

بیان نو ترکیب بخش C-ترمینال پروتئین Rif1 و محلول سازی آن با سارکوزیل

حامد غدیری¹، ثنا علوی²، بهاره دبیرمنش³، خسرو خواجه^{4*}

- 1- دکتری، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- دکتری، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 4- استاد گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 98/10/1 تاریخ پذیرش: 98/10/18

*نویسنده مسئول: khajeh@modares.ac

صندوق پستی: 154 – 14115

چکیده:

ژنوم یوکاریوتی حاوی چندین محل شروع همانندسازی است. بررسی‌ها نشان می‌دهد، روند و ترتیب فعال شدن این منشأها با نظم خاصی صورت می‌گیرد که این فرایند منظم را اصطلاحاً زمان‌بندی همانندسازی (Replication timing) می‌گویند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد، عوامل زیادی در تنظیم زمان‌بندی فرایند همانندسازی نقش دارند. یکی از این عوامل مهم، پروتئین متصل‌شونده به Rap1 (Rif1)، است که در تنظیم برنامه زمان‌بندی همانندسازی در مخمر و یوکاریوت‌های پیشرفته‌تر نقشی اساسی دارد. قسمت عمده ساختار این پروتئین شکلی نامنظم دارد. این ویژگی‌ها مانع از بیان پایدار Rif1 می‌شود و مطالعه درباره آن را دشوار می‌کند.

هدف از مطالعه کنونی بیان نو ترکیب دمین C-ترمینال پروتئین Rif1 موشی (muRif1-CTD) به صورت محلول است. به این منظور ژن muRif1-CTD از سازه یوکاریوتی حاوی ژن کامل Rif1 به کمک PCR استخراج شد و در وکتور بیانی pPAL7 که حاوی برچسب Profinity eXact بود، قرار گرفت. محلول-سازی پروتئین با استفاده از دترجنت‌های مختلف و در مرحله بعد حذف دترجنت با استفاده از دیالیز انجام شد. برای اطمینان از اینکه پروتئین محلول‌شده فعالیت دارد، آنالیز برهم‌کنش پروتئین Rif1 با ساختار G4 (که قبلاً در رابطه با اتصال به Rif1 معرفی شده بود) با روش ژل شیفت بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که استفاده از دترجنت می‌تواند برای محلول‌سازی پروتئین Rif1 بدون اثرگذاری بر مراحل خالص‌سازی آن استفاده شود، اما درباره این پروتئین در صورت نبود کامل دترجنت، این پروتئین به صورت محلول نخواهد بود.

کلید واژگان: پروتئین Rif1، سارکوزیل، محلول‌سازی، زمان‌بندی همانندسازی، بیان در سیستم‌های یوکاریوتی

مقدمه

همانندسازی DNA در مکان‌های مشخصی از آن، به نام منشأ (Origin) همانندسازی آغاز می‌شود. برخلاف پروکاریوت‌ها که یک منشأ همانندسازی دارند، ژنوم یوکاریوتی چندین منشأ دارند که در فاز S از چرخه سلولی در یک فرایند هماهنگ فعال می‌شوند (Lewin 2014). مشخص شده است که سلول‌ها تمام این منشأهای بالقوه را برای استفاده در فاز S آماده می‌کنند، اما فقط تعدادی از آنها در مراحل ابتدایی فاز S فعال و باقی آنها در مراحل بعدی از این فاز استفاده می‌شوند. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد، روند و ترتیب فعال‌شدن این منشأها با نظم خاصی صورت می‌گیرد که این فرایند منظم را اصطلاحاً زمان‌بندی همانندسازی (Replication timing) می‌گویند (Yamazaki, Hayano, and Masai 2013). به‌طور کلی منشأهای همانندسازی را در سه کلاس منشأهای شروع‌شونده در مرحله ابتدایی (Early)، منشأهای شروع‌شونده در مرحله میانی (Mid) و منشأهای شروع‌شونده در مرحله پایانی (Late) قرار می‌دهند (Li et al. 2001).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که عوامل زیادی در تنظیم زمان‌بندی فرایند همانندسازی نقش دارند. یکی از این عوامل مهم، پروتئین Rif1 است که در تنظیم برنامه زمان‌بندی همانندسازی در مخمر و یوکاریوت‌های پیشرفته‌تر نقشی اساسی را بازی می‌کند. پروتئین Rif1 نخستین‌بار در سال 1992 در مخمر و به‌عنوان عامل تنظیم‌کننده طول تلومر شناخته شد (Hardy, Sussel, and Shore 1992). با توجه به کشف نقش تعیین‌کننده این پروتئین در تنظیم زمان‌بندی همانندسازی در سال‌های اخیر به آن بسیار توجه شده است (H Masai et al. 2010). پروتئین Rif1 دارای سه بخش N-ترمینال، C-ترمینال و یک ناحیه میانی با ساختار نامنظم ذاتی بین نواحی C-ترمینال و N-ترمینال است (Sreesankar et al.

