومرازی⁵ نیز می‌باشد. موقعیت و جایگاه TF در کانال خروجی پپتید از ریوزوم و توانایی آن در میانکنش با زنجیره‌های پپتیدی کوتاه در حال سنتز سبب می‌شود که این چپرون بتواند اولین چپرونی باشد که به زنجیره پلی‌پپتیدی در حال سنتز، متصل شود [10]. GroEL نیز چپرونی است که

3. Vascular endothelial cells

4. Trigger Factor

5. Peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase)

1. Transforming growth factor- β

2. Follicle-Stimulating Hormone (FSH)

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.

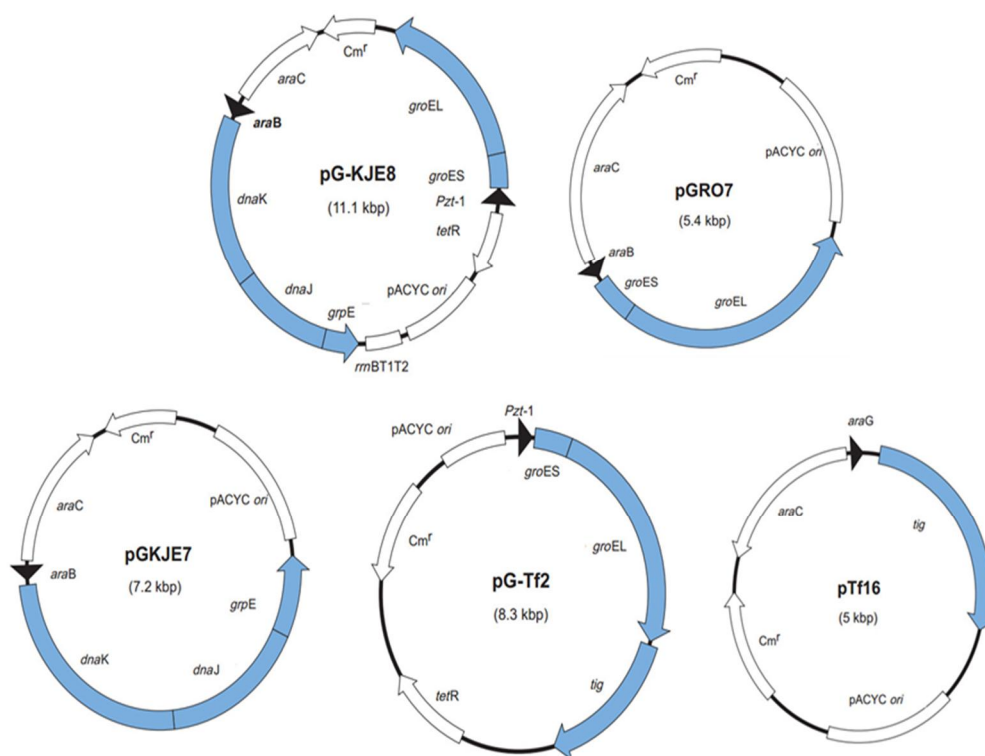
2- مواد و روش‌ها

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 محدودالایر *BamHI* و *HindIII* و همچنین آنزیم *T4 DNA ligase* از شرکت جنابایوساینس (JenaBioscience-آلمان)، PCR 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)Rosetta gami و BL21(DE3)pLysS و پلاسمید (+) pET28a از شرکت نوآزن (Novagen- آمریکا) و سایر مواد اغلب از شرکت مرک (Merck- آلمان) تهیه شدند.

همچنین برای این پروژه از پلاسمیدهای شرکت تاکارا⁶ (ژاپن) استفاده شد که ساختار و ویژگی‌های هر یک از آنها در جدول و شکل 1 قابل مشاهده است.

عملکرد صحیح و مناسب آن وابسته به حضور GroES می‌باشد. این دو چپرون مولکولی که برای فعالیت به ATP نیاز دارند، در بسیاری از باکتری‌ها وجود دارند. این گروه چپرونی برای تاخوردگی صحیح بسیاری از پروتئین‌ها ضروری می‌باشند [11]. در گروه چپرون‌های 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، پایانه N مسئول فعالیت ATPase است، در حالی که 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 ATP ای که به همراه سوبسترای ناقص تاخورده‌ای که در حفره DnaK قرار گرفته 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. سوبسترای که از DnaK جدا می‌شود یا به صورت غیر تاخورده است که برای کامل شدن تاخوردگی، دوباره وارد چرخه DnaK-DnaJ می‌شود و یا به صورت اندکی تاخورده است که در جهت تکمیل فرایند پیچش وارد مسیر GroEL-GroES می‌شود [12-14].

