

Expression, Purification, and Characterization of IP3-binding Domain from Human Type 2

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Nakhaei Amroudie M.¹ MSc,
Ataei F.* PhD

How to cite this article

Nakhaei Amroudie M, Ataei F. Expression, Purification, and Characterization of IP3-binding Domain from Human Type 2. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(2):165-169.

*Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Correspondence

Address: Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran
Phone: +98 (21) 82884748
Fax: +98 (21) 82884717
ataei_f@modares.ac.ir

Article History

Received: October 19, 2016
Accepted: December 5, 2017
ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims IP3 is a key regulator molecule in the message transmission pathway, and releases calcium into the cytoplasm by binding intracellular IP3R receptors on the surface of the internal calcium stores. The aim of this study was expression, purification, and characterization of IP3-binding domain from human type 2.

Materials & Methods In this experimental study, the pET-28a plasmid of the carrier of the IP3BD gene was transferred to the E.coli expression strain BL21 (DE3) by chemical method. In order to optimize the expression in the bacterial system, the expression was studied in different conditions, and various temperatures such as 16, 18, 20, and 24°C, the different times after incubation, type of inducer, and its different concentrations were investigated. The induced bacteria were purified on the basis of thermal shock through nickel column for chromatography and the purity of the protein was measured through SDS-PAGE. The fluorescence emission of IP3-binding domain was measured in the presence and absence of an IP3 ligand at wavelength of 295nm.

Findings Protein did not have a significant expression in LB, TB, and 2xYT environments, and no changes were observed at different times. Expression of bacterial protein at 20°C based on thermal shock of 42°C was higher than in all cases. The purification of the induced bacteria was difficultly repeated due to thermal shock, and the purified samples did not have high concentrations. The fluorescence emission of the protein decreased in the presence of the IP3 ligand.

Conclusion The bacterial expression of IP3-binding domain from human type 2 is weak, but the expression of protein increases with the induction of shock of 42°C.

Keywords IP-3binding Receptor; Expression; Intrinsic Fluorescence; Ligand

CITATION LINKS

- [1] Inositol trisphosphate and calcium signalling [2] Cell signalling. A tale of two messengers [3] A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) receptor protein. Purification and characterization of InsP3 receptor complex [4] Purification and characterization of 240-kDa cGMP-dependent protein kinase substrate of vascular smooth muscle. Close resemblance to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [5] Purification and characterization of the human type 1 Ins(1,4,5)P3 receptor from platelets and comparison with receptor subtypes in other normal and transformed blood cells [6] Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [7] Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors [8] Primary structure, ligand binding, and localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium [9] Determination of relative amounts of inositol trisphosphate receptor mRNA isoforms by ratio polymerase chain reaction [10] IP3 receptors: The search for structure [11] Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r 1) in the mouse central nervous system [12] Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor [13] Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand [14] A novel luminescent biosensor for rapid monitoring of IP3 by split-luciferase complementary assay [15] The heat shock response of Escherichia coli