2012). ناحیه C-ترمینال از پروتئین Rif1 سه زیر دمین (Sub domains I-III) دارد و می‌تواند به DNA متصل و سپس الیگومریزه شود. از این طریق Rif1 می‌تواند تعداد زیادی فیبر کروماتینی را متصل به هم نگه دارد و با ایجاد compartmentهای کروماتینی بر فعالیت‌های کروموزوم اثرات تحریکی یا مهارتی داشته باشد. تنظیم معماری کروماتین به‌وسیله Rif1 و در نتیجه تنظیم فرایند زمان‌بندی همانندسازی DNA می‌تواند بر عملکردهای دیگر کروموزوم نظیر نو ترکیبی، رونویسی و ترمیم نقش داشته باشد (H Masai et al. 2010; Xu et al. 2010).

بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد، الگوی زمان‌بندی همانندسازی DNA در برخی از بیماری‌ها و همچنین سلول‌های سرطانی دچار تغییر می‌شود. این نتایج پتانسیل پروفایل زمان‌بندی همانندسازی برای مطرح‌شدن به‌عنوان یک بیومارکر تشخیصی را نشان می‌دهد. همچنین، افزایش بیان Rif1 در سلول‌های سرطان پستان، احتمال استفاده از این پروتئین را به‌عنوان یک مارکر تشخیصی قوت بخشیده است (Yamazaki, Hayano, and Masai 2013).

به صورت طبیعی حضور توالی‌های تکراری وارونه در ساختار DNA باعث می‌شود احتمال شکل‌گیری (G4) DNA quadruplex G افزایش یابد. G4 DNA در فرایند-های سلولی مهمی مانند تنظیم رونویسی، همانندسازی و ترمیم DNA نقش اساسی دارد و پروتئین‌های زیادی وجود دارند که فقط به این ساختارها متصل می‌شوند (Brazda et al. 2011). مطالعات مختلف، اتصال اختصاصی و با تمایل بالای پروتئین Rif1 به G4 DNA را نشان می‌دهد. این تمایل برای DNA دورشته‌ای و تک‌ رشته‌ای بسیار پایین است. به‌طوری‌که حتی در حضور DNA دورشته‌ای و تک‌ رشته‌ای با غلظت 25 برابر، پروتئین Rif1 همچنان به صورت متصل به G4 DNA باقی می‌ماند (Sukackaite et al. 2014). در سال 2015 محققان ژاپنی 35 ناحیه متصل‌شونده به پروتئین Rif1 با

شده است، این دترجنت در غلظتی پایین (0/1 تا 2 %) استفاده شده است (Burgess, 2009).

مواد و روش ها

کشت و رشد میکروارگانیسم

برای کشت باکتری *E. coli* از محیط لوریا برتانی (L.B) با pH 7/4 به عنوان محیط پایه استفاده شد. محیط های مایع در انکوباتور شیکردار با دور 180rpm و در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. محیط های کشت پایه پس از تهیه، با حجم 20 میلی لیتر در فلاسک های ارلن مایر 100 توزیع و اتوکلاو شدند. میزان جذب نوری سوسپانسیون باکتری در طول موج 620 نانومتر در برابر محیط کشت تلقیح نشده به عنوان شاهد در دستگاه UV-VIS اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

ساخت سازه حاوی muRif1-CTD و کلونینگ آن در

باکتری *E. coli* BL21 (DE3)

بررسی بیان پروتئین muRif1-CTD در وکتور pPAL7 که حاوی Profinity eXact™ tag است، انجام شد. به منظور ساخت سازه، طراحی پرایمر برای قراردادن ژن muRif1-CTD در وکتور pPAL7 و بهینه سازی شرایط PCR برای این پرایمرها انجام شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز برای ژن مورد نظر با استفاده از پرایمر رفت حاوی جایگاه برش آنزیم HindIII با توالی:

TTC AAA GCT TTG ATT AGA CGT GTC
TCG TTT GC
Tm: 60.7

GC%: 40.6%

جایگاه برش آنزیم BamH1 در پرایمر برگشت با

توالی:

AAA GGA TCC TTA AGA ATT TTC ATG
GGC TGG TGA
Tm: 62.9
GC%:46.9%

انجام شد.