در این پژوهش، به منظور ایجاد پیچش صحیح پروتئین نو ترکیب اکتیوین A و همچنین افزایش میزان پروتئین محلول سیتوپلاسمی، از بیان همزمان این پروتئین با چپرون‌های سیتوپلاسمی استفاده شد. چپرون‌های سیتوپلاسمی مورد استفاده در این تحقیق شامل: Trigger Factor (TF)، DnaK، DnaJ، GrpE،



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 dnaK, dnaJ و grpE، پلاسمید pTf16 حامل ژن چاپرونی tig می باشند. تمامی پلاسمیدها دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل می باشند (Cm^r).

جدول 1- ویژگی های پلاسمیدهای مورد استفاده.

شماره	پلاسمید	چاپرون مولکولی	پروموتور	مارکر مقاومتی	الفاگر (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)

محدود کننده *Bam*HI و *Hind*III در دو انتهای آن ایجاد شود. وکتور مورد استفاده در این تحقیق وکتور pET28a(+) است که واجد جایگاه های برش *Bam*HI و

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 آنزیم های

بیان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A

به منظور بیان پروتئین هدف، از سه سویه BL21(DE3)، BL21(DE3) Rosetta gami و BL21(DE3)plysS 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 به منظور القای بیان پروتئین، IPTG با غلظت یک میلی مولار به محیط افزوده شد. پس از 4 ساعت انکوباسیون با دور rpm 180 در دمای 37 درجه سانتی گراد، نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه با دور rpm 4000 در دمای 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند.

بیان همزمان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با چپرون های

سیتوپلاسمی

به منظور بیان همزمان چپرون‌ها با وکتور حامل توالی پروتئین نو ترکیب 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 نو ترکیب اکتیوین A نیز با ترانسفورماسیون به این سویه‌ها انتقال پیدا کرد تا در نهایت بیان همزمان چپرون ها با پروتئین اکتیوین A صورت پذیرد. بیان پروتئین به صورت محلول با استفاده از روش زیر انجام شد:

باکتری‌های حاوی وکتور نو ترکیب 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 نو ترکیب و چپرون به 20ml محیط LB دارای القاگر مخصوص هر چپرون تلقیح (محیط دارای 4mg/ml آرابینوز و 10ng/ml تتراسایکلین برای چپرون pG-

HindIII می‌باشد و همچنین قادر است به توالی دخولی در صورت بیان، His-tag اضافه کند تا تخلیص و تشخیص بیان قطعه مورد نظر میسر شود؛ شایان ذکر است که در قطعه ژنی هیچ توالی خاتمه رونویسی وجود ندارد، بنابراین پس از بیان، توالی His-tag به انتهای پروتئین تولیدی اضافه خواهد شد. پس از تکثیر قطعه ژنی اکتیوین با استفاده از واکنش PCR و پرایمرها، خالص سازی 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.

به منظور 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 در نهایت توسط دستگاه ژل داک با تابش نور UV باندهای DNA مورد بررسی قرار گرفت [15].

ترانسفورماسیون وکتور نو ترکیب به سلول‌های باکتری

E. coli

ابتدا از سلول های باکتری *E. coli* سلول‌های مستعد تهیه شد. به منظور 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 به منظور حذف باکتری‌های فاقد وکتور از کشت روی پلیت دارای آنتی بیوتیک استفاده شد [15].

غلظت 12% استفاده شد. پس از برقراری جریان و انجام الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل با استفاده از کوماسی بلو R250 انجام شد.

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با استفاده از روش وسترن بلات

به منظور انجام وسترن بلات مقادیر یکسانی از نمونه های پروتئینی، ابتدا توسط ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. سپس نمونه ها توسط جریان ثابت 200 میلی آمپر و به مدت 4 ساعت در 4 درجه سانتی گراد بر روی کاغذ نیترو سلولز منتقل گردیدند. پس از بلاکینگ و شستشو، کاغذ با محلول آنتی بادی ضد His-tag با رقت 1:2000 به مدت 2 ساعت انکوبه گردید. از محلول حاوی سوبسترای DAB و پر اکسید هیدروژن برای ظهور باندها استفاده شد [18].