بیان، تخلیص و تعیین خصوصیات دومین متصل‌شونده به IP3 نوع ۲ انسانی

مرصیه نخعی امرودی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

فرنگیس عطائی PhD*

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: IP3 یک مولکول کلیدی تنظیم‌کننده در مسیر انتقال پیام است و با اتصال به گیرنده‌های درون‌سلولی IP3R روی سطح ذخایر کلسیم داخل‌سلولی باعث آزادسازی کلسیم به درون سیتوپلاسم می‌شود. هدف این پژوهش، بیان، تخلیص و تعیین خصوصیات دومین متصل‌شونده به IP3 (IP3BD:1-604 aa نوع ۲ انسانی) بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، پلاسمید pET-28a حامل ژن IP3BD با روش شیمیایی به داخل باکتری‌های بیانی *E.coli* سویه BL21 (DE3) منتقل شد. برای بهینه‌سازی بیان در سیستم باکتریایی، بیان در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت و دماهای بیان مختلف از جمله ۱۶، ۱۸، ۲۰ و ۲۴°C، زمان‌های مختلف بعد از القا، نوع القاکننده و غلظت‌های مختلف آن بررسی شد. باکتری‌های القا شده براساس شوک حرارتی از طریق کروماتوگرافی تمایلی ستون نیکل- سفارز تخلیص و میزان خلوص پروتئین از طریق SDS-PAGE بررسی شد. نشر فلورسانس دومین متصل‌شونده به IP3 در حضور و عدم حضور لیگاند IP3 در طول موج ۲۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: پروتئین در محیط‌های LB و TB و 2xYT بیان قابل توجهی نداشت و در زمان‌های مختلف تغییری در آن مشاهده نشد. بیان پروتئین باکتری در دمای ۲۰°C براساس شوک حرارتی ۴۲°C نسبت به تمام حالات بیشتر بود. تخلیص باکتری‌های القا شده براساس شوک حرارتی به‌سختی تکرار می‌شد و نمونه‌های خالص شده نیز غلظت بالایی نداشتند. نشر فلورسانس پروتئین در حضور لیگاند IP3 کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: بیان باکتریایی دومین متصل‌شونده به IP3 از گیرنده نوع ۲ گونه انسانی ضعیف است، ولی با القای شوک ۴۲°C بیان پروتئین تا حدود نسبتاً زیادی افزایش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: گیرنده اینوزیتول‌تری‌فسفات، بیان، فلورسانس ذاتی، لیگاند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۴

*نویسنده مسئول: ataei_f@modares.ac.ir

مقدمه

اینوزیتول‌تری‌فسفات (IP3) یک پیام‌رسان ثانویه است که با هیدرولیز فسفاتیدیل‌اینوزیتول ۴ و ۵- بیس‌فسفات توسط فسفولیپاز- C تولید می‌شود. IP3 نقش مهمی در آزادسازی کلسیم از ذخایر سلولی دارد. خروج کلسیم داخل‌سلولی از طریق اتصال IP3 به پروتئین غشایی گیرنده IP3 (IP3R) و باز شدن کانال‌های روی غشا انجام می‌شود. اختلال در این مسیر منجر به اختلالات متابولیکی و به دنبال آن بسیاری از بیماری‌های متابولیک می‌شود [1-3].

گیرنده‌های IP3 دارای سه نوع ایزوفرم ۱ و ۲ و ۳ هستند و از نظر ساختاری حدود ۷۰٪ مشابهت دارند. سه ایزوفرم IP3R هموترامر یا هتروترامر هستند و هر زیرواحد از ۲۷۰۰ اسیدآمینه تشکیل شده و وزن هر کدام از آنها حدود ۳۰۰ کیلوالتون است. هر زیرواحد سه ناحیه عملکردی دارد. ناحیه منفذ کانال یونی که به‌صورت شش هلیکس غشاگذر است و در بخش C- ترمینال قرار دارد. ناحیه اتصال IP3 در قسمت N- ترمینال قرار دارد و بخش وسط این دو ناحیه که محل اتصال کلسیم به این گیرنده است، ناحیه تنظیم‌کننده نامیده شده است. ناحیه C- ترمینال حدوداً شامل ۴۰۰

اسیدآمینه، ناحیه N- ترمینال شامل ۶۰۰ اسیدآمینه و ناحیه تنظیم‌کننده مرکزی شامل ۱۷۰۰ اسیدآمینه است [3، 4]. ۲۲۳ اسیدآمینه اول این گیرنده به‌عنوان ناحیه سرکوبگر اتصال IP3 شناخته شده و حذف این ناحیه منجر به افزایش معنی‌دار اتصال IP3 به گیرنده می‌شود و نشان داده شده است که نقش مهمی در میان‌کنش ناحیه اتصال لیگاند به انتهای تشکیل‌دهنده کانال کلسیم دارد. ۱۶۰ اسیدآمینه انتهایی در قسمت C- ترمینال عامل بسته‌شدن کانال است. ناحیه C و N- ترمینال به تعدادی از مولکول‌های درون‌سلولی متصل می‌شوند که این امر منجر به تنظیم عملکرد کانال IP3R می‌شود. کانال IP3R از چهار قسمت تاخورد و متقارن تشکیل شده است، یک شکل دایره‌ای دارد و اندازه آن ۲۵۰-۱۹۰ آنگستروم است. براساس ساختارهای سه‌بعدی مشخص شده که این کانال حاوی دو ناحیه غشاگذر و سیتوپلاسمی است [1، 3، 5-8].

