



Cloning, Expression, and Purification of Recombinant CEL I Endonuclease in HEK293T Cell Line

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Askari S.¹ MSc,
Hasannia S.^{*1} PhD,
Hassan Sajedi R.¹ PhD,
Yassaee V.R.² PhD

How to cite this article

Askari S, Hasannia S, Hassan Sajedi R, Yassaee V.R. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant CEL I Endonuclease in HEK293T Cell Line. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3):473-481.

¹Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
²"Genomic Research Center" and "Medical Genetics Department, Medicine Faculty", Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884744
Fax: +98 (21) 82884717
hasannia@modares.ac.ir

Article History

Received: October 27, 2018
Accepted: December 15, 2018
ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

CEL I endonuclease pertaining to the S1 endonuclease family. The enzyme, with its high specificity, has the ability to identify different types of mutations and base replacement in the DNA molecule, which makes it important in commercial products to use in research and clinical laboratories. Although the enzyme exists in the celery plant, the extraction of the enzyme is a time-consuming process and not economical and the yield of the final product is low. In addition, due to its post-translational modifications to achieve the final active structure, no report has published to indicate the expression of the active form of this enzyme in the bacterial hosts yet. Therefore, one of the production sources of the active form of this enzyme is its cloning and expression in eukaryotic hosts, including yeast and mammalian cell lines. In this study, in order to express CEL I endonuclease, its gene sequence was optimized and synthesized in host eukaryotic HEK293T. CEL I was subcloned by double digest with KpnI and XhoI enzymes in the pBudCE4.1 expression vector. The expression construct was transfected into the HEK293T cell line by lipofectamine transfection. Expression of the recombinant protein after transfection into HEK293T cells was confirmed by multiple methods including polyacrylamide gel electrophoresis, ELISA, RT-PCR, and western blot reaction. The analysis of SDS-PAGE and western blot data confirmed the molecular weight of approximately 30kDa. Purification was carried out with the Ni-NTA column and the amount of purified protein was determined to be about 0.2mg/ml. Finally, the activity of endonuclease enzyme was investigated on both normal and mutated heteroduplex DNA amplified by PCR. The results showed that the expression of this protein in HEK293T host had shown sufficient activity.

Keywords CEL I Endonuclease; HEK293T Cell Line; Heteroduplex DNA

CITATION LINKS

[1] Mutation detection using a novel plant ... [2] Purification, cloning, and characterization of the CEL I ... [3] sunTILL: A TILLING resource for gene function analysis in ... [4] High-throughput screening for induced point ... [5] Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional ... [6] A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume Lotus ... [7] Rapid method for detecting SNPs on agarose gels and its application in candidate gene ... [8] Mismatch cleavage by single-strand specific ... [9] Enzymatic mutation detection ... [10] Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation ... [11] Production and characterization of the celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm expression ... [12] Single-strand-specific ... [13] Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by ... [14] Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of ... [15] Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases and ... [16] Productivity and quality of recombinant proteins produced by stable CHO cell clones can be ... [17] Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein ... [18] Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted ... [19] Mutation detection using Surveyor™ ... [20] He F. 23 users have reported that they have successfully carried out the experiment using this ... [21] He F. Bradford ... [22] The role of some amino acid residues in coelenterazine binding site of mnemiopsin compared to ... [23] Comparative assessment of mutations in mtDNA of x-irradiated mice using mismatch-specific ... [24] Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon ... [25] Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ... [26] Possible involvement of inefficient cleavage of preprovasopressin by signal peptidase as ... [27] Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon ... [28] Single-molecule FRET studies on DNA mismatch ... [29] CEL I enzymatic mutation detection ...

کلونینگ، بیان و تخلیص اندونوکلاز CEL I نوترکیب در رده سلولی HEK293T

سودابه عسکری MSc

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

صادق حسن‌نیا^۱ PhD

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

رضا حسن‌ساجدی PhD

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

وحیدرضا یاسایی PhD

"مرکز تحقیقات ژنومیکس" و "گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی"، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

اندونوکلاز CEL I، آنزیمی از خانواده S1 اندونوکلازها است. این آنزیم، با اختصاصیت بالا، توانایی شناسایی انواع جهش‌ها و جایگزینی بازها در مولکول DNA را دارد که این امر اهمیت آن را در قالب محصولات تجاری به‌منظور مصارف تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های بالینی دوچندان می‌کند. اگرچه این آنزیم در گیاه کرفس یافت می‌شود اما به‌دلیل زمان‌بر بودن فرآیند استخراج و همچنین بازدهی کم محصول نهایی، استخراج آن مقرون‌به‌صرفه نیست. علاوه بر این، با توجه به لزوم اعمال تغییرات پس از ترجمه برای دستیابی به ساختار فعال نهایی، تاکنون گزارشی مبنی بر بیان فرم فعال این آنزیم در میزبان‌های باکتریایی مشاهده نشده است. بنابراین یکی از منابع تولید فرم فعال این آنزیم، کلون و بیان آن در میزبان‌های یوکاریوتی از جمله مخمر و رده‌های سلولی پستانداران است. در این مطالعه، توالی ژن به‌منظور بیان در میزبان یوکاریوتی HEK293T بهینه‌سازی و سنتز شد. سپس توسط هضم دوگانه با آنزیم‌های *XhoI* و *KpnI* در وکتور بیانی pBudCE4.1 ساب‌کلون شد. سازه بیانی مورد نظر توسط لیپوفکتامین به رده سلولی HEK293T ترانسفکت و بیان پروتئین نوترکیب از طریق روش‌های متعددی از جمله SDS-PAGE، الایزا، واکنش نسخه‌برداری معکوس و وسترن بلات تایید شد. آنالیز داده‌های SDS-PAGE و وسترن بلات وزن مولکولی در حدود ۳۰ کیلو دالتون را تایید کرد. تخلیص با ستون حاوی رزین Ni-NTA انجام و مقدار پروتئین در حدود ۲/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین غلظت شد. در نهایت فعالیت اندونوکلازی آنزیم، روی DNA هتروپلکس حاصل از محصول PCR ژن جهش‌یافته و وحشی بررسی شد. نتایج نشان داد که بیان این پروتئین در میزبان HEK293T فعالیت مناسبی دارد.

کلیدواژه‌ها اندونوکلاز CEL I، رده سلولی HEK293T، DNA هتروپلکس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۴

*نویسنده مسئول: hasannia@modares.ac.ir

مقدمه

آنزیم اندونوکلاز CEL I یک مانوزیل گلیکوپروتئین ترشحی حاوی یون روی است که اولین بار از گیاه کرفس (*Apium graveolens*) استخراج شد^[۱]. این آنزیم متعلق به گروه هیدرولازهای خانواده S1 بوده و سوبسترای آن DNA دورشته‌ای است. یکی از برتری‌های این آنزیم در تشخیص نقاط جهش‌یافته، عدم مهارش در حضور محتوای بالای بازهای GC در سوبسترای DNA خود است. از دیگر ویژگی‌های این آنزیم، می‌توان به pH بهینه ۷/۵ و دمای بهینه

۴۵°C اشاره کرد^[۲]. کاربردهای تحقیقاتی گسترده آنزیم‌های اندونوکلاز CEL I و CEL II (آنزیم CEL II ارتولوگ آنزیم CEL I است) و توانایی‌های ویژه آنها جهت تعیین انواع جهش‌ها باعث شده است که امروزه مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گیرند^[۱]. فرآیند طولانی، پرهزینه و کم‌بازده تخلیص از یک طرف و خروج همزمان ارتولوگ‌های آنها با فعالیت اندونوکلازی مشابه در طی فرآیند تخلیص از طرف دیگر، باعث شده است استفاده از فرم‌های وحشی این آنزیم‌ها با مشکل مواجه شود^[۲]. برای غلبه بر این مشکل می‌توان این آنزیم را به‌صورت نوترکیب و با اضافه‌کردن دنباله‌های خاص مثل دنباله پلی‌هیستیدینی تولید کرد. تهیه پروتئین به روش نوترکیب علاوه بر تولید مقادیر زیاد آنزیم در مدت‌زمان کوتاه، می‌تواند نوکلئازهایی با خواص آنزیمی بهتر نسبت به حالت وحشی آن را ایجاد کند. به‌طور مثال، می‌توان به نوکلئاز SPI که ارتولوگ CEL I است، اشاره کرد^[۱۰]. از دیگر مزیت‌های تولید پروتئین با این روش، امکان دست‌ورزی ژن مورد نظر به‌منظور افزایش کارایی و فعالیت آنزیم است. به‌طور مثال، تغییر و جایگزینی یون‌های Ca^{2+} و Sr^{2+} به جای Mg^{2+} ، منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم CEL II شده است^[۱۱]. با این حال، بیشتر آنزیم‌های اندونوکلاز از نوع گلیکوپروتئین‌های تک‌رشته‌ای و خارج سلولی هستند. بنابراین، بیان آنها در اغلب سیستم‌های بیانی مرسوم مشکل‌ساز خواهد شد. برای مثال، تاکنون تلاش برای بیان CEL I فعال در سیستم‌های پروکاریوتی، ناموفق بوده است^[۱۲]. به‌دلیل اهمیت خانواده آنزیمی S1، تلاش‌های زیادی در زمینه تولید فرم نوترکیب این آنزیم‌ها صورت گرفته است. از آن جمله تولید نوکلئاز SPI و CEL I نوترکیب در سیستم باکلوویروس^[۱۰]، تولید نوکلئاز ENDO1 و CEL I نوترکیب به‌صورت بیان موقت در میزبان آگروباکتریوم^[۱۳]، و کلون‌کردن توالی cDNA آنزیم CEL I در باکتری را می‌توان نام برد^[۲]. توالی cDNA آنزیم CEL I در سیستم بیانی توپاموویروس از طریق آلوده‌سازی برگ‌های توتون به‌صورت نوترکیب بیان شد اما به عملکرد آنزیم اشاره‌ای نشده است^[۱۴]. بهینه‌سازی و بیان توالی ژن آنزیم CEL I در سلول مخمر در سال ۲۰۰۴ توسط بارون و همکاران انجام شد. در مطالعه آنها اشاره شد که این آنزیم نوترکیب انواع لوپ‌های جفت‌باز ناجور و همچنین لوپ A/A را برش می‌دهد اما به ترجیح سوبسترای این آنزیم نوترکیب اشاره‌ای نداشت^[۱۴]. همچنین بیان آنزیم CEL I نوترکیب در برگ‌های توتون با استفاده از روش آگرواینفیلتراسیون به‌صورت بیان موقت در آگروباکتریوم توسط بندهمان و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت. آنها بیان کردند که آنزیم CEL I نوترکیب کمیت و کیفیت بالاتری نسبت به نوع طبیعی آن دارد به‌طوری که علاوه بر شناسایی انواع لوپ‌های جفت‌باز ناجور، لوپ‌های T/T که به ندرت توسط آنزیم CEL I طبیعی شناسایی می‌شوند را نیز تشخیص می‌دهد^[۱۵].

با توجه به اهمیت تولید آنزیم CEL I، برای کاربرد در زمینه‌های تجاری، تحقیقاتی و بالینی، از یک طرف و نامناسب بودن سیستم بیانی پروکاریوتی از طرف دیگر، استفاده از سیستم بیانی مناسب و

همزمان با این دو آنزیم مورد هضم دوگانه قرار گرفتند. سپس قطعه ژنی و پلاسمید حاصل از هضم آنزیمی برای انجام واکنش الحاق توسط DNA T4 لیگاز به کار رفت. پلاسمید نوترکیب به میزبان مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α (اینویتروژن؛ ایالات متحده آمریکا) از طریق روش شوک حرارتی انتقال پیدا کرد. لازم به ذکر است که وکتور pBudCE4.1 دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ژئوسین است. بنابراین درنهایت سلول‌های *E. coli* حاوی پلاسمید نوترکیب در شرایط هوازی در ۳۷°C در LB مایع با ژئوسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت و استخراج پلاسمید برای عمل ترانسفکت انجام شد. برای تایید کلونینگ سازه مورد نظر در وکتور pBudCE4.1 از روش‌های کلونی PCR، هضم یگانه با آنزیم KpnI و هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودالایر KpnI و XhoI استفاده شد. برای تایید نهایی از کلونی‌های تاییدشده استخراج پلاسمید انجام و برای تعیین توالی ارسال شد. نتیجه تعیین توالی حضور ژن و توالی صحیح آن را تایید کرد. برای انجام کلونی PCR از توالی ATGACCAGGCTGTACTCCGTG به‌عنوان پرایمر پیشرو، و توالی CCAGCACCTGTTCAGGATCA به‌عنوان پرایمر معکوس استفاده شد.

کشت سلول‌های HEK293T و انجام ترانسفکشن: رده سلولی HEK293T در شرایط استریل با استفاده از محیط کشت DMEM/ F12 حاوی ۱۰% سرم، ۱% از مخلوط آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین و ۱% گلوتامکس در شرایط انکوباتور CO₂ (۵%) دارای رطوبت مناسب و دمای ۳۷°C کشت داده شد. سپس سه‌بار پاساژ سلولی صورت گرفت و پس از این که سلول‌ها به درصد تجمعی نزدیک به ۷۰% رسیدند، سازه ژنی از طریق لیپوفکتامین (Freestyle TM Max؛ اینویتروژن؛ ایالات متحده آمریکا) براساس روش کار کیت به سلول‌های HEK293T به‌منظور بیان موقت ترانسفکت شد. به‌منظور تایید درستی انجام ترانسفکت، به‌طور همزمان ترانسفکت ژن گزارشگر GFP نیز صورت گرفت. سپس بیان ژن CEL I به‌طور غیرمستقیم به‌وسیله میکروسکوپ فلوروسنت به واسطه بیان ژن‌های فلوروسنتی GFP به‌عنوان ژن گزارشگر مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی بیان پروتئین نوترکیب

واکنش نسخه‌برداری معکوس: پس از رشد سلول‌ها و رسیدن به درصد تجمعی مناسب، سلول‌ها جمع‌آوری شده و از آنها استخراج RNA کل با استفاده از روش کار کیت RNXTM Total RNA Isolation (بیونیر؛ کره‌جنوبی) صورت گرفت. غلظت RNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ تعیین و کیفیت آن با ژل آگارز ۱% بررسی شد. در مرحله بعد cDNA با استفاده از پرایمر الیگو dT ساخته شد. صحت ساخت cDNA با پرایمرهای طراحی‌شده برای یک قسمت از ژن CEL I موزد بررسی قرار گرفت. برای انجام RT-PCR، توالی AGGTGGTTCAGGCACAAGTC به‌عنوان پرایمر پیشرو، و توالی AGATGTCGTCGACTCCTTC به‌عنوان پرایمر معکوس به کار رفتند. سپس محصول PCR روی ژل

با کارایی بالا برای تولید آنزیم‌های فعال و مشابه فرم‌های وحشی، امری ضروری است. با این حال محبوب‌ترین رده سلولی برای بیان موقت پروتئین‌ها، رده سلولی HEK است که می‌تواند تیترا بالایی از پروتئین نوترکیب را تولید کند. هر چند سلول‌های CHO برای بیان پایدار به‌صورت گسترده استفاده می‌شوند اما برای تولید مقدار قابل قبول پروتئین در بیان موقت مناسب نیست. در ضمن تا به حال بیان آنزیم CEL I در میزبان HEK293T گزارش نشده است [16-18]. با توجه به این که آنزیم CEL II به‌صورت کیت تجاری وارداتی تحت نام Surveyor™ nuclease موجود است (ترانس ژنومیک؛ ایالات متحده آمریکا) و همچنین اطلاعات چندانی از جزئیات طراحی آن در دسترس نیست [19]. بنابراین، انجام این تحقیق به‌منظور ارزیابی امکان استفاده از آنزیم CEL I به‌عنوان جایگزینی برای آنزیم CEL II در طراحی کیت‌های تشخیصی در آینده، حائز اهمیت است. در این مطالعه در راستای دسترسی به اهداف پیش‌رو، بهینه‌سازی بیان و تولید آنزیم نوترکیب در رده سلولی HEK293T با قابلیت خالص‌سازی آسان بررسی شد و درنهایت نیز عملکرد آنزیم در تشخیص DNA هترو دوپلکس مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد: در این مطالعه کیت استخراج پلاسمید، استخراج DNA از ژل و کیت استخراج RNA (GeneAil؛ کره‌جنوبی) و آنزیم‌های محدودکننده و لیگاز (فرمنتاز؛ ایالات متحده آمریکا)، محیط کشت سلولی (DMEM/F12)، سرم گاوی (FBS)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین، محلول تریپسین (گیبوکو؛ ایالات متحده آمریکا)، رزین Ni-NTA (کیاژن؛ ایالات متحده آمریکا)، و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده (سیگما آلدریج؛ ایالت متحده آمریکا، مرک؛ آلمان) تهیه شدند.

طراحی سازه: توالی ژن CEL I با شماره دسترسی Q9LL59 از بانک ژنی NCBI به دست آمد. سپس با توجه به این که از سیستم بیانی یوکاریوتی برای ادامه فرآیند استفاده می‌شد، ژن براساس ارجحیت کدونی به‌منظور درج در وکتور یوکاریوتی pBudCE4.1 (اینویتروژن؛ ایالات متحده آمریکا) و تولید پروتئین توسط سیستم بیانی HEK293T بهینه شد. سپس یک سازه شامل ژن بیان‌کننده پروتئین CEL I بین جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودالایر KpnI در انتهای ۵' و XhoI در انتهای ۳' همراه با یک دنباله تمایلی پلی‌هیستیدینی در انتهای ۵' ژن طراحی شد. به‌منظور بیان ترشحي پروتئین نوترکیب، قطعه کزاک و یک توالی سیگنال پپتید در سازه طراحی‌شده، تعبیه و برای سنتز به شرکت GenScript از ایالات متحده آمریکا سفارش داده شد. از آنجایی که توالی ژن CEL I در داخل وکتور pUC57 سنتز شده بود، برای ادامه روند کار باید ژن درون وکتور pBudCE4.1 به‌عنوان وکتور بیانی درج و کلون می‌شد. پلاسمید pUC57 حاوی ژن استخراج شد. سپس توسط آنزیم‌های محدودالایر KpnI و XhoI و وکتور pBudCE4.1 نیز

تست الایزای مستقیم: ابتدا تمام چاهک‌های پلیت الایزا با ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های کاهشی پروتئین نوترکیب با غلظت اولیه ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و همچنین پروتئین‌های کنترل منفی و مثبت پوشش داده شد. سپس در دمای ۴°C به مدت یک شبانه‌روز انکوبه شد. چاهک‌ها با بافر شست‌وشوی الایزا PBST (PBS/تویین ۰/۵٪) سه‌بار شسته شدند، سپس با ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلاک‌کننده الایزا (BSA/PBST ۵٪) به مدت یک ساعت در دمای اتاق عمل بلاکینگ انجام شد. پس از سه‌بار شست‌وشو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پادتن ضد دنباله هیستیدینی کانژوگه‌شده با HRP با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (با رقت ۱:۲۰۰۰) افزوده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد و پس از چهار مرتبه شست‌وشو، سوبسترای TMB (تترامیل بنزیدین) اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن توسط اسیدسولفوریک یک‌نرمال واکنش را متوقف و جذب پلیت‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به منظور بررسی فعالیت آنزیمی با دستگاه پلیت خوان الایزا مدل آنتوس ۲۰۲۰ (بیوکروم؛ ایالات متحده آمریکا) خوانده و ثبت شد.

سدیم دودسیل سولفات- پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE): برای این منظور براساس پروتکل استاندارد، نمونه‌ها روی ژل ۱۵٪ پلی‌اکریل‌آمید، تحت شرایط احیایی، بارگذاری و در نهایت توسط رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شد [20].

وستر بلات: برای تایید پروتئین نوترکیب از روش وستر بلات استفاده شد. در این روش پس از جداسازی پروتئین‌ها براساس اندازه در ژل SDS-PAGE، پروتئین‌ها به کاغذ نیتروسولوز، طبق روش کار شرکت بایورد، انتقال داده شدند. بافر انتقال شامل تریس-باز ۲۴ میلی‌مولار، گلیسین ۲۰ میلی‌مولار و متانول ۲۰٪ است. انتقال به مدت ۲ ساعت، با ولتاژ ۱۰۰ میلی‌آمپر صورت گرفت. پس از انتقال، عمل بلاکینگ با BSA (۵٪) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و ۳ ساعت در ۴°C همراه با شیک انجام شد. در مرحله بعد غشای نیتروسولوز با پادتن ضد دنباله هیستیدینی کانژوگه‌شده با HRP با رقت ۱:۲۰۰۰ به مدت یک شبانه‌روز همراه با شیک انکوبه شد. سپس با بافر PBST شست‌وشوی غشا صورت گرفت. در نهایت کاغذ نیتروسولوز با سوبسترای محلول کمی لومینسانس (کیت ECL؛ سیتومتین ژن؛ اصفهان؛ ایران) تحت شرایط استاندارد مجاور، سپس باندهای فلورسنت روی غشا ظاهر و از این طریق حضور پروتئین نوترکیب بررسی شد.

تخلیص پروتئین

تخلیص پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده از ستون حاوی رزین Ni-NTA انجام شد. پروتئین نوترکیب در انتهای کربوکسیلی خود دنباله پلی‌هیستیدینی دارد. بیان پروتئین نوترکیب مورد نظر به صورت روش ترشحی است، بنابراین پس از ۲۴ ساعت از انجام عمل ترانسفکت، محیط روی سلول‌ها جمع‌آوری و بعد از رسوب سلول‌های مرده و تغلیظ مایع رویی به وسیله سنتریفون با اندازه منفذ ۳ کیلودالتون، به ستون حاوی

رزین Ni-NTA انتقال داده و به مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۴°C نگهداری شد. سپس با استفاده از بافر شست‌وشو (تریس-باز ۵۰ میلی‌مولار با میزان pH=۸/۲، سدیم کلرید ۳۰۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۶۰ میلی‌مولار) ستون دوبار شسته شد. در مرحله بعد با استفاده از بافر جداکننده (تریس-باز ۵۰ میلی‌مولار با میزان pH=۸/۲، سدیم کلرید ۳۰۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۲۵۰ میلی‌مولار) پروتئین از ستون جدا و تخلیص شد. پروتئین به دست آمده با استفاده از کیسه دیالیز دارای اندازه منفذ ۳ کیلودالتون در درون محلول PBS با میزان pH=۷/۲ دیالیز شد. بعد از به دست آمدن پروتئین خالص، با استفاده از روش برادفورد پروتئین نوترکیب تعیین غلظت شد [21]. برای بررسی میزان خلوص پروتئین نوترکیب، از ژل SDS-PAGE ۱۵٪ استفاده و برای ادامه کار آنزیم خالص شده در بافر آنزیم در ۲۰°C نگهداری شد.

سوبسترای آنزیم CEL I

به منظور بررسی فعالیت آنزیم تخلیص شده CEL I، به یک DNA هتروودوپلکس حاوی جفت‌باز ناجور به عنوان سوبسترا نیاز است. در نتیجه ژن کدکننده فتوپروتئین نمپوپسین و جهش یافته آن (N105W) به عنوان سوبسترا انتخاب شد [22] و با توجه به پرایمرهای طراحی شده برای هر دو ژن وحشی و جهش یافته و با استفاده از محصول PCR آنها، DNA هتروودوپلکس ساخته شد. سازه ژنی حامل ژن کدکننده نمپوپسین و جهش یافته N105W همچنین پرایمرهای پیشرو و معکوس به منظور تکثیر قطعه ژنی به طول ۶۰۰ جفت‌باز برای ناحیه‌ای از ژن وحشی و جهش یافته N105W، از آزمایشگاه دکتر ساجدی تامین شد. زمانی که قطعه ژنی جهش یافته N105W با آنزیم CEL I مورد هضم آنزیمی قرار گیرد، دو قطعه ۳۱۵ و ۲۸۵ جفت‌بازی ایجاد می‌کند. برای انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، ۵/۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (بافر PCR؛ ۲x) که حاوی $MgSO_4$ ، ۲/۲ میلی‌مول dNTP، ۱/۵ واحد آنزیم pfu DNA پلیمرز است و ۵/۵ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۲۵۰ نانوگرم استفاده شد. برنامه واکنش PCR شامل غیرطبیعی شدن اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C، غیرطبیعی شدن ثانویه برای ۴۵ ثانیه در ۹۵°C، چسبیدن پرایمرها به تک رشته‌ها ۳۰ ثانیه در ۵۵°C، طولی شدن رشته‌ها به مدت ۹۰ ثانیه در ۷۲°C برای ۳۰ چرخه و توسعه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C صورت گرفت. پس از انجام واکنش، محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

ایجاد DNA هتروودوپلکس برای بررسی فعالیت آنزیم

برای به دست آوردن DNA هتروودوپلکس، حجم برابری از محصول PCR ژن‌های وحشی و جهش یافته با هم مخلوط شدند. این مخلوط ابتدا برای واسرشته شدن رشته‌های DNA، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۹°C انکوبه شد. سپس برای ایجاد هتروودوپلکس‌های مورد نظر، به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۰°C و در مرحله بعد به آرامی با یک نرخ کاهش دمایی ۰/۳°C به ازای هر یک دقیقه (که حدوداً ۱۵۰ دقیقه به

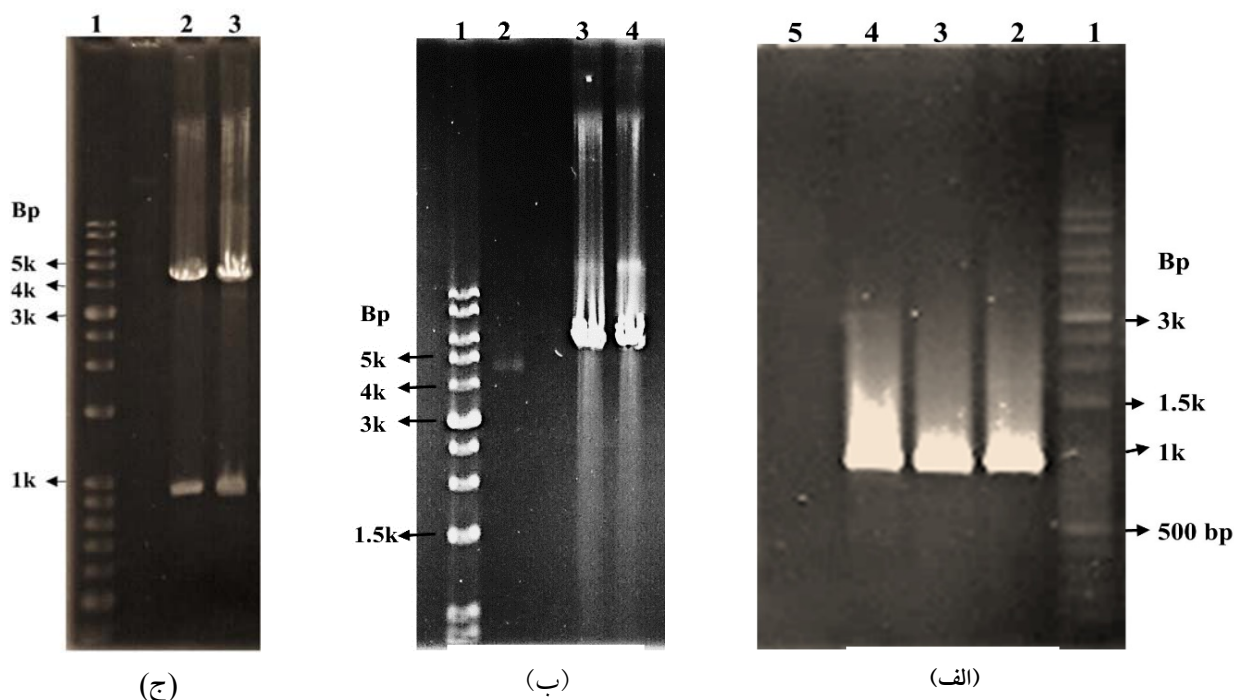
یافته‌ها

کلونینگ ژن CEL I: وکتور pUC57 حاوی ژن CEL I توسط آنزیم‌های محدودالایتر KpnI و XhoI مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. ژن CEL I برش‌خورده در وکتور pBudCE4.1 درج و به میزبان مستعد *E. coli* سویه DH5 α توسط شوک حرارتی انتقال و سپس کلون شد. برای تایید حضور ژن مورد نظر در وکتور، از روش‌های هضم یگانه، دوگانه و کلونی PCR استفاده شد. با روش کلونی PCR و با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده برای ابتدا و انتهای ژن CEL I، قطعه‌ای به طول ۱۰۰۰ جفت‌باز تکثیر شد (شکل ۱-الف). واکنش هضم یگانه با آنزیم KpnI حضور ژن به همراه وکتور با طول حدود ۵۶۰۰ جفت‌باز (شکل ۱-ب) و واکنش هضم دوگانه با دو آنزیم KpnI و XhoI وجود قطعه ژنی با طول ۱۰۰۰ جفت‌باز را تایید کرد (شکل ۱-ج). سپس از کلونی‌های تاییدشده، استخراج پلاسمید انجام شد و برای تایید نهایی برای تعیین توالی ارسال و حضور ۱۰۰٪ ژن مورد نظر مورد تایید قرار گرفت.

طول انجامید) به دمای ۳۰°C رسانده شد. این عمل با استفاده از قابلیت انکوباسیون دمایی دستگاه PCR صورت گرفت [23].

بررسی فعالیت آنزیم CEL I

آنزیم CEL I دارای یک ویژگی بالا برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای است. در حضور این آنزیم علاوه بر شناسایی جفت‌باز ناجور، می‌توان جایگاه آن را نیز از طریق تعداد قطعات حاصل از برش آنزیم، تشخیص داد. واکنش اندونوکلازی در حضور آنزیم CEL I در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۰ میکرولیتر DNA هتروپلکس، ۵ میکرولیتر آنزیم CEL I و ۵ میکرولیتر بافر (X) آنزیم که شامل بافر HEPES ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷/۵، کلریدپتاسیم ۱۰ میلی‌مولار، کلریدمنیزیم ۱۰ میلی‌مولار، تریتیون X-100 با غلظت ۰/۰۲٪ حجمی-حجمی و BSA با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است. پس از انکوبه‌شدن آنزیم با مخلوط واکنش در دمای ۴۵°C، واکنش بعد از یک ساعت با استفاده از EDTA ۷۵ میلی‌مولار متوقف شد. مخلوط واکنش هضم آنزیمی روی ژل ۱٪ آگارز مورد بررسی قرار گرفت [8, 9].

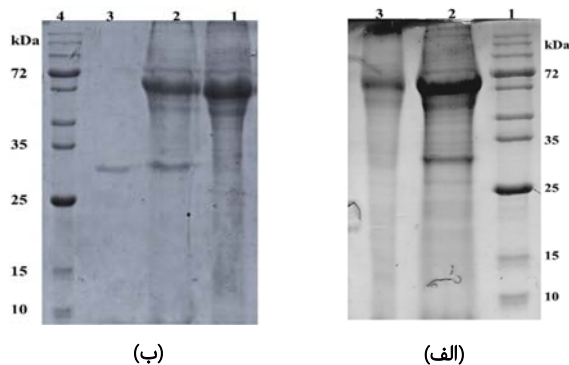


شکل ۱ (الف) نتیجه ژل آگارز داده‌های حاصل از روش کلونی PCR: وجود قطعه‌ای در حدود ۱۰۰۰ جفت‌بازی با توجه به پرایمرهای طراحی‌شده، کلونی‌های مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب را تایید نمود. ۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- پلاسمید pUC57+CEL I، ۳ و ۴- دو کلونی مثبت انتخاب‌شده، ۵- پلاسمید pBudCE4.1 فاقد ژن، (ب) واکنش هضم یگانه با آنزیم KpnI، نتایج هضم یگانه دو کلونی مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب روی ژل آگارز ۱٪ و قرارگرفتن پلاسمیدها در موقعیت بالاتر نسبت به کنترل منفی، وجود ژن را تایید می‌کند. ۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- پلاسمید pBudCE4.1 فاقد ژن به‌عنوان کنترل منفی ۳ و ۴- هضم یگانه پلاسمید نوترکیب pBudCE4.1+CEL I دو کلونی مثبت. (ج) واکنش هضم دوگانه با دو آنزیم KpnI و XhoI، نتایج هضم دوگانه دو کلونی مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب pBudCE4.1+CEL I روی ژل آگارز ۱٪، وجود دو قطعه در حدود ۱۰۰۰ و ۴۶۰۰ جفت‌بازی که به‌ترتیب مربوط به ژن و وکتور است، وجود قطعه ژنی مورد نظر را تایید می‌کند. ۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲ و ۳- هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب pBudCE4.1+CEL I دو کلونی مثبت

۲۰۰ جفت‌بازی (شکل ۲) مشاهده شد و حضور mRNA پروتئین CEL I در سلول‌های HEK293T ترانسفکت‌شده مورد تایید قرار گرفت.

واکنش نسخه‌برداری معکوس: به‌منظور بررسی بیان ژن در سطح RNA از روش RT-PCR استفاده شد. با توجه به پرایمر طراحی‌شده و نتیجه ژل آگارز، باند مشخص با طول تقریبی

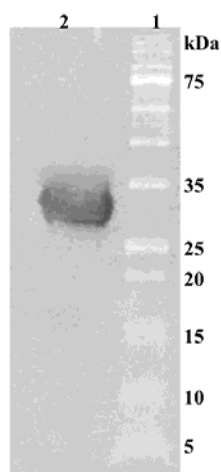
HEK293T بدون پلاسمید ترانسفکت شده به عنوان کنترل منفی، نشان دهنده بیان پروتئین نوترکیب CEL I است. شکل ۳- ب تخلیص پروتئین CEL I با ستون Ni-NTA را نشان می دهد. بعد از به دست آمدن پروتئین خالص، با استفاده از روش برادفورد مقدار پروتئین نوترکیب در حدود ۲/۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین غلظت شد.



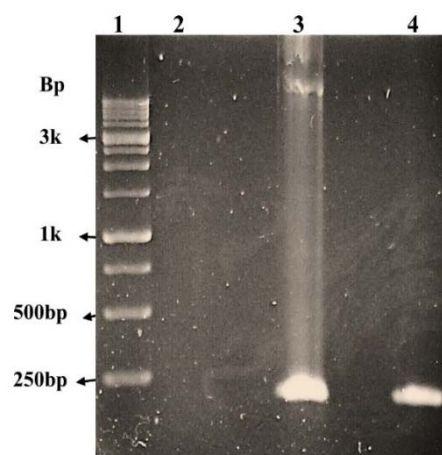
شکل ۳ (الف) بررسی بیان پروتئین CEL I با استفاده از ژل ۱۵٪ پلی اکریل آمید تحت شرایط احیایی: ۱- مارکر پروتئینی، ۲- بیان پروتئین بعد از ۲۴ ساعت از زمان ترانسفکت، ۳- سلول ترانسفکت نشده؛ (ب) نتیجه تخلیص پروتئین نوترکیب بارگذاری شده روی ژل ۱۵٪ پلی اکریل آمید تحت شرایط احیایی: ۱- سلول ترانسفکت نشده، ۲- بیان پروتئین بعد از ۲۴ ساعت از زمان ترانسفکت، ۳- پروتئین تخلیص شده، ۴- مارکر پروتئینی

وسترن بلات

بیان پروتئین نوترکیب CEL I توسط وسترن بلات نیز تایید شد. همان طور که در شکل ۴ نشان داده شده است نمونه پروتئینی CEL I خالص شده با پادتن ضد دنباله پلی هیستیدینی کانژوگه شده با HRP در کاغذ نیتروسلولز واکنش نشان داد و باند مربوط به پروتئین در محدوده ۳۰ کیلودالتون مشاهده شد و نتایج حاصل از وسترن بلات حضور پروتئین نوترکیب را نشان داد.



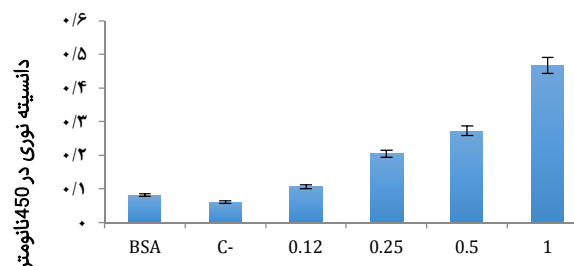
شکل ۴ نتیجه وسترن بلات پروتئین تخلیص شده CEL I دارای دنباله پلی هیستیدینی با پادتن ضد دنباله پلی هیستیدینی کانژوگه شده با HRP؛ مشاهده باند در حدود ۳۰ کیلودالتون حضور پروتئین نوترکیب CEL I را تایید کرد. ۱- مارکر پروتئینی و ۲- نمونه پروتئین تخلیص شده CEL I



شکل ۲ نتیجه واکنش نسخه برداری معکوس: با توجه به پرایمرهای طراحی شده، قطعه مورد نظر در حدود ۲۰۰ جفت باز است. نمونه ها روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند. ۱- مارکر وزن مولکولی DNA، ۲- سلول ترانسفکت نشده، ۳- پلاسمید pBudCE4.1+CEL I و ۴- سلول ترانسفکت شده

تست الیزای مستقیم

روش دیگر مورد استفاده به منظور تایید بیان پروتئین نوترکیب CEL I، تست الیزا است. ابتدا محلول حاوی پروتئین نوترکیب با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. سپس از این محلول رقت های سریالی مختلف ساخته و دانسیته نوری آنها در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. در نمودار ۱ نتایج تست الیزا با میانگین سه بار تکرار نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود به دلیل وجود دنباله پلی هیستیدینی در پروتئین CEL I، از پادتن ضد پلی هیستیدینی کانژوگه شده با HRP، استفاده شد. نتایج حضور پروتئین را تایید می کند.



غلظت پروتئین CEL I نوترکیب (میکروگرم در هر چاهک)

نمودار ۱ نتیجه میانگین سه بار تکرار تست الیزای مستقیم: BSA و محیط کشت سلول ترانسفکت نشده به عنوان کنترل منفی و رقت های سریالی از پروتئین CEL I با غلظت اولیه ۱۰ میکروگرم در هر چاهک تهیه شد. نتایج تست الیزا، حضور پروتئین CEL I را تایید کرد.

بیان و تخلیص پروتئین CEL I

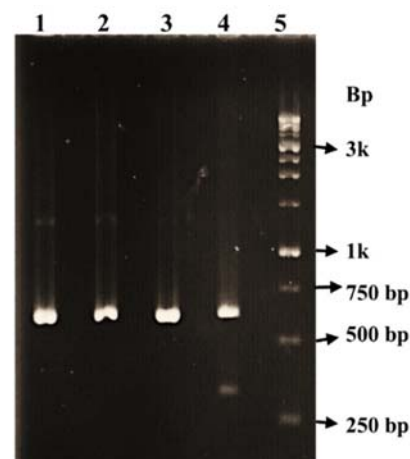
سازه ژنی CEL I به وسیله لیپوفکتامین به سلول های HEK293T برای بیان موقت ترانسفکت شد. بعد از ۲۴ ساعت، محیط کشت سلول های ترانسفکت شده جمع آوری و بیان پروتئین با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۱۵٪ و تحت شرایط احیایی انجام شد (شکل ۳- الف). مشاهده باند در محدوده ۳۰ کیلودالتون از نمونه جمع آوری شده رده سلولی HEK293T حاوی سازه نوترکیب در مقابل رده سلولی

فعالیت آن برای تشخیص دقیق انواع جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌ها روی ژن *BRCA1* انسانی بررسی شد و بعد از آن برای تشخیص انواع جفت‌بازهای ناجور مورد استفاده قرار گرفت [1]. همان‌طور که ذکر شد، برتری این دو آنزیم نسبت به سایر روش‌های مرسوم، شناسایی آسان‌تر جهش‌ها و حساسیت بالای آنها در تشخیص DNA هترودوپلکس است. به‌عنوان مثال، CEL I می‌تواند همه انواع جایگزینی‌ها، درج و حذف جفت‌بازهای ناجور را تشخیص دهد. همچنین قطعات ایجادشده در اثر برش توسط این آنزیم، اطلاعات مفیدی درباره موقعیت جهش ارایه می‌کند. برای مثال، تعداد قطعات حاصل از برش توسط آنزیم، نشان‌دهنده حضور چندین محل جهش است. از دیگر مزیت این آنزیم‌ها، کاربرد ترکیبی آنها با دیگر روش‌ها مانند ساترن‌بلات است که می‌توان طول قطعات بزرگ‌تری را سنجش کرد [8]. از این قابلیت می‌توان برای مطالعه ژن‌های دارای جهش‌های متعدد مانند *BRCA1* استفاده کرد. این ژن دارای سه جهش نقطه‌ای نزدیک به هم (G→A^{۲۱۹۶}، C→T^{۲۴۳۰} و T→C^{۲۲۰۱}) است که بسیاری از روش‌ها قادر به تشخیص آنها نیستند، اما آنزیم CEL I به‌دلیل توانایی شناسایی دو جهش نقطه‌ای متوالی با فاصله پنج نوکلئوتید از هم، این ناحیه را در ژن *BRCA1*، شناسایی می‌کند [29]. بنابراین با توجه به حساسیت و ویژگی بالای آنزیم CEL I در شناسایی DNA هترودوپلکس و جهش‌ها و همچنین قابل اعتماد و مقرون‌به‌صرفه بودن این روش، تولید این آنزیم در قالب فرآورده‌های تجاری برای مصارف تشخیص بالینی و تحقیقاتی پایه حائز اهمیت است. بنابراین در این مطالعه هدف اصلی، دستیابی به آنزیم خالص با راندمان بالا و همچنین دارای فعالیت آنزیمی بوده است. برای این منظور برای غلبه بر بازدهی و خلوص پایین محصول نهایی که مشکل اصلی در تهیه این آنزیم به‌طور طبیعی از گیاه کرفس است، دنباله پلی‌هیستیدینی (شامل شش باقی‌مانده هیستیدین) به انتهای کربوکسیل پروتئین اضافه شد. این دنباله موجب تسهیل در فرآیند تخلیص و همچنین افزایش خلوص محصول نهایی که دو فاکتور مهم در راستای تولید تجاری این قبیل محصولات هستند، کمک شایان توجهی می‌کند. مثلاً در مطالعه یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۰، مقدار پروتئین به‌دست‌آمده از ۱۰۵ کیلو ساقه کرفس ۱۰۰/۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود در حالی که در این پروژه مقدار ۲/۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد [2]. از طرف دیگر به‌منظور تولید آنزیم فعال و رفع نقص موجود در سیستم‌های بیانی باکتریایی، از سیستم‌های بیانی یوکاریوتی استفاده شد. برای این منظور، رده سلولی HEK293T به‌عنوان میزبان انتخاب و بیان پروتئین در آنها بررسی شد که نتایج نشان‌دهنده سطح بیان مناسب در سلول HEK293T است. همچنین در تحقیق حاضر، از یک پپتید نشانه برای تولید پروتئین به فرم ترشحی استفاده شد که با به‌کارگیری این روش نیاز به انجام فرآیندهای پایین‌دست اضافی مرتفع می‌شود.

درواقع هدف کلی این تحقیق، کلون کردن ژن *CEL I*، بیان و بررسی عملکرد آنزیم نوترکیب و تخلیص آسان پروتئین در شرایط

برش جفت‌باز ناجور توسط آنزیم CEL I و شناسایی جهش

فعالیت آنزیم CEL I، در بافر آنزیم با pH=۷/۵ و دمای ۴۵°C، روی DNA هترودوپلکس حاصل از ژن وحشی و جهش‌یافته پروتئین نمیوپسین مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). با توجه به پرایمرهای طراحی‌شده برای ژن وحشی و جهش‌یافته، محصول PCR آنها و DNA هترودوپلکس حاصل از ژن‌های فوق شامل ۶۰۰ جفت‌باز است. در اثر فعالیت آنزیم CEL I و با توجه به مکان جهش، دو قطعه ۳۱۵ و ۲۸۵ جفت‌بازی ایجاد می‌شود. محصولات PCR، DNA هترودوپلکس و مخلوط واکنش آنزیم در ژل ۱٪ آگارز بارگذاری شد. مشاهده باند در محدوده ۳۰۰ جفت‌بازی، نشان‌دهنده فعالیت آنزیم CEL I است.



شکل ۵ فعالیت آنزیم CEL I روی DNA هترودوپلکس حاصل از ژن وحشی و جهش‌یافته پروتئین نمیوپسین: ۱ و ۲- محصول PCR ژن وحشی و جهش‌یافته بدون حضور آنزیم CEL I، ۳- DNA هترودوپلکس بدون آنزیم CEL I، ۴- DNA هترودوپلکس که با آنزیم CEL I تیمار شده است، ۵- مارکر وزن مولکولی DNA، مشاهده باند در حدود ۳۰۰ جفت‌بازی، نشان‌دهنده فعالیت مناسب آنزیم است.

بحث

در حال حاضر، برای شناسایی انواع جهش‌های دخیل در ایجاد بیماری‌های ژنتیکی، مانند بررسی علل ژنتیکی سرطان، پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی (به‌ویژه تعیین فنوتیپ DNA در پزشکی قانونی و ژنتیک جنایی) و تشخیص انواع SNPها در قطعه DNA مورد نظر از روش‌های متعددی [24-27]، از قبیل DHPLC، SSCP، FRET و روش‌های مبتنی بر آنزیم مثل MLPA استفاده می‌شود [28]. معمولاً به‌کارگیری این روش‌ها با محدودیت‌هایی همراه است و در برخی موارد استفاده از آنها قابل اعتماد و مقرون‌به‌صرفه نیست [9].

در روش‌های مبتنی بر آنزیم، علاوه بر روش MLPA، استفاده از آنزیم‌های اندونوکلازی، مرسوم است که مزیت آنها نسبت به دیگر روش‌های ذکرشده، حساسیت و دقت آنها در شناسایی جهش‌های موجود در DNA است. مهم‌ترین آنزیم‌های اندونوکلازی مورد استفاده CEL I و CEL II هستند. آنزیم CEL I اولین بار توسط ولیکفسکی و همکاران در سال ۱۹۹۸ از گیاه کرفس استخراج و

تشکر و قدردانی: نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت مالی کمال تشکر را دارند.

تاییدیه اخلاقی: پژوهش حاضر توسط همه نویسندگان تایید شده است. همچنین این مقاله در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا زبان دیگری چاپ نشده یا به طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: سودابه عسکری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۵٪)؛ صادق حسن‌نیا (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۵٪)؛ رضا حسن‌ساجدی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ وحیدرضا یاسایی (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: منابع مالی پژوهش حاضر از محل اعتبار پژوهشی پایان‌نامه نویسنده اول و همچنین حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

- 1- Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung AT. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(20):4597-602
- 2- Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, et al. Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease. *Biochemistry.* 2000;39(13):3533-41.
- 3- Sabetta W, Alba V, Blanco A. sunTILL: A TILLING resource for gene function analysis in sunflower. *Plant methods.* 2011;7(1):20.
- 4- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, Henikoff S. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.* 2001;126(2):480-4.
- 5- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. Targeting induced locallesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 2000;123(2):439-42.
- 6- Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 2003;131(3):866-71.
- 7- Raghavan C, Naredo MEB, Wang H, Atienza G, Liu B, Qiu F, Leung H. Rapid method for detecting SNPs on agarose gels and its application in candidate gene mapping. *Mol Breed.* 2007;19(2):87-101.
- 8- Till BJ, Burtner C, Comai L, Henikoff S. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(8):2632-41.
- 9- Yeung AT, Hattangadi D, Blakesley L, Nicolas E. Enzymatic mutation detection technologies. *Biotechniques.* 2005;38(5):749-58.
- 10- Pimkin M, Caretti E, Canutescu A, Yeung JB, Cohn H, Chen Y, et al. Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection. *BMC Biotechnol.* 2007;7:29.

آزمایشگاهی بود. مطابق با روند آزمایشگاهی و نتایجی که در بالا توضیح داده شدند، درنهایت ما توانستیم آنزیم نوترکیبی با فعالیت مناسب برای طراحی سیستم اندونوکلئازی با قابلیت تشخیص جفت‌باز ناجور تولید کنیم. اگرچه این سیستم بیانی هنوز نیازمند بهینه‌سازی در زمینه بیان و تخلیص در مقادیر بالا برای کاربردهای صنعتی است. این مطالعه می‌تواند گامی ارزشمند در راستای تولید کیت‌های تشخیصی و تجاری کارآمد با خصوصیات متمایز برای غربال جهش‌های نقطه‌ای و همچنین روشی در راستای تولید آنزیم CEL I و امکان تولید تجاری آن باشد.

درنهایت پیشنهاد می‌شود، مطالعه درباره این آنزیم ادامه پیدا کند زیرا تا به حال از خانواده S1، آنزیم‌های نوکلئاز S1 و P1 کریستاله شده‌اند و ساختار کریستالی CEL I هنوز تعیین نشده است بنابراین سؤال‌های متعددی در رابطه با مکانیزم عمل آن بی‌جواب باقی مانده است که نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه را ایجاب می‌کند. به عنوان مثال، چگونه این آنزیم طیف متنوعی از جهش‌ها را تشخیص می‌دهد؟ چه پارامترهایی pH بهینه آن را برای داشتن فعالیت‌های DNase ای و RNase ای آن تعیین می‌کند؟ با چه رویکردهایی می‌توان این آنزیم را مهندسی کرد تا شناسایی جهش را بهتر انجام دهد؟ شناسایی مکانیزم عمل آنزیم برای رسیدن به پاسخ سؤال‌هایی از این قبیل، کمک شایانی خواهد کرد. بنابراین تولید فرم نوترکیب این آنزیم با استفاده از روش‌های دست‌ورزی ژن، تکمیل‌کننده اطلاعات موجود مربوط به ساختار و مکانیزم عمل این گروه آنزیمی است.

با توجه به کوتاه‌بودن زمان انجام این پروژه، امکان مطالعه بیشتر در رابطه با این آنزیم مقدور نبود بنابراین در اینجا پیشنهاداتی در جهت انجام و بهبود کارهای تحقیقاتی آینده در مورد آنزیم CEL I ارائه می‌شود که شامل بررسی پایداری آنزیم CEL I نوترکیب و افزایش فعالیت اختصاصی آنزیم با به کارگیری روش‌های مهندسی پروتئین و همچنین بررسی الگوی گلیکوزیلاسیون آنزیم CEL I با توجه به نوع میزبان و انتخاب بهترین آنالوگ از نظر پایداری و فعالیت است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که در مرحله اول، مراحل کلونینگ ژن با موفقیت انجام شد و نتایج کلونی PCR، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های KpnI و XhoI و تعیین توالی نشان داد که توالی مورد نظر به درون وکتور بیانی pBudCE4.1 به درستی ترانسفورم شده است. در مرحله بعد فرآیند ترانسفکت با موفقیت انجام و بیان پروتئین به وسیله روش‌های SDS-PAGE، الایزا، واکنش نسخه‌برداری معکوس و وسترن‌بلات مورد تایید قرار گرفت. فرآیند تخلیص نیز با ستون حاوی رزین Ni-NTA از کیفیت قابل قبولی برخوردار است. درنهایت فعالیت اندونوکلئازی آنزیم نوترکیب روی DNA هترودوپلکس حاصل از محصول PCR ژن جهش‌یافته و وحشی حاکی از فعالیت مناسب آنزیم نوترکیب تولیدی است.

<https://bio-protocol.org/bio101/e80>.

- 21- He F. Bradford protein assay [Internet]. Sunnyvale, CA: Bio-protocol; 2011 [cited 2018 May 20]. Available from: <https://bio-protocol.org/bio101/e45>
- 22- Jahani Z, Mollakarimi M, Hasan Sajedi R, Taghdir M, Hosseinkhani S, Asghari SM. The role of some amino acid residues in coelenterazine binding site of mnemiopsin compared to coelenterate photoproteins. *Modares J Biotechnol*. 2014;5(1):30-40. [Persian]
- 23- Abdullaev SA, Gulyaeva NA, Bezlepkin VG, Gaziev AI. Comparative assessment of mutations in mtDNA of x-irradiated mice using mismatch-specific endonuclease and temporal temperature gradient electrophoresis. *Biophysics*. 2010;55(1):142-7.
- 24- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 1994;368(6468):258-61.
- 25- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994;8(4):399-404.
- 26- Ito M, Oiso Y, Murase T, Kondo K, Saito H, Chinzei T, Racchi M, Lively MO. Possible involvement of inefficient cleavage of preprovasopressin by signal peptidase as a cause for familial central diabetes insipidus. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2565-71.
- 27- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Weit YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994;371(6492):75-80.
- 28- Hanne J, Liu J, Lee JB, Fishel R. Single-molecule FRET studies on DNA mismatch repair. *Int J Biophys*. 2013;3(1A):18-38.
- 29- Kulinski J, Besack D, Oleykowski CA, Godwin AK, Yeung AT. CEL I enzymatic mutation detection assay. *Biotechniques*. 2000;29(1):44-6, 48.

- 11- Mon H, Lee J, Fukushima M, Nagata Y, Fujii M, Xu J, et al. Production and characterization of the celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm expression system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(15):6813-22.
- 12- Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;26(5):457-91.
- 13- Triques K, Sturbois B, Gallais S, Dalmais M, Chauvin S, Clepet C, et al. Characterization of arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J*. 2007;51(6):1116-25.
- 14- Bendahmane A, Sturbois B, Triques K, Caboche M. Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases and uses thereof U.S. Patent Appl. 2012;13/183,565.
- 15- Bendahmane A, Sturbois B, Triques K, Caboche M. Method for producing highly sensitive endonucleases, novel preparations of endonucleases and uses thereof. U.S. Patent Appl. 2012;11/572,860.
- 16- Diepenbruck C, Klinger M, Urbig T, Baeuerle P, Neef R. Productivity and quality of recombinant proteins produced by stable CHO cell clones can be predicted by transient expression in HEK cells. *Mol Biotechnol*. 2013;54(2):497-503.
- 17- Wurm F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10(2):156-9.
- 18- Hacker DL, Kiseljak D, Rajendra Y, Thurnheer S, Baldi L, Wurm FM. Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells. *Protein Expr Purif*. 2013;92(1):67-76.
- 19- Qiu P, Shandilya H, D'Alessio JM, O'Connor K, Durocher J, Gerard GF. Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques*. 2004;36(4):702-7.
- 20- He F. 23 users have reported that they have successfully carried out the experiment using this protocol. Laemmli-SDS-PAGE [Internet]. Sunnyvale, CA: Bio-protocol; 2011 [cited 2018 May 15]. Available from: