ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(3):273-278

Cloning of Human Survivin in pET-28a and its Protein Expression Study in *E. coli* BL21(DE3)

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Tirmomenin M.[1] *MSc,*
Ataei F. *[1] *PhD,*
Hosseinkhani S.[1] *PhD*

How to cite this article
Tirmomenin M, Ataei F, Hosseinkhani S. Cloning of Human Survivin in pET-28a and its Protein Expression Study in *E. coli* BL21(DE3). Modares Journal of Biotechnology. 2020-;11(3):273-278.

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884748
Fax: +98 (21) 82884717
ataei_f@modares.ac.ir

Article History
Received: March 28, 2020
Accepted: May 28, 2020
ePublished: September 20, 2020

ABSTRACT

Aims The Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) are a family of proteins that block cell death through caspase activity. Survivin is the smallest IAPs family member that overexpresses in different cancer types but not in normal tissue except embryonic tissue. Survivin may be used as a new marker to stratify cancer patients for more optimal treatment modalities. The aim of the current study was to investigate survivin DNA cloning into pET-28a and its expression in *E. coli*.

Materials & Methods The sequence of survivin gene was amplified by PCR using specific primers and pcDNA-survivin pattern. PCR product and pET-28a plasmid were digested by HindIII/NheI restriction enzymes and survivin was ligated into the digested vector. Then, the ligation product was transformed into the *E. coli* DH5a competent cells and screened by antibiotic selection marker (kanamycin). Positive colonies were selected by colony PCR and screened by double digestion of isolated plasmid. One positive colony was sequenced and confirmed. The recombinant plasmid was transformed into the expression strain of *E. coli* (BL21) by chemical method. The expression of survivin was induced in the different conditions and expression levels investigated by SDS-PAGE.

Findings The size of PCR product in agarose gel showed the correctness of amplification. The digested pET-28a plasmid also indicated the correctness of enzymatic reaction. The sequence of the cloned fragment revealed a 100% similarity to the human survivin. In expressing, adding IPTG increased the expression of survivin protein in all conditions, especially 37°C from 2h after induction. At all conditions, most of survivin accumulated in the bacteria as inclusion body.

Conclusion The wild type survivin gene was cloned into the pET-28a plasmid and the expression of survivin into the expression strain of *E. coli* (BL21) was as in-soluble form mixed soluble. The present study paves the way for producing this protein in *E. coli*.

Keywords PCR; Survivin; Cloning; BL21(DE3); pET-28a

CITATION LINKS

[1] Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs) [2] Inducing death in tumor cells: Roles of the inhibitor of apoptosis proteins [3] An exegesis of IAPs: Salvation and surprises from BIR motifs [4] Survivin apoptosis: An interloper between cell death and cell proliferation in cancer [5] Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement [6] Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual α-helical extensions [7] Survivin-ΔEx3 and survivin-2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties [8] Survivin study: An update of "What is the next wave?" [9] Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis [10] An IAP-IAP complex inhibits apoptosis [11] Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [12] Treat cancers by targeting survivin: Just a dream or future reality? [13] Construction, expression, and purification of HIV-TAT-survivin (T34A) mutant: A pro-apoptosis protein in Escherichia coli [14] Preparation and evaluation of activity of highly-soluble anticancer protein drug TATm-survivin (T34A) [15] Cloning, expression, and purification of the recombinant pro-apoptotic dominant-negative survivin T34A-C84A protein in Escherichia coli [16] Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies [17] Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

کلون‌کردن ژن سورویوین انسانی در وکتور پروکاریوتی pET-28a و ارزیابی بیان پروتئین در باکتری *E. coli* BL21(DE3)

مهسا تیرمومنین MSc
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
فرنگیس عطائی* PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
سامان حسینخانی PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAPs)، از خانواده پروتئین‌ها هستند که با مهار فعالیت کاسپاز مرگ سلول را متوقف می‌کنند. سورویوین کوچکترین پروتئین شناخته‌شده از این خانواده است که در سلول‌های سرطانی مشاهده می‌شود اما در بافت‌های نرمال به‌جز بافت جنینی مشاهده نشده است. سورویوین ممکن است به‌عنوان یک مارکر جدید برای شناسایی و درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد. هدف مطالعه حاضر، کلونینگ ژن سورویوین در وکتور pET-28a و بیان پروتئین در باکتری *E. coli* بود.

مواد و روش‌ها: ژن سورویوین با روش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و الگوی pcDNA-survivin تکثیر شد. محصول PCR و پلاسمید pET-28a با آنزیم‌های محدودگر HindIII/NheI برش داده و سورویوین درون وکتور برش‌خورده الحاق شد. سپس محصول الحاق‌شده به باکتری *E. coli* DH5a ترنسفورم و با استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین غربالگری شد. کلنی‌ها با روش PCR ارزیابی شدند و پلاسمید کلنی مثبت با روش هضم دوگانه غربالگری شد. در نهایت یک کلنی مثبت با تعیین توالی تایید شد. پلاسمید نوترکیب با روش شیمیایی به باکتری بیانی *E. coli* (BL21) ترنسفورم شد. بیان سورویوین در شرایط مختلف انجام و سطح بیان با SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: اندازه قطعه تکثیرشده توسط PCR با استفاده از ژل آگارز تایید شد. پلاسمید pET-28a برش‌خورده نیز فعالیت آنزیمی را تایید کرد. قطعه کلون‌شده پس از توالی‌یابی تشابه ۱۰۰% با سورویوین انسانی داشت. افزودن IPTG موجب بیان پروتئین سورویوین در تمام شرایط خصوصاً دمای ۳۷°C از زمان ۲ ساعت پس از القا شد اما در همه شرایط، عمده سورویوین بیان‌شده در باکتری به‌صورت تجمعی بود.

نتیجه‌گیری: ژن سورویوین نوع وحشی در پلاسمید pET-28a کلون شد و بیان آن درون *E. coli* (BL21) به‌صورت نامحلول همراه با محلول بود. مطالعه حاضر راهکار تولید این پروتئین را در باکتری *E. coli* ارایه داد.

کلیدواژه‌ها: PCR، سورویوین، کلونینگ، BL21(DE3)، pET-28a

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۸

*نویسنده مسئول: ataei_f@modares.ac.ir

مقدمه

پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAPs)، خانواده حفاظت‌شده‌ای از مهارکننده‌های مرگ سلولی هستند که اولین‌بار در سلول‌های SF-21 حشرات آلوده‌شده توسط باسیلوویروس دیده شدند و مشخص شد در سرکوب مرگ سلولی به واسطه آلودگی ویروسی نقش دارند[1].

اعضای خانواده IAP براساس حضور یک دومین تقریباً ۷۰ آمینواسیدی متصل‌شونده به یون روی (Zn^{2+}) به نام دومین BIR دسته‌بندی می‌شوند که خواص آنتی‌آپوپتوتیک این خانواده وابسته به همین دومین است که به‌طور بالقوه‌ای کاسپازها را مهار می‌کنند. با توجه به وجود اسیدآمینه‌های هیدروفوب و هیدروفیل در این دومین، BIR در میان‌کنش پروتئین- پروتئین و مهار آپوپتوز نقش دارد[2]. IAPها نقش‌های متعددی از جمله مهاجرت سلولی، پیام‌رسانی، تنظیم چرخه سلولی، مهار آپوپتوز، التهاب و غیره را در سلول ایفا می‌کنند[1, 3].

یکی از اعضای این خانواده سورویوین است. سورویوین انسانی پروتئینی متشکل از ۱۴۲ آمینواسید با وزنی حدود ۱۶/۵کیلودالتون است. فرم فیزیولوژیکی فعال این پروتئین حالت همودایمر دارد که از طریق سطح هیدروفوبیک دومین BIR به هم متصل می‌شوند[1, 4]. کریستالوگرافی ساختار پروتئین سورویوین نشان می‌دهد که فرم دایمر آن شبیه یک پاپیون روبانی‌شکل با دو دنباله آلفاهلیکس آمفی‌پاتیک است و برخلاف سایر اعضای این خانواده، فاقد دومین RING است[4-6]. فرم مونومر آن متقارن و شامل دومین اتصال به روی (دومین BIR) در انتهای آمینی، یک لینکر و یک انتهای کربوکسیلی آلفاهلیکسی طویل است[5, 6].

سورویوین توسط ژن *BIRC5* که در ناحیه تلومری کروموزم 17q25 قرار دارد کد می‌شود و دارای ٤ اگزون و ۳ اینترون است[7, 8]. این پروتئین دارای توزیع درون سلولی متفاوتی است. دو محل عمده توزیع برای سورویوین هسته و سیتوپلاسم مشخص شده، ولی اخیراً در میتوکندری سلول‌های توموری ذخیره دیگری از سورویوین گزارش شده است. به دنبال تحریک مرگ سلولی، ذخیره سورویوین میتوکندریایی به درون سیتوپلاسم آزاد می‌شود و مرگ سلولی را مهار می‌کند[8, 9].

تحقیقات متعددی نقش سورویوین را در مهار آپوپتوز اثبات کرده‌اند ولی مکانیزم مهار آپوپتوز توسط سورویوین به‌طور کامل روشن نیست[4, 7, 9]. گزارش شده است که در پاسخ به محرک‌های مرگ سلولی، سورویوین با اتصال به XIAP که یک عضو دیگر از خانواده IAP است کمپلکس ایجاد می‌کند که این کمپلکس منجر به افزایش پایداری XIAP می‌شود و به‌طور سینرژیک، فعالیت کاسپاز ۹ را مهار می‌کند. درواقع سورویوین با اتصال به XIAP و تشکیل کمپلکس، از XIAP در برابر یوبی‌کوئیتینه‌شدن و تخریب پروتئازومی محافظت می‌کند[9, 10]. مکانیزم دیگری که سورویوین به کمک آن آپوپتوز را مهار می‌کند غیرفعال‌کردن فاکتور SMAC است. SMAC یک پروتئین میتوکندریایی است که آپوپتوز را با تشکیل کمپلکس با برخی از IAPهای خاص شروع می‌کند و منجر به مهار میان‌کنش آنها با کاسپازها می‌شود. سورویوین با اتصال به SMAC عملکرد آنتاگونیستی SMAC برای اتصال به IAPها مانند XIAP را کاهش می‌دهد[11].

با درنظرگرفتن میان‌کنش بین سورویوین و مولکول‌های متعدد مرتبط با آپوپتوز و میتوز، بیان بالای سورویوین منجر به افزایش بقای سلول‌های سرطانی و مقاومت دارویی آنها می‌شود. درواقع شواهد زیادی تایید می‌کنند که افزایش بیان سورویوین منجر به بروز مقاومت به انواع عوامل شیمی‌درمانی و پروآپوپتوتیک از قبیل سیس‌پلاتین، TNF-α و TRAIL در سلول‌های سرطانی می‌شود. براساس این یافته‌ها، سورویوین به‌عنوان یک هدف مهم برای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است[12].

هدف مطالعه حاضر، بومی‌سازی تولید نوترکیب پروتئین سورویوین بود. از آنجا که پروتئین سورویوین در روند بیماریزایی و درمان سرطان نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند، تهیه مقادیر مناسب از این پروتئین به‌صورت محلول، گامی ضروری برای انجام مطالعات ساختاری، شناسایی مکانیزم و نیز ارزیابی اثر داروهای مختلف بر ساختار پروتئین به شمار می‌آید. بنابراین در مطالعه حاضر با هدف بیان و تولید پروتئین سورویوین در باکتری، DNA آن کلون و سپس بررسی بیان آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر پلاسمید pcDNA(3+) حامل ژن سورویوین به‌عنوان الگو در PCR مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای پیشرو و پسرو با توالی مشخص استفاده شدند که به ترتیب دارای جایگاه آنزیم محدودکننده NheI و HindIII بودند (جدول ۱).

جدول ۱) توالی و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی	آنزیم محدودگر	دما (°C)
پیشرو	5′-GTAC**GCTAGC**ATGGGTGCCCCGACGTTGC-3′	NheI	۸۸
پسرو	5′-TCGT**AAGCTT**TCAATCCATGGCAGCCAGCTG-3′	HindIII	۸۶

به‌منظور تکثیر ژن سورویوین از طریق PCR، پرایمرهای پیشرو و پسرو هر یک به مقدار ۱۵پیکومول بر میکرولیتر و پلاسمید الگو به مقدار ۱۵نانوگرم به همراه ۱۵میکرولیتر از مسترمیکس در حجم نهایی ۳۰میکرولیتر با هم مخلوط شدند و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد که طبق برنامه واکنش واسرشتگی ابتدایی در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ سیکل سه‌مرحله‌ای شامل فاز واسرشتگی (۴۵ ثانیه در دمای ۹۵°C)، فاز اتصال پرایمر (۴۰ ثانیه در دمای ۶۵°C)، فاز طویل‌شدگی (۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C) و در نهایت طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱% الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج DNA (Gene All؛ کره جنوبی) پاکسازی شد. از آنجا که طول ژن سورویوین برابر با ۴۲۶ نوکلئوتید است، با احتساب قسمت‌های پیش‌نیاز پرایمرها نظیر جایگاه آنزیم‌های برش‌دهنده طول نهایی محصول واکنش حدود ۴۵۰ نوکلئوتید بود.

به‌منظور ورود ژن سورویوین به درون حامل، محصول واکنش بالا و پلاسمید pET-28a که حامل مورد نظر است با دو آنزیم برشی NheI و HindIII در دمای ۳۷°C به مدت ۶ ساعت تیمار شدند تا با ازدست‌دادن قطعات اضافی، دارای انتهاهای چسبنده شوند. سپس هر دو محصول هضم دوگانه، پاکسازی شدند و با استفاده از آنزیم DNA-T4 لیگاز، واکنش الحاق بین آنها در دمای ۲۲°C به مدت ۴ ساعت و در ادامه دمای ۴°C به مدت ۱۶ ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاق با استفاده از روش کلسیم‌کلرید به داخل باکتری مستعد *اشریشیا کلی* از سویه DH5α منتقل و روی پلیت LB آگار حاوی کانامایسین کشت داده شد. کلنی‌های ظاهرشده با استفاده از PCR ارزیابی اولیه شدند. سپس تک‌کلنی‌های مثبت کشت داده شدند و استخراج پلاسمید انجام و با هضم دوگانه توسط دو آنزیم برشی غربالگری اولیه انجام شد. در نهایت، صحت توالی کلون‌شده با توالی‌یابی توسط شرکت ماکروژن کره تایید شد.

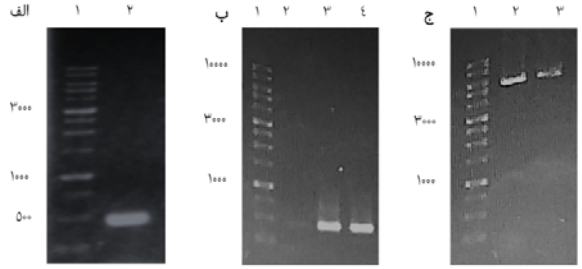
پلاسمید pET-28a حامل ژن سورویوین با روش شیمیایی به داخل باکتری بیانی *اشریشیا کلی* سویه BL21 (DE3) منتقل شد. باکتری حامل پلاسمید روی پلیت LB آگار حاوی کانامایسین کشت داده شد. یکی از کلنی‌ها به ۱۰میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی کانامایسین اضافه و به مدت ۱۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷°C با سرعت ۲۲۰دور در دقیقه قرار داده شد. سپس یک‌میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۱۰۰میلی‌لیتر LB افزوده و در انکوباتور در همان شرایط قرار داده شد تا به OD مورد نظر برسد. پس از آن با القاکننده‌های مختلف مانند لاکتوز و IPTG القا و در دماها و زمان‌های مختلف قرار داده شد تا میزان بیان پروتئین بررسی شود. برای بهینه‌سازی بیان، شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان پروتئین با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد.

باکتری‌های القاشده در شرایط مختلف، در ۶۰۰۰دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و رسوب باکتری‌ها در بافر لیز (تریس ۵۰میلی‌مولار، کلریدسدیم ۳۰۰میلی‌مولار، ایمیدازول ۵میلی‌مولار و pH برابر ۷/۶) حل شد. بعد از آن باکتری‌ها توسط امواج ماورای صوت (سونیکاتور) لیز شدند. سونیکاسیون شامل ۱۵ مرحله ۲۰ثانیه‌ای با ۴۰ ثانیه فاصله بین هر مرحله بود و روی یخ انجام شد. سپس محتوای سلولی حاصل از سونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی جدا شد. رسوب حاصل از فرآیند سونیکاسیون نیز مجدداً در همان حجم از بافر لیز حل شد تا همزمان با محلول رویی از لحاظ مقدار پروتئین نوترکیب مورد بررسی و مقایسه قرار گیرد.

یافته‌ها

طی واکنش PCR ژن هدف تکثیر شد که نتیجه آن روی ژل آگارز اندازه ژن را تایید کرد (شکل ۱- الف).

محصول PCR و پلاسمید pET-28a توسط آنزیم‌های محدودگر NheI و HindIII در دمای ۳۷°C تیمار شدند و اندازه قطعات ایجادشده روی ژل آگارز، صحت واکنش آنزیمی و هضم دوگانه را تایید کرد. سپس الحاق ژن و پلاسمید انجام شد و پس از طی مراحل غربالگری کلنی‌ها، پلاسمید نوترکیب استخراج و مجدداً با PCR تست شد (شکل ۱- ب). پلاسمیدی که نتیجه PCR آن مثبت بود با هر دو آنزیم محدودگر به‌صورت دوگانه و هر آنزیم به‌صورت جداگانه برش داده شد که مطابق شکل ۱- ج اندازه پلاسمید فاقد ژن و پلاسمید دارای ژن اختلاف مناسب مطابق اندازه ژن سورویوین را نشان دادند.



شکل ۱) ژل آگارز مراحل کلونینگ ژن سورویوین در پلاسمید pET-28a؛ الف) محصول PCR (ستون ۲) در کنار مارکر وزن مولکولی (ستون ۱)؛ ب) نتیجه PCR روی ژن سورویوین کلون‌شده: ۱- مارکر وزن مولکولی، ۲- کنترل منفی پلاسمید بدون ژن، ۳- پلاسمید نوترکیب و ۴- کنترل مثبت پلاسمید الگو؛ ج) نتیجه اثر آنزیم محدودگر HindIII بر پلاسمید بدون ژن (۲) و پلاسمید نوترکیب دارای ژن (۳) در کنار مارکر وزن مولکولی (۱)

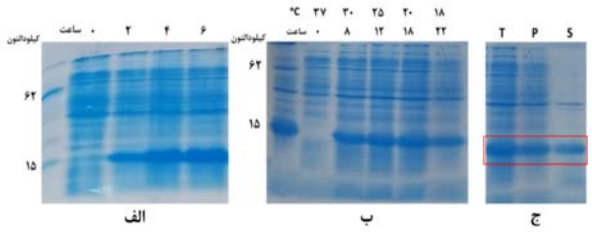
پس از تایید نتایج برش آنزیمی، پلاسمید حامل ژن کلون‌شده، با استفاده از پرایمر T7- پروموتر باکتریایی تعیین توالی شد که براساس تطابق با بانک ژنی NCBI صحت توالی به‌صورت ۱۰۰% تایید شد (شکل ۲).

```
  1 MGAPTLPPAWQPFLKDHRISTFKNWPFLEGCACTPERMAEAGFIHCPTEN    50
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
  1 mgaptlppawqpflkdhristfknwpflegcactpermaeagfihcpten    50

 51 EPDLAQCFFCFKELEGWEPDDDPIEEHKKHSSGCAFLSVKKQFEELTLGE   100
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 51 epdlaqcffcfkelegwepdddpieehkkhssgcaflsvkkqfeeltlge   100

101 FLKLDRERAKNKIAKETNNKKKEFEETAKKVRRAIEQLAAMD    142
    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
101 flkldreraknkiaketnnkkkefeetakkvrraieqlaamd    142
```

شکل ۲) ردیف‌سازی توالی ترجمه‌شده ژن کلون‌شده در وکتور pET-28a با پروتئین سورویوین انسانی نوع وحشی

پلاسمید پس از تعیین توالی و تایید نهایی، به درون باکتری سویه بیانی BL21 (DE3) ترنسفورم شد، بیان پروتئین در شرایط مختلف انجام گرفت و نتایج با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شدند.

در بیان پروتئین نوترکیب، در حضور القاکننده IPTG (غلظت ۰/۵میلی‌مولار) و یا لاکتوز (غلظت ۴میلی‌مولار) نسبت به عدم حضور القاکننده، بیان کاملاً مشهود بود و در دمای ۳۷°C از دو ساعت بعد از القا، باندی با وزنی حدود ۱۶کیلودالتون ظاهر شد (شکل ۳- الف). در ادامه از محیط کشت LB استفاده شد و دماهای مختلف از جمله ۱۸، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷°C تست شدند. در تمامی دماها، پروتئین مورد نظر میزان بیان متفاوت اما قابل توجهی داشت (شکل ۳- ب). اگرچه با بررسی شرایط مختلف از جمله تغییر در زمان بیان در دماهای مختلف و تغییر در نوع القاکننده، مقدار کل پروتئین نوترکیب متفاوت بود ولی بخشی از پروتئین بیان‌شده به‌صورت نامحلول و تجمعی مشاهده شد (شکل ۳- ج). درواقع مقدار پروتئین در سوپ و رسوب در شرایط مختلف متفاوت بود اما در تمام شرایط، بخش زیادی از پروتئین به‌صورت تجمعی وارد فاز نامحلول می‌شد.



شکل ۳) ژل SDS-PAGE بررسی بیان پروتئین سورویوین در باکتری *E. coli* BL21(DE3) در شرایط مختلف؛ الف) بیان پروتئین در دمای ۳۷°C، مارکر وزن مولکولی (سمت چپ)، زمان صفر نمونه قبل از القا (شاهد)، ۲، ۴ و ۶: زمان‌های مختلف بیان پس از القا با IPTG (۰/۰۵میلی‌مولار)؛ ب) بیان پروتئین در دما و زمان‌های مختلف، مارکر وزن مولکولی (سمت چپ)، زمان صفر نمونه قبل از القا (شاهد)، دما و زمان‌های مختلف بیان پس از القا با IPTG (۰/۰۵میلی‌مولار) مختلف؛ ج) بررسی میزان حلالیت پروتئین، T: میزان پروتئین نوترکیب در باکتری القاشده، P: میزان پروتئین موجود در رسوب باکتری پس از سونیکاسیون، سانتریفیوژ و جداسازی محلول آن، S: میزان پروتئین موجود در محلول حاصل از سونیکاسیون و سانتریفیوژ

بحث

هدف از مطالعه حاضر، کلون‌کردن و بیان پروتئین سورویوین در سیستم باکتریایی بود که از پلاسمید pET-28a به‌عنوان وکتوری کارآمد برای بیان پروتئین استفاده شد. باکتری‌های مختلفی برای بیان پروتئین وجود دارند که در این مطالعه نوع BL21 استفاده شد.

وکتور pcDNA(3+) که حامل ژن سورویوین و در آزمایشگاه موجود بود پلاسمیدی یوکاریوتی است که نسبت به سیستم باکتریایی، هزینه تولید پروتئین نوترکیب در میزبان آن بالا و زمان تولید پروتئین نوترکیب نسبت به سیستم باکتریایی طولانی‌تر است و همچنین در پروتئین تولیدشده در آن دنباله هیستیدینی وجود ندارد و مراحل خالص‌سازی را پیچیده‌تر می‌کند. بنابراین در مطالعه حاضر، ژن موجود در آن به وکتور پروکاریوتی pET-28a انتقال یافت.

طی مراحل کلونینگ، ژن سورویوین در پلاسمید pET-28a کلون و با تعیین توالی تایید شد. سپس به باکتری *E. coli* از نوع BL21(DE3) انتقال یافت. ابتدا در دمای ۳۷°C بیان پروتئین تست شد که نتایج نشان داد با افزایش زمان، میزان بیان افزایش یافت. با توجه به پژوهش‌هایی که توسط دیگر محققان انجام شده است این پروتئین قابلیت زیادی در تشکیل اجسام تجمعی دارد[13-15]. بنابراین میزان حلالیت پروتئین بررسی شد که نتایج نشان داد بخش زیادی از پروتئین نوترکیب در رسوب حاصل از باکتری وجود داشت و مقدار پروتئین در محلول حاصل از سونیکاسیون کم بود. در بیان پروتئین نوترکیب در سیستم باکتریایی می‌توان با تغییر در مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت، تغییر در دمای بیان، به‌کارگیری غلظت‌های مختلف IPTG و تغییر در مدت زمان انکوباسیون مقدار پروتئین نوترکیب و همچنین سرعت تشکیل اجسام تجمعی آن را تغییر داد[16, 17]. بنابراین بیان پروتئین در شرایط مختلف دمایی و زمان انکوباسیون انجام شد. همچنین غلظت‌های مختلف IPTG استفاده شد. علاوه بر این، القاکننده لاکتوز نیز جایگزین IPTG شد. در تمام شرایط مختلف انجام‌شده بیان پروتئین مشاهده شد اما میزان پروتئین متفاوت بود. از لحاظ حلالیت پروتئین و تشکیل اجسام تجمعی، در شرایط مختلف مقدار پروتئین موجود در سوپ و رسوب حاصل از سونیکاسیون متفاوت بود ولی در تمام حالت‌ها، بخشی از پروتئین به فرم اجسام تجمعی در رسوب مشاهده شد.

در مقایسه با مطالعات دیگران، گروهی از محققان، وکتور حامل ژن جهش‌یافته سورویوین (T34A) را به باکتری *E. coli* انتقال دادند و بیان آن را بررسی کردند که با میزان قابل توجهی از بیان این پروتئین مواجه شدند که به‌صورت نامحلول در رسوب مشاهده شد[13]. گروهی دیگر از دانشمندان برای ایجاد پروتئین محلول از ژن جهش‌یافته سورویوین (T34A) در باکتری *E. coli*، با افزودن یون روی و القای دماهای مختلف حلالیت آن را بررسی کردند که میزان بیان بیشتری از پروتئین به‌صورت محلول به دست آمد[14]. گروهی دیگر با انجام دو جهش متوالی بر روی ژن نوع وحشی سورویوین و انتقال آن به سه نوع مختلف از باکتری *E. coli* شامل BL21، Rosetta-gami-B و Arctic(DE3) بیان را ارزیابی کردند اما عمده پروتئین بیان‌شده در رسوب وجود داشت[15].

وکتورهای بیانی مجموعه PET تحت کنترل پروموتر T7 که جزء قوی‌ترین پروموترهای شناخته‌شده است، هستند، درنتیجه میزان بیان پروتئین نوترکیب در باکتری به میزان قابل توجهی زیاد است، بنابراین پروتئین‌هایی با ساختار خاص می‌توانند اجسام تجمعی ایجاد کنند. برای رفع این مساله، می‌توان با تغییر نوع وکتور سطح بیان پروتئین را کاهش داد تا تمایل به تجمع در پروتئین کاهش یابد. همچنین می‌توان از باکتری‌های *E. coli* دیگر با خصوصیات مهندسی‌شده مانند C41، pLysS و غیره که مکانیزم مولکولی بیان پروتئین در باکتری را تغییر می‌دهند و در بعضی موارد قادر به کنترل بیان پروتئین نوترکیب و کاهش پروتئین تجمعی می‌شوند استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

ژن سورویوین در پلاسمید pET-28a کلون شد. بیان پروتئین در سیستم باکتریایی *E. coli* BL21 به‌صورت مخلوطی از فرم محلول و اجسام تجمعی مشاهده شد که در شرایط متفاوت بیان، مقدار آن در حالت تجمعی متفاوت بود ولی بیان ۱۰۰% محلول مشاهده نشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از آقای *رشید هوشدارپور* که در بخش کلونینگ همکاری داشته است تشکر و قدردانی می‌کنند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مهسا تیرمومنین (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/نگارنده بحث (۴۰%)؛ فرنگیس عطائی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰%)؛ سامان حسینخانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۲۰%)

منابع مالی: مطالعه حاضر با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

1- Berthelet J, Dubrez L. Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs). Cells. 2013;2(1):163-87.
2- Finlay D, Teriete P, Vamos M, Cosford NDP, Vuori K. Inducing death in tumor cells: Roles of the inhibitor of apoptosis proteins. F1000Res. 2017;6:587.
3- Miller LK. An exegesis of IAPs: Salvation and surprises from BIR motifs. Trends Cell Biol. 1999;9(8):323-8.
4- Altieri DC, Marchisio C. Survivin apoptosis: An interloper between cell death and cell proliferation in cancer. Lab Investig. 1999;79(11):1327-33.
5- Verdecia MA, Huang HK, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. Nat Struct Biol. 2000;7(7):602-8.
6- Chantalat L, Skoufias DA, Kleman JP, Jung B, Dideberg O, Margolis RL. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual α-helical extensions. Mol Cell. 2000;6(1):183-9.
7- Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-ΔEx3 and survivin-2B: Two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res. 1999;59(24):6097-102.
8- Li F, Ling X. Survivin study: An update of "What is the next wave?". J Cell Physiol. 2006;208(3):476-86.
9- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. J Clin Investig. 2004;114(8):1117-27.
10- Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. J Biol Chem. 2004;279(33):34087-90.
11- Du Ch, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-

dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell. 2000;102(1):33-42.
12- Coumar MS, Tsai FY, Kanwar JR, Sarvagalla S, Cheung CH. Treat cancers by targeting survivin: Just a dream or future reality?. Cancer Treat Rev. 2013;39(7):802-11.
13- Ma X, Zheng W, Wei D, Ma Y, Wang T, Wang J, et al. Construction, expression, and purification of HIV-TAT-survivin (T34A) mutant: A pro-apoptosis protein in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2006;47(1):36-44.
14- Zhang HY. Preparation and evaluation of activity of highly-soluble anticancer protein drug TATm-survivin (T34A). Indian J Pharm Sci. 2019;81(2):266-72.
15- Tsai SL, Chang YC, Sarvagalla S, Wang Sh, Coumar MS, Cheung CH. Cloning, expression, and purification of the recombinant pro-apoptotic dominant-negative survivin T34A-C84A protein in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2019;160:73-83.
16- De Groot NS, Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. FEBS Lett. 2006;580(27):6471-6.
17- Iljina M, Garcia GA, Horrocks MH, Tosatto L, Choi ML, Ganzinger KA, et al. Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(9):E1206-15.