تاکنون دومین متصل‌شونده به IP3 (IP3BD) از گیرنده نوع ۱ گونه موشی مورد مطالعه قرار گرفته و ساختار آن گزارش شده است [9]، ولی هیچ نوعی از گیرنده IP3 انسانی مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به اینکه نوع ۲ گیرنده IP3 بالاترین افینیتی را به لیگاند دارد [10] و تاکنون بیان این پروتئین از نوع انسانی به‌صورت نوترکیب در سیستم باکتریایی بررسی نشده است، بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی بیان، تخلیص و تعیین خصوصیات ساختاری دومین متصل‌شونده به IP3 گیرنده نوع ۲ انسانی بود.

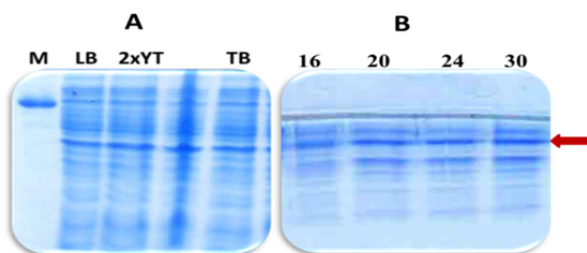
مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، پلاسمید pET-28a حامل ژن IP3BD با روش شیمیایی به داخل باکتری‌های بیانی /شرشیاکی سویه BL21 (DE3) منتقل شد. باکتری حامل پلاسمید روی محیط لوریا برتانی (LB) آگار، کشت و یکی از کلونی‌ها وارد ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB (تریپتون ۱۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۵ گرم بر لیتر و سدیم کلرید ۱۰ گرم بر لیتر) حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین شد و به مدت ۱۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C با دور ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد (۱/۵~چگالی نوری). سپس ۵۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط LB حاوی کانامایسین اضافه و در انکوباتور در دمای ۳۷°C و با دور ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا به چگالی نوری (OD) حدود ۰/۹-۰/۸ برسد. سپس لاکتوز ۴ میلی‌مولار و ایزوپروپیل-بتا-دی‌تیوگلاکتوپیرانوزید (IPTG) نیم‌میلی‌مولار اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰°C و با دور ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس این سوسپانسیون در دمای ۴۲°C با دور ۲۲۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه شوک حرارتی داده شد. برای ادامه مجدداً سوسپانسیون در دمای ۲۰°C با همان دور و به مدت زمان ۲۰ ساعت قرار داده شد. برای بهینه‌سازی بیان در سیستم باکتریایی، بیان در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت و دماهای بیان مختلف از جمله ۱۶، ۱۸، ۲۰ و ۲۴°C، زمان‌های ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۰ و ۲۴ ساعت بعد از القا، نوع القاکننده و غلظت‌های مختلف آن و انواع محیط کشت مایع مانند تریفیک‌براث (TB)، عصاره مخمر و تریپتون 2X (2xYT) و LB نیز تست شد. پس از بررسی متغیرهای مختلف و بیان ضعیف پروتئین، با توجه به تجارب آزمایشگاهی مبنی بر بیان بیشتر پروتئین در باکتری با القای شوک حرارتی، در انتها در دما و زمان انتخابی، محیط کشت حاوی باکتری در ابتدای القا، در معرض شوک حرارتی به مدت ۳۰ دقیقه و دمای

یافته‌ها

بیان پروتئین: پروتئین مورد نظر در محیط‌های LB و TB و 2xYT بیان قابل توجهی نداشت و بیان در محیط کشت‌های مختلف تغییری نداشت (شکل ۱-A) و در زمان‌های مختلف تغییری در آن مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده است). از آنجایی که بیان در محیط کشت‌های مختلف تغییری نداشت، برای ادامه کار از محیط LB استفاده شد.

در شرایط القا در محیط کشت LB با غلظت ثابت ۵/۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۱۶ تا ۲۴°C به مدت ۲۰ ساعت و در دمای ۳۰ و ۳۷°C به مدت ۸ ساعت، بیان در زمان ثابت با افزایش دما تا حدودی افزایش یافت (شکل ۱-B).