تخلیص پروتئین نو ترکیب اکتیوین A

از آنجایی که پروتئین اکتیوین A تولید شده دارای دنباله پلی هیستیدینی در هر دو انتهای آمین و کربوکسیل خود می باشد، برای تخلیص آن از کروماتوگرافی تمایلی Ni^{+2} NTA استفاده شد [19]. سپس دیالیز به صورت شبانه علییه بافر تریس اسیدی 10 میلی مولار برای حذف ایمیدازول از نمونه های پروتئینی انجام گرفت.

بررسی ساختار پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با استفاده

از روش اسپکتروسکوپی CD

به منظور تعیین ساختار دوم پروتئین اکتیوین A تولید شده از روش اسپکتروسکوپی دو رنگ نمایی دورانی (CD) استفاده شد. به این منظور از دستگاه اسپکتروفتومتر Model-215 Aviv در محدوده UV دور استفاده شد. پیک محلول 0/2 mg/ml اکتیوین A تخلیص و دیالیز شده در محدوده ذکر شده ترسیم شد و با نتایج CD اکتیوین A به دست آمده از بانک

KJE8، 4mg/ml آرایینوز برای pGro7، pKJE7 و pTf16 و 10 ng/ml تتراسیکلین برای pG-Tf2 شدند و تا رسیدن به $OD_{600\text{ nm}}$ بین 0/5 تا 0/7 در دمای 37 درجه سانتی گراد و دور 180rpm در انکوباتور قرار داده شدند. سپس باکتری ها به مدت 30 دقیقه در 15 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد به کشت ها IPTG با غلظت نهایی 0/5 mmol/L اضافه شده و به مدت 24 ساعت در دمای 15 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در نهایت سلول ها با استفاده از سانتریفیوژ جمع آوری گردیدند.

استخراج پروتئین ها

به منظور استخراج کل محتوای پروتئینی از اورهی 8 مولار و انجام سونیکاسیون جهت شکست پوشش سلول های باکتری استفاده شد [16]. همچنین به منظور استخراج و جداسازی پروتئین های محلول سیتوپلاسمی، رسوب به دست آمده از مرحله بیان در بافر لیز کننده که از بافر فسفات 50mM با pH= 7/2 شامل PMSF (0/1 mM)، $MgCl_2$ (0/5 mM)، EDTA (1 mM) و لیزوزیم (250µg/ml) تشکیل شده است، حل شد. سپس نمونه ها به مدت نیم ساعت روی یخ قرار گرفتند. در مرحله بعد سونیکاسیون انجام شد تا محتوای پروتئینی سلول آزاد گردد. برای جداسازی پروتئین های محلول و غیر محلول سیتوپلاسمی سانتریفیوژ 15000 g به مدت 30 دقیقه انجام پذیرفت. سوپ رویی حاصله شامل پروتئین های محلول و رسوب شامل قطعات نامحلول پروتئینی می باشد.

بررسی بیان پروتئین نو ترکیب اکتیوین A با استفاده از

ژل SDS-PAGE

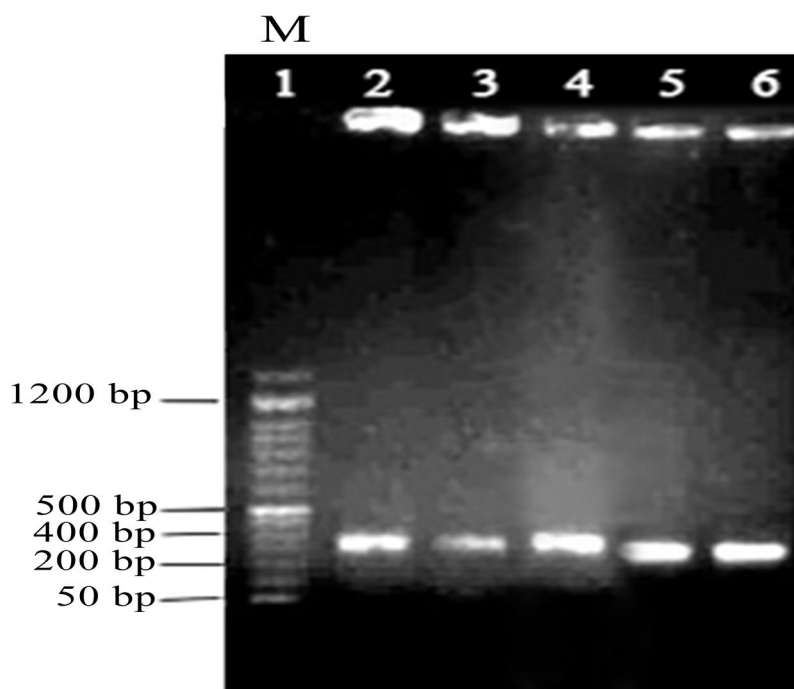
برای الکتروفورز پروتئین ها در شرایط دناتوره کننده (در حضور SDS) و احیایی، از روش لاملی با تغییرات استفاده شد [17]. به این منظور از ژل SDS-PAGE با

1- تأیید کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) با کلونی PCR: به صورت تصادفی بر روی برخی از کلونی های رشد کرده بر روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین تست کلونی PCR انجام شد. همانطور که در شکل 2 مشاهده می شود تک باند 348 bp در چاهک ها قابل مشاهده است که این نشان دهنده حضور قطعه ژنی اکتیوین A می باشد.

اطلاعاتی یونی پرات (UniProt) (P08476) (<https://www.uniprot.org/>) مقایسه شد.

3- نتایج

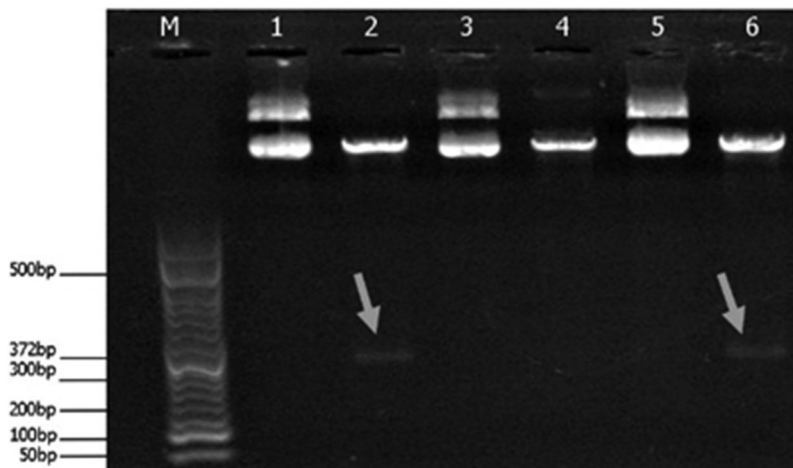
کلونینگ cDNA اکتیوین A درون وکتور pET28a(+) کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) مطابق آنچه در قسمت روش ها اشاره شد با موفقیت انجام پذیرفت و برای تأیید صحت انجام آن سه تکنیک زیر مورد استفاده قرار گرفتند:



شکل 2- ژل الکتروفورز مربوط به محصولات کلونی PCR بر روی ژل آگارز 1% رنگ آمیزی شده با ژل رد⁷. چاهک 1 (M) مربوط به شاخص DNA 50bp می باشد. باند مربوط به محصول PCR در چاهک های 2, 3, 4, 5, 6 مشخص است.

چاهک های 2 و 6 حاوی وکتور نوترکیب برش خورده با دو آنزیم *BamHI* و *HindIII* می باشند و حضور باند در ناحیه 348 bp در آنها نشان دهنده حضور قطعه ژنی اکتیوین A می باشد.

2- تأیید کلونینگ cDNA اکتیوین A در وکتور pET28a(+) با روش هضم دو آنزیمی: از کلونی هایی 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،



شکل 3- ژل الکتروفورز هضم دو آنزیمی بر روی ژل آگارز 1% M نشان دهنده مارکر 50 bp می باشد، چاهک های 1، 3 و 5 نشان دهنده وکتورهای استخراج شده از کلونی های شماره 5، 6، 1 می باشد. چاهک های 2 و 4 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.

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) pLysS*، *BL21(DE3) Rosetta gami* و *BL21(DE3)* به صورت همزمان و مقایسه ای 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 نمونه های سه سویه *BL21(DE3) pLysS*، *BL21(DE3) Rosetta gami* و *BL21(DE3)* را در مقایسه با هم نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود هر سه سویه مقادیر قابل توجهی پروتئین تولید کرده اند.

در ادامه نتایج حاصل از وسترن بلات توسط نرم افزار ایمج جی⁹ که بر اساس میزان تغییر رنگ پیکسل های

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، به منظور توالی یابی به شرکت ماکروژن ارسال شد. در نهایت پس از بررسی تصویر کروماتوگرام و اطمینان از صحت توالی یابی به منظور بررسی حضور قطعه ژنی از نرم افزار کلاستال امگا⁸ استفاده شد. همانطور که در شکل 4 مشاهده می شود، ژن اکتیوین A انسانی با موفقیت و بدون جهش در وکتور pET28a(+) کلون شده است.

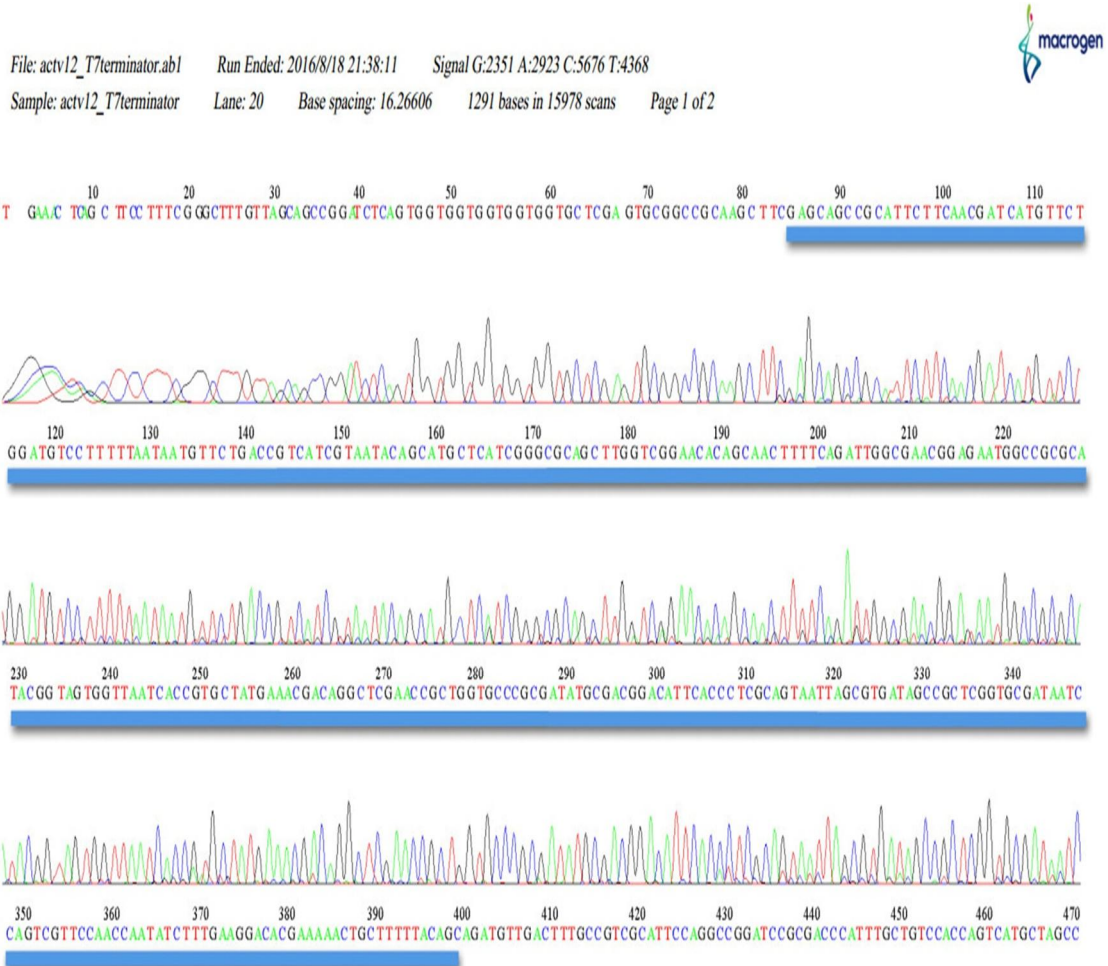
بررسی بیان پروتئین اکتیوین A در میزبان باکتریایی E. coli سویه های BL21(DE3) pLysS و BL21(DE3) Rosetta gami با استفاده از ژل SDS-

9. ImageJ

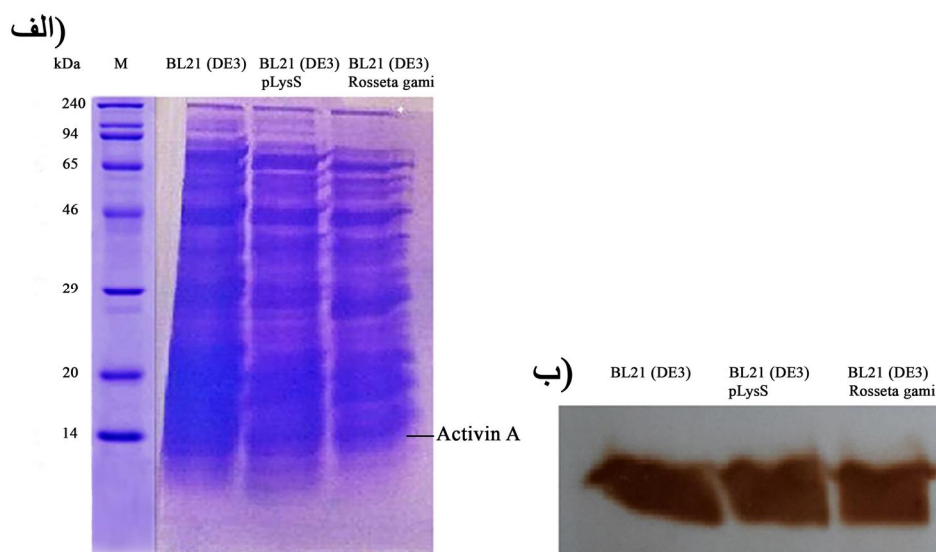
8. Clustal Omega

متعلق به سویه BL21 (DE3) می باشد، بنابراین برای ادامه کار از این سویه استفاده شد.

موجود در تصویر اسکن شده میزان بیان را تخمین می زند، بررسی شد. نتیجه به دست آمده که در جدول 2 ارائه شده، نشان می دهد بیشترین مقدار پروتئین کل



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.



شکل 5- طرح الکتروفورزی (الف) و وسترن بلات (ب) کل محتوای پروتئینی استخراج شده به ترتیب بر روی ژل SDS-PAGE 12 درصد رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو و با استفاده از آنتی بادی 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.

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

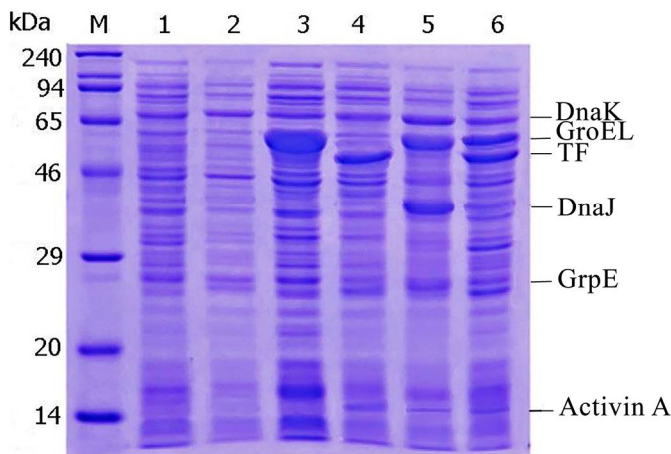
پروتئین، استخراج به روش محلول انجام شد. همانطور که در شکل 6 الف (مربوط به نتایج SDS-PAGE) مشاهده می شود، باند مربوط به پروتئین اکتیوین A در ناحیه 15 کیلو دالتون در نمونه های مربوط به سویه های حاوی چپرون های pGro7، pG-TF2 و pG-KJE8 وجود دارد. به منظور بررسی بیشتر، از روش وسترن بلات استفاده شد. نتایج نشان می دهد که در سویه های دارای پلاسمید چپرونی pGro7 میزان پروتئین محلول قابل توجه بوده است و همچنین در سویه های pG-KJE8 و pG-TF2 نیز بیان با سطح کمتر اما به خوبی انجام پذیرفته است. این در

بیان همزمان پلاسمیدهای چپرونی و وکتور نو ترکیب در *E. coli* BL21(DE3) در به منظور دست یابی به پروتئین محلول دارای عملکرد، رویکرد بیان همزمان با چپرون مورد استفاده قرار گرفت. در همین راستا به منظور بیان همزمان پروتئین اکتیوین A با چپرون های سیتوپلاسمی، پلاسمیدهای چپرونی PG-TF2، pGro7، pTf16، pGro7، pKJE7 و PG-KJE8 که حاوی چپرون های سیتوپلاسمی می باشند به درون سلول های مستعد BL21(DE3) انتقال داده شدند و سپس وکتور نو ترکیب حامل ژن اکتیوین A نیز به وسیله ترانسفورماسیون به این سلول ها منتقل شد. پس از بیان

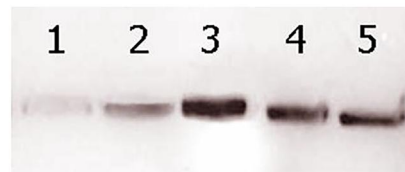
پروتئین محلول سیتوپلاسمی در حضور پلاسمیدهای چپرونی مختلف وجود دارد. همانطور که مشاهده می شود بیشترین مقدار پروتئین محلول سیتوپلاسمی متعلق به بیان همزمان وکتور pET 28a(+) با پلاسمید چپرونی pGro7 می باشد.

حالی است که سویه های واجد پلاسمیدهای pKJE7 و pTf16 فاقد سطوح بیانی قابل توجه بوده اند (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

الف)



ب)



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

جدول 3- درصد میزان بیان پروتئین های محلول در حضور چپرون های سیتوپلاسمی اندازه گیری شده با استفاده از نرم افزار

ایمج جی.

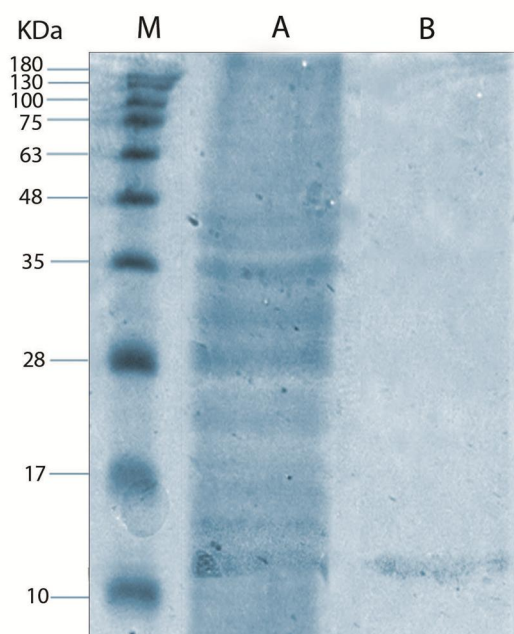
درصد تولید پروتئین های محلول	پلاسمیدهای چپرونی استفاده شده
3/703	pKJE7
11/804	pTf16
34/678	pGro7
23/509	pKJE8
26/306	pTf2

تخلیص پروتئین نوترکیب اکتیوین A و بررسی ساختار

دوم

به منظور 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 می شود و پروتئین اکتیوین A تولید شده از لحاظ ساختاری شباهت بسیاری به اکتیوین A تجاری (P08476) دارد.



شکل 7- طرح الکتروفورزی پروتئین های 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.

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

4- بحث

اکتیوین A در برخی زمینه های درمانی و آزمایشگاهی به طور مؤثری ایفای نقش می کند که این امر سبب اهمیت بالای تولید آن می شود. استفاده از منابع طبیعی به علت

عدم تطابق ساختاری با نمونه انسانی، ایمنی زایی، دشواری، گرانی و زمان بر بودن تخلیص دارای محدودیت است [20]. یکی از روش های تولید این پروتئین، تولید به صورت نوترکیب می باشد که می تواند نیاز مبرم به این

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 راه‌های 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* می‌تواند تا 30 درصد از کل پروتئین تولید شده در سلول میزبان را به خود اختصاص دهد در حالیکه میزان چپرون‌ها و تعدیل‌کننده‌های¹⁰ موجود در سلول میزبان ثابت و مشخص است. علاوه‌بر این تاخوردگی صحیح بسیاری از پروتئین‌ها نیازمند شکل‌گیری صحیح پیوندهای دی‌سولفیدی است. بنابراین بیان بسیاری از پروتئین‌ها در *E. coli* مقدار زیادی از پروتئین‌های تا نشده (Unfold) یا اشتباه تا شده¹¹ را در سیتوپلاسم ایجاد می‌کند؛ در این حالت شرایط به گونه‌ای است که این پروتئین‌ها تمایل دارند تجمع یابند و اینکلوزن بادی‌ها را ایجاد کنند [21].

اینکلوزن 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 اینکلوزن بادی در درون سلول رسوب می‌کنند. به منظور تاخوردگی مناسب پروتئین نوترکیب، اینکلوزن بادی‌های استخراج شده باید توسط سیستم

نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده که بیان چپرون‌های سیتوپلاسمی هم بر میزان تولید کلی پروتئین تأثیر 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 پلاسمیدهای چپرونی pTf16, PG-TF2، pKJE7, pGro7 و PG-KJE8 که به ترتیب حاوی چپرون‌های سیتوپلاسمی (TF) Trigger Factor، DnaK، DnaJ، GroES و GroEL می‌باشند، استفاده شد. نتایج نشان دادند که بیان همزمان چپرون‌های GroES و

10. Modulators
11. Misfolded

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 DnaJ, DnaK, GrpE و GroES می باشد باعث افزایش قابل توجهی در تولید سارکوزین اکسیداز¹³ به صورت محلول می شود [28]. در سال 2014 در مطالعه ای به بررسی اثر چپرون ها بر روی کلاژن شبه انسانی¹⁴ 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 می توان نتیجه گرفت که بیان همزمان چپرون های سیتوپلاسمی GroES و GroEL میزان بیان پروتئین اکتیوین A محلول را بطور قابل توجهی افزایش داده است. این بررسی نشان داد که چپرون ها نه تنها باعث بهبود تاخوردگی پروتئین ها می شوند بلکه می توانند موجب افزایش بیان و افزایش تولید کلی پروتئین نیز شوند زیرا آنها از ایجاد تجمعات نامحلول پروتئین جلوگیری می کنند.

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

GroEL گزینه های مناسبی برای بیان پروتئین اکتیوین A به صورت محلول هستند. از آنجایی که این چپرون ها نقش مهم و کلیدی در تاخوردگی صحیح پروتئین ها بازی می کنند، بیان همزمان آنها باعث افزایش تولید پروتئین اکتیوین A که دارای ساختاری پیچیده می باشد، به صورت محلول شده است [24]. بنابراین می توان گفت که این چپرون ها هم باعث افزایش بیان و تولید پروتئین شده اند و هم سبب افزایش حلالیت آن است.

نتایج مشابهی در سال 2020 در ارتباط با تولید سوکروز فسفریلاز¹² در سویه BL21(DE3) به دست آمده است. در این مطالعه پروتئین به طور همزمان با پلاسمیدهای چپرونی pGro7، pG-KJE8 و pG-TF2 بیان شد؛ نتایج نشان داد که پلاسمید چپرونی pGro7 که دارای چپرون های GroES-GroEL می باشد، بیشترین تأثیر را در تولید و بیان این پروتئین دارد. میزان فعالیت آنزیمی SPase در شرایط بهینه 7/05 U/ml به دست آمده است در صورتی که میزان فعالیت این پروتئین وقتی با پلاسمیدهای چپرونی pGro7، pG-KJE8 و pG-TF2 بیان می شود 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 پیش صحیح پروتئین و حفاظت پروتئین در مقابل تاخوردگی نادرست و تجمعات نامحلول دارند [25]. در بررسی دیگری در سال 2019 نشان داده شد که چپرون های 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 چپرون های GroEL-GroES در *Pastoris Pichia* تولید کلی فیتاز را افزایش داده و سبب افزایش تاخوردگی صحیح شده اند، در این گزارش میزان فعالیت فیتاز در شرایط بهینه و

13. Thermomicrobium roseum sarcosine oxidase

14. Human-like collagen (HLC)

12. Sucrose phosphorylase (SPase)

- 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 Biotechnol.* 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- Papanephytous, 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.
- 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 β A 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.

- 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.

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, Iran¹

*Corresponding author: Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences & Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran hajihassan@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