تمایل بالا در کروموزوم مخمر در حال تقسیم را شناسایی و گزارش کردند (Kanoh et al. 2015).

در زمینه بیان پروتئین Rif1، بخش عمده ای از این پروتئین ساختار ندارد. به همین دلیل تلاش های بسیاری که در زمینه بیان نو ترکیب این پروتئین یا بخش هایی از آن در سیستم پروکاریوتی شده است، به صورت نامحلول بوده یا پایداری پروتئین حاصل بسیار کم بوده است. بنابراین، مطالعات کنونی در این باره بیشتر به بیان این پروتئین در میزبان یوکاریوتی معطوف است.

هدف از انجام دادن این مطالعه بیان ناحیه C-ترمینال پروتئین Rif1 به صورت محلول در میزبان *E. coli* و همچنین ارزیابی اتصال این پروتئین به DNA G4 است. یکی از چالش های مهمی که هنگام بیان پروتئین ها با میزان بالا در سیستم های پروکاریوتی با آن مواجه هستیم، نامحلول بودن پروتئین بیان شده است (Lilie, Schwarz. 2010; and Rudolph 1998; Tao et al. 2010). برای حل این مشکل راهکارهای متفاوتی وجود دارد که یکی از آنها استفاده از دترجنت هایی است که ضمن افزایش حلال بودن پروتئین هدف، به ساختار و عملکرد آن آسیب نزنند. پیشتر محققان درباره استفاده از این دترجنت ها گزارش داده اند؛ برای مثال Leibly و همکاران این مطالعات را با یکدیگر مقایسه و گزارش کردند (Leibly et al. 2012).

سارکوزیل یک دترجنت ملایم است که از حدود 40 سال پیش در دستورالعمل های تخلیص پروتئین استفاده می شده است. این دترجنت نخستین بار برای محلول کردن انکلوژن بادی های حاصل از پروتئین های نو ترکیب استفاده می شده است. اگرچه سارکوزیل یک گروه کربوکسیل باردار مشابه SDS دارد، اما اثرات آن بر ساختار پروتئین بسیار خفیف تر است (Frankel, Sohn, and Leinwand 1991; Massiah, M.A., Wright, K.M., and Du 2016; Pullara et al. 2013) در بسیاری از مطالعات گذشته که از سارکوزیل برای محلول کردن انکلوژن بادی ها استفاده

انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد با دور 220 rpm به مدت 4 ساعت گرماگذاری شد. پس از این زمان، از محیط پیش کشت به محیط TB حاوی آمپی سیلین تلقیح و در دمای 37 درجه سانتی گراد با دور 220 rpm قرار داده شد تا به دانسیته نوری (OD) معادل 0/5-0/6 برسد. پس از این زمان ایزوپروپیل بتا-دی-1-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی 0/5 میلی مولار به عنوان القاکننده به محیط افزوده شد. هم زمان به عنوان نمونه شاهد، محیط کشتی با شرایط مشابه با شرایط قبل از همان کلنی مثبت تهیه شد، اما القا برای این محیط صورت نگرفت (محیط کنترل مثبت). یک کلنی از سلول های BL21 بدون پلاسمید نو ترکیب نیز با شرایط یکسان با کلنی مثبت حاوی پلاسمید نو ترکیب، به عنوان نمونه کنترل منفی هم زمان کشت داده شد. سپس، محیط های کشت القاشده و القاشده به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد با چرخش 220 دور در دقیقه قرار داده شد.

بررسی بیان پروتئین Profinity eXact-muRif1-CTD

پس از گذشت مدت زمان مناسب به منظور بیان پروتئین، سلول ها با دور $4000 \times g$ سانتریفیوژ، پلت باکتریایی به دست آمده در بافر لیز (Phosphate pH 7.4, NaCl 150 mM) حل و سونیکه شدند (7 بار، 10 ثانیه ضربه و 30 ثانیه استراحت). بعد از سونیکه شدن، قسمت پروتئین های محلول با سانتریفیوژ $12000 \times g$ به مدت 20 دقیقه از قسمت نامحلول جدا شد.

الکتروفورز پروتئین ها (SDS-PAGE) با روش تغییر یافته لاملی انجام شد. بدین شکل که از غلظت 5 درصد اکریل آمید برای ژل جمع کننده و از 12,5 درصد اکریل آمید برای ژل جدا کننده استفاده شد. نمونه ها با جوشانده شدن در یک درصد وزنی /حجمی SDS در حضور 2-مرکاپتواتانول (شرایط احیایی) آماده شدند.

سازه یوکاریوتی (موشی) حاوی ژن muRif1-CTD از تیم ژاپنی و از سمت دیگر وکتور pPAL7 از باکتری E. coli DH5 α استخراج شدند. ژن muRif1-CTD و پلاسمید بیانی pPAL7 توسط آنزیم های محدود کننده BamH1 و HindIII به شکل جداگانه هضم آنزیمی و cleanup و محصولات هضم شده توسط کیت خالص سازی محصول PCR (Bioneer, South Korea) خالص شدند. سپس، قطعه ژنی و پلاسمید هضم شده توسط آنزیم لیگاز به هم متصل شدند. باکتری E. coli سویه XL1-Blue به عنوان میزبان کلونینگ استفاده شد. این باکتری با پلاسمید حاصل، ترانسفورم و سپس، روی محیط LB جامد حاوی آمپی سیلین (100 میکروگرم در میلی لیتر) کشت داده شدند. کلنی های مثبت دارای پلاسمید نو ترکیب (که به دلیل داشتن ژن مقاومت آمپی سیلین روی محیط جامد رشد کرده اند) انتخاب و صحت حضور پلاسمید مورد نظر در این سویه با روش کلنی PCR و روش هضم دوگانه با آنزیم های محدود کننده تأیید شد. پلاسمید نو ترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، استخراج و برای اطمینان از صحت توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator تعیین توالی شد. پس از اطمینان از صحت توالی مورد نظر، باکتری E. coli BL21(DE3) با پلاسمید استخراج شده، ترانسفورم و سپس روی محیط LB دارای آمپی سیلین کشت داده شد. کلنی های BL21 مثبت (دارای پلاسمید نو ترکیب) pPAL7 که روی محیط LB جامد دارای آمپی سیلین رشد کرده بود، برای بررسی صحت حضور پلاسمید نو ترکیب در آن با روش کلنی PCR و روش هضم دوگانه با آنزیم های محدود کننده تأیید شدند.

شرایط بیان پروتئین

یکی از کلنی های مثبت به محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین به عنوان پیش کشت تلقیح و در شیکر

استفاده از دترجنت‌های مختلف برای محلول‌سازی

Profinity eXact-muRif1-CTD

به منظور محلول‌سازی پروتئین از دترجنت‌های مختلف از جمله (0%/2 و 1%/ Triton X-100، (0%/1 و 1%/ SDS و (3%/ Sarcosyl استفاده شد. غلظت‌های مختلف دترجنت در بافر لیز پس از سونیکاسیون افزوده و میزان محلول‌سازی پروتئین بررسی شد.

بهینه‌سازی غلظت دترجنت منتخب (سارکوزیل) به

منظور محلول‌سازی پروتئین

به منظور بهینه‌سازی غلظت دترجنت مورد استفاده و یافتن حداقل غلظت مورد نیاز از دترجنت برای محلول‌سازی، غلظت‌های مختلف دترجنت (0، 0/1، 0/2، 0/3، 0/4، 0/5، 1، 2، 10 درصد (w/v) استفاده شد.

حذف سارکوزیل به روش دیالیز

برای حذف سارکوزیل از روش دیالیز استفاده شد. به این صورت که محلول پروتئینی حاوی سارکوزیل در کیسه دیالیز با Cut off 10 کیلودالتون قرار داده و علیه بافر لیز بدون دترجنت دیالیز شد. تعویض محلول دیالیز هر 12 ساعت یک بار بود و میزان حذف سارکوزیل توسط اسپکتروفتومتری در هر 24 ساعت بررسی شد. در زمان بررسی حذف دترجنت نمونه بافر خارج از کیسه دیالیز نیز بررسی شد.

بررسی خالص‌سازی پروتئین محلول‌شده

از آنجاکه پروتئین muRif1-CTD، به وسیله وکتور pPAL7 بیان شده بود، در ابتدای N-ترمینال آن برچسب Profinity eXact قرار گرفته بود. برای خالص‌سازی پروتئین می‌توان از این برچسب که به ستون Profinity exact متصل می‌شود، استفاده کرد. این ستون حاوی آنزیم سوبتیلزین تثبیت‌شده در رزین است که قابلیت برش بدون افزودن اسید آمینه دارد. آنزیم با افزودن یون آزید،

فلوراید یا کلراید به محلول Elution، فعال و برش انجام می‌شود که در نتیجه آن پروتئین بدون برچسب از ستون خارج می‌شود. شایان ذکر است که این یون‌ها به ترتیب قدرت برش کمتری را به آنزیم می‌دهند. به همین دلیل استفاده از 10 میلی‌مولار سدیم آزید و یا 100 میلی‌مولار سدیم فلوراید توصیه می‌شود (در این پژوهش از یون فلوراید استفاده شده است). پس از خروج پروتئین می‌توان با استفاده از 100 میلی‌مولار فسفریک اسید برچسب وصل‌شده به آنزیم را از آن جدا کرد. بافر مورد استفاده در تمامی مراحل باید بافر فسفات 100 میلی‌مولار و بدون هرگونه یونی باشد که باعث فعال‌سازی آنزیم می‌شود.

تشکیل ساختار DNA چهار رشته‌ای

برای تهیه ساختارهای DNA چهار رشته‌ای، الیگونوکلوئوتیدها با غلظت 4 میکرومولار در دمای 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه در آب حرارت دیدند. سپس، با افزودن بافر 20 میلی‌مولار Tris-HCl pH 7/4، حاوی 100 میلی‌مولار KCl، رقیق (غلظت نهایی 1 میکرومولار) و به آرامی به مدت 2 ساعت تا رسیدن به دمای اتاق سرد شدند. نمونه‌ای در همان شرایط با 5 میلی‌مولار MgCl₂ به جای KCl ساخته شد.

تأیید تشکیل ساختار DNA چهار رشته‌ای

شکل‌گیری ساختار DNA چهار رشته‌ای از طریق فلورسانس کاتیون بنزوتیازولیوم 3 و 6-دی متیل-2- (4-دی متیل آمینو فنیل)¹، (ThT)، و طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD) بررسی شد.

بررسی ساختار DNA چهار رشته‌ای توسط ThT

غلظت ThT با استفاده از ضریب خاموشی مولی $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 36000¹ در آب در 412 نانومتر محاسبه و استوک 5

1. 3,6-Dimethyl-2-(4-dimethylaminophenyl) benzothiazolium cation (ThT)

روش اتیدیوم برماید و رنگ آمیزی نقره استفاده شد. از روش مرسوم برای رنگ آمیزی اتیدیوم برماید استفاده شد. برای رنگ آمیزی نقره، کومار و همکارانش روشی ساده و کارآمد برای تشخیص باند پلی مورفیک در گیاهان ارائه داده و در تحقیقاتشان 11 روش مختلف را با روش خود مقایسه کرده اند. روش پیشنهادی کومار به عنوان روش منتخب در مطالعه ما بررسی شد (Kumar et al. 2015).

شرایط بافر اتصال مورد استفاده برای بررسی برهم کنش 20 G4 / Profinity eXact-muRif1-CTD میلی مولار Tris-HCl، pH 7/4، 1 میلی مولار DTT، 0.1 میلی مولار EDTA، 50 میلی مولار KCl، 5 درصد گلیسرول به همراه 200 میکروگرم بر میلی لیتر آلبومین سرم گاو (تازه ساخته شده یا نگهداری شده در دمای 20- درجه سانتی گراد) بود. محققان مختلف از این شرایط استفاده کرده بودند (Renaud de la Faverie et al. 2014).

Profinity eXact-muRif1-CTD و G4 در بافر اتصال در 30 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. کل حجم واکنش روی ژل به منظور تجزیه و تحلیل تعامل بارگذاری و ژل در 60 ولت به مدت 2 ساعت در 1x TBE انجام شد.

نتایج

بررسی بیان و محلول سازی پروتئین Profinity eXact-muRif1-CTD

همان طور که در شکل 1 نشان داده شده است، بخش muRif1-CTD از وکتور یوکاریوتی دریافت شده از تیم ژاپنی به وکتور پروکاریوتی منتقل و صحت توالی توسط توالی یابی بررسی شد. نتایج بررسی بیان این پروتئین در دو دمای 37 و 18 درجه سانتی گراد نشان می دهد، این پروتئین در این دو دما به صورت نامحلول است (شکل 2).

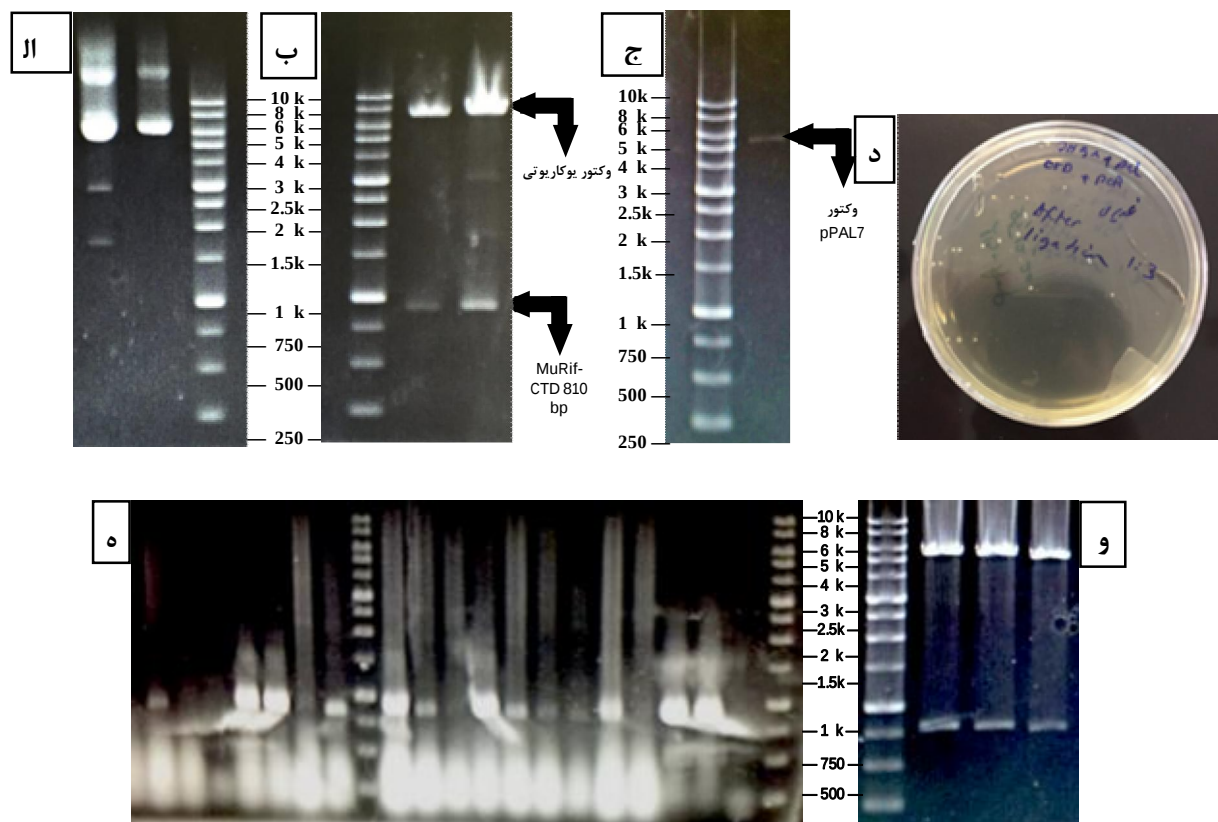
میلی مولار از آن تهیه شد. مخلوطی از ThT و الیگونوکلوئید در غلظت های نهایی به ترتیب، 1 و 0/5 میکرومولار در دمای اتاق تهیه شد. کمپلکس های به شدت فلورسنت 1:1 به صورت غالب در محلول ایجاد شده که دارای حداکثر انتشار فلورسانس در 490 نانومتر پس از تهییج در طول موج 425 نانومتر (Renaud de la Faverie et al. 2014) در طیف سنجی فلورسانس قرار دارند (LS 55، شرکت PerkinElmer، آمریکا). اسکن های فلورسانس هر 2 نانومتر بین 450 تا 700 نانومتر با تهییج در طول موج