شکل ۱) ژل SDS-PAGE پروتئین IP3BD در محیط کشت‌ها و دماهای مختلف (A) محیط‌های کشت مختلف LB، 2xYT، TB و (B) دماهای مختلف ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۳۰°C

در محیط کشت LB در دمای ۲۰°C در غلظت‌های مختلف القاکننده IPTG و لاکتوز بیان به مدت ۲۰ ساعت انجام و در غلظت یک و ۵/۵ میلی‌مولار IPTG تفاوت قابل توجهی در میزان بیان پروتئین مشاهده نشد و برای ادامه کار از ۵/۵ میلی‌مولار IPTG استفاده شد. بیان پروتئین در ۵/۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۲۰°C براساس شوک حرارتی ۴۲°C نسبت به تمام حالات بیشتر بود (شکل ۲).



شکل ۲) نتایج بیان دمای ۲۰°C با غلظت ۵/۵ میلی‌مولار به مدت ۲۰ ساعت در حالت معمولی و القای شوک حرارتی ۴۲°C از سمت چپ به ترتیب ۱- مارکر پروتئینی (۶۲ کیلو دالتون) - ۲- بیان در حالت القای شوک حرارتی ۳- بیان در شرایط معمولی

استخراج و تخلیص پروتئین: تخلیص پروتئین باکتری‌های القا شده براساس شوک حرارتی به سختی تکرار می‌شد و اکثر اوقات همراه با ناخالصی نسبتاً زیادی همراه بود و نمونه‌های خالص‌شده نیز غلظت بالایی نداشتند (شکل ۳).

۴۲°C قرار داده شد. برای این کار باکتری حامل پلاسمید پس از القا با ۵/۵ میلی‌مولار IPTG به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰°C قرار داده شد، سپس محیط القا شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲°C قرار گرفت و مجدداً به دمای ۲۰°C انتقال داده شد و در زمان ۱۸ ساعت نمونه بیان‌شده برداشته و روی ژل SDS-PAGE تست شد. **استخراج محتوای سلولی:** باکتری‌های القا شده، سانتریفیوژ (۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴°C) و سپس رسوب باکتری در بافر لیز (تریس- باز ۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۵ میلی‌مولار، ۳۰۰ سدیم کلرید (NaCl) و pH برابر با ۷/۸) حل و بعد از آن باکتری‌ها توسط امواج ماورای صوت (سونیکاتور) لیز شدند. سونیکاسیون شامل ۱۵ مرحله ۲۰ ثانیه‌ای با ۴۰ ثانیه فاصله بین هر مرحله بود و روی یخ انجام شد. سپس محتوای سلولی حاصل از سونیکاسیون به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و محلول رویی برای تخلیص پروتئین از رسوب جدا شد.

تخلیص پروتئین: پروتئین دومین متصل‌شونده به IP3 دارای یک دنباله هیستیدینی (His-tag) در انتهای آمینی خود است، بنابراین تخلیص این پروتئین از طریق کروماتوگرافی میل ترکیبی و استفاده از رزین‌نیکل- سفارز انجام گرفت. بدین منظور ابتدا ستون با بافر تعادل (تریس- باز ۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۵ میلی‌مولار، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و pH برابر با ۷/۸) شسته و سپس محتوای پروتئینی حاصل از لیز سلولی (مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ) از ستون عبور داده شد. شست‌وشوی ستون برای خروج پروتئین‌های فاقد دنباله هیستیدینی با اتصالات ضعیف توسط بافر شست‌وشو (تریس- باز ۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۲۰ میلی‌مولار، ۲۰ میلی‌مولار NaCl و pH برابر با ۷/۸) انجام گرفت. به منظور افزایش خلوص پروتئین از بافر شست‌وشو با شیب ایمیدازول ۵، ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار به ترتیب استفاده شد. سرانجام برای جداسازی نهایی پروتئین که از طریق دنباله هیستیدینی با رزین میان‌کنش برقرار کرده، از بافر خروج (تریس- باز ۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار، ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl و pH برابر با ۷/۸) استفاده شد. ایمیدازول با هیستیدین رقابت کرده و باعث جداسازی پروتئین از رزین و خروج آن از ستون می‌شود. نمونه‌های خارج شده از ستون پس از اضافه کردن گلیسرول با غلظت نهایی ۱۰٪ در فریجر با دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

کنترل خلوص پروتئین: از روش سدیم دودوسیل سولفات- الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) برای تعیین درجه خلوص پروتئین استفاده شد. الکتروفورز در شرایط احیایی صورت گرفت و ژل به صورت ۱۲/۵٪ ژل جداکننده و ۵٪ ژل متراکم‌کننده تهیه شد. **تعیین ساختار پروتئین:** به دلیل وجود ترکیب حلقوی ایمیدازول در محیط آنزیمی، استفاده از آن در تکنیک‌های اسپکتروسکوپی مانند فلورسانس مشکلاتی را ایجاد می‌نماید، بنابراین حذف آن از محلول الزامی است. بدین منظور از بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۷/۸ به عنوان بافر دیالیز برای خروج ایمیدازول استفاده شد که دارای تعدادی مواد افزودنی از جمله گلیسرول ۲٪، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl یک میلی‌مولار دی‌تیوتریتول (DTT)، سولفات آمونیوم یک میلی‌مولار و یک میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) است. دیالیز در دمای ۴°C به مدت ۱۴ ساعت انجام گرفت. طیف نشری فلورسانس ذاتی پروتئین‌های IP3BD در حضور و عدم حضور لیگاند IP3 با غلظت ۱۰ میکرومولار اندازه‌گیری شد.

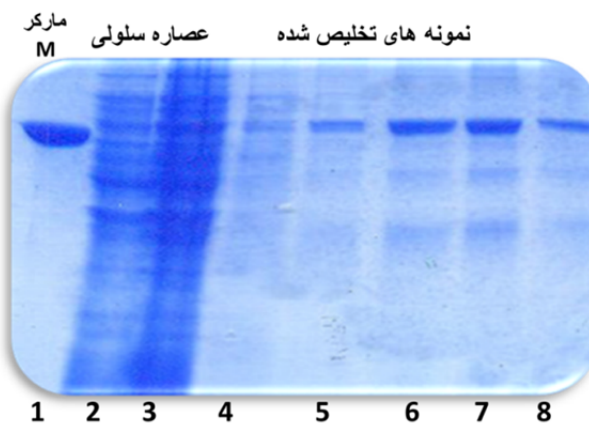
با اتصال چهار مولکول IP3 به گیرنده تترامر IP3 موجود روی غشای اندامک‌های داخل سلولی، کانال کلسیم، باز و کلسیم از ذخایر داخل سلولی به درون سیتوپلاسم رها می‌شود^[11, 12]. گیرنده IP3 از نظر ساختار و عملکرد به سه دومین اصلی زیر تقسیم می‌شود:

- ۱- دومین اتصال شونده به لیگاند که در انتهای آمینی قرار می‌گیرد.
- ۲- دومین اتصال دهنده یا تنظیم کننده که در بخش میانی قرار گرفته و باعث انتقال سیگنال از ناحیه اتصال لیگاند می‌شوند.
- ۳- دومین ایجادکننده کانال کلسیم که در انتهای کربوکسیلی قرار می‌گیرد.

دومین اتصال به IP3 در سیتوپلاسم سلول قرار می‌گیرد، اما دو دومین دیگر پروتئین، درون غشای اندامک‌ها هستند^[13]. نوع ۲ گیرنده IP3 بالاترین افینیتی را به لیگاند دارد^[14] و تاکنون بیان این پروتئین از نوع انسانی به صورت نوترکیب در سیستم باکتریایی بررسی نشده است. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که بیان این پروتئین در باکتری خیلی ضعیف بود و تکرارپذیری خوبی نداشت. شرایط مختلف بیان اعم از محیط کشت‌های مختلف باکتری، القاکنده‌های مختلف با غلظت‌های متفاوت، زمان و دماهای مختلف بیان، مورد بررسی قرار گرفت. نهایتاً در محیط بیان باکتری، شوک حرارتی القا شد. در حالت القای شوک ۴۲°C بیان پروتئین تا حدود نسبتاً زیادی افزایش یافت. احتمالاً در اثر القای حرارت، یک سری مسیرهای باکتریایی فعال شد که در بیان پروتئین نوترکیب اثر مثبت داشتند. این کار قبلاً در آزمایشگاه به منظور محلول کردن پروتئین‌های نامحلول انجام شده بود که به طور جالبی باعث افزایش بیان پروتئین هم در حالت محلول و هم نامحلول شده است. در حالتی که پروتئین بیان شده از حالت نامحلول به فرم محلول تبدیل شود، به دلیل بیان چاپرون‌های سلول در اثر شوک حرارتی بوده است^[15]، ولی علت افزایش میزان بیان پروتئین در اثر شوک حرارتی تاکنون گزارش نشده است. در پژوهش حاضر نیز شوک حرارتی باعث افزایش بیان پروتئین شد، ولی مکانیزم آن هنوز ناشناخته است.

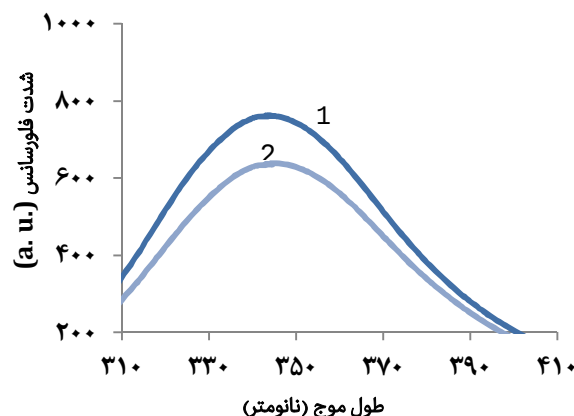
تخلیص پروتئین بیان شده با استفاده از رزین نیکل - سفارز نیز مانند بیان آن پیچیده بود. در اکثر اوقات پروتئین‌های غیراختصاصی زیادی همراه با پروتئین مورد نظر از ستون خارج می‌شد و گاهی اوقات در شیب‌های مختلف ایمیدازول پروتئین مورد نظر نیز شسته و از ستون خارج شد. نهایتاً پروتئین با غلظت نسبتاً کمی تخلیص شد. سپس دومین اتصال به لیگاند نوع ۲ انسانی در حالت اتصال و عدم اتصال لیگاند IP3 مورد مطالعه کانفورماسیونی توسط فلورسانس ذاتی قرار گرفت. طیف نشری فلورسانس ذاتی پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند IP3 (با غلظت ۱۰ میکرومولار) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که نشر فلورسانس پروتئین در حضور لیگاند کاهش یافت. این کاهش نشر بیانگر این بود که در حضور لیگاند در بنای فضایی پروتئین تغییر رخ داده که منجر به در معرض حلال قرارگرفتن باقیمانده‌های آروماتیک درونی شده است و این انتقال از محیط آب‌گریز (هیدروفوب) به محیط قطبی سبب کاهش شدت فلورسانس پروتئین شده است. در واقع، کاهش نشر می‌تواند به علت قرارگرفتن فلوروفورهای آن در محیط آب‌دوست‌تر (هیدروفیل‌تر) باشد.

پژوهش حاضر محدودیتی نداشت. پیشنهاد می‌شود که بیان پروتئین مورد نظر در سیستم‌های یوکاریوتی مانند مخمر انجام شود. شاید به علت این که این پروتئین منشا انسانی دارد، بیان باکتریایی آن ضعیف باشد.



شکل ۳) ژل SDS-PAGE تخلیص پروتئین IP3BD با ستون کروماتوگرافی تمایلی
M- مارکر پروتئین (۶۲ کیلو دالتون) - ۲- عصاره سلول قبل القا
۳- عصاره سلول بعد از القا ۴ تا ۸- نمونه‌های تخلیص شده به ترتیب خروج از ستون

مطالعات ساختاری فلورسانس ذاتی پروتئین IP3BD در حضور و عدم حضور لیگاند IP3: نشر فلورسانس پروتئین در حضور لیگاند IP3 کاهش یافت. این کاهش نشر بیانگر این بود که در حضور لیگاند IP3 در بنای فضایی پروتئین تغییر رخ داد (نمودار ۱).



نمودار ۱) طیف نشری فلورسانس ذاتی پروتئین IP3BD در حضور و عدم حضور لیگاند IP3
طیف ۱ در عدم حضور لیگاند IP3 و طیف ۲ در حضور لیگاند IP3 است.

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی بیان، تخلیص و تعیین خصوصیات ساختاری دومین متصل شونده به IP3 گیرنده نوع ۲ انسانی انجام شد. بسیاری از فعالیت‌های سلولی تحت تأثیر مولکول‌های کوچک و تأثیرگذار مانند هورمون‌ها، مهارکننده‌ها و پیام‌برهای ثانویه تغییر می‌کنند. اتصال مولکول‌های کوچک موجب تغییر کانفورماسیون دومین دارای جایگاه اتصال به لیگاند می‌شود. کلسیم داخل سلولی در کنترل بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند تقسیمات سلولی، رشد سلولی، مرگ سلولی و آپوپتوز، انتقال‌های پیام‌های عصبی و غیره نقش مهمی دارد. محرک‌های خارج سلولی باعث فعال شدن G- پروتئین‌ها و فسفولیپاز- C (PLC) فعال می‌شود. فسفولیپاز- C منجر به هیدرولیز PLP₂ و تبدیل آن به IP3 و DAG می‌شود.

- subtypes in other normal and transformed blood cells. *Biochem J.* 1995;312(Pt 2):499-503.
- 6- Mignery GA, Newton CL, Archer BT 3rd, Südhof TC. Structure and expression of the rat inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12679-83.
- 7- Yamamoto-Hino M, Sugiyama T, Hikichi K, Mattei MG, Hasegawa K, Sekine S, et al. Cloning and characterization of human type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Receptors channels.* 1994;2(1):9-22.
- 8- Maranto AR. Primary structure, ligand binding, and localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 1994;269(2):1222-30.
- 9- De Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Bootman MD, Mertens L, Van Den Bosch L, et al. Determination of relative amounts of inositol trisphosphate receptor mRNA isoforms by ratio polymerase chain reaction. *The J biol chem.* 1994;269(34):21691-8.
- 10- Taylor CW, Da Fonseca PCA, Morris EP. IP₃ receptors: The search for structure. *Trends biochem sci.* 2004;29(4):210-9.
- 11- Furuichi T, Simon-Chazottes D, Fujino I, Yamada N, Hasegawa M, Miyawaki A, et al. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r 1) in the mouse central nervous system. *Receptors channels.* 1993;1(1):11-24.
- 12- Yoshida Y, Imai S. Structure and function of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Jpn J pharmacol.* 1997;74(2):125-37.
- 13- Bosanac I, Alattia JR, Mal TK, Chan J, Talarico S, Tong FK, et al. Structure of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in complex with its ligand. *Nature.* 2000;420(6916):696-700.
- 14- Ataei F, Torkzadeh-Mahani M, Hosseinkhani S. A novel luminescent biosensor for rapid monitoring of IP₃ by split-luciferase complementary assay. *Biosens Bioelectron.* 2013;41:642-8.
- 15- Arsène F, Tomoyasu T, Bukau B. The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol.* 2000;55(1-3):3-9.

نتیجه‌گیری

بیان باکتریایی دومین متصل‌شونده به IP₃ از گیرنده نوع ۲ گونه انسانی ضعیف است، ولی با القای شوک ۴۲°C بیان پروتئین تا حدود نسبتاً زیادی افزایش می‌یابد. اتصال لیگاند به پروتئین متصل‌شونده به IP₃ نمایانگر تغییر ریزمحیط‌های آروماتیک است.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: موردی وجود نداشته است.

سهم نویسندگان: مرضیه نخعی‌امروودی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۵۰٪)؛ فرنگیس عطایی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: این تحقیق با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 1993;361(6410):315-25.
- 2- Berridge MJ. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature.* 1993;365(6445):388-9.
- 3- Maeda N, Niinobe M, Mikoshiba K. A cerebellar Purkinje cell marker P400 protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor protein. Purification and characterization of InsP₃ receptor complex. *EMBO J.* 1990;9(1):61-7.
- 4- Koga T, Yoshida Y, Cai JQ, Islam MO, Imai S. Purification and characterization of 240-kDa cGMP-dependent protein kinase substrate of vascular smooth muscle. Close resemblance to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 1994;269(15):11640-7.
- 5- O'Rourke F, Matthews E, Feinstein MB. Purification and characterization of the human type 1 Ins(1,4,5)P₃ receptor from platelets and comparison with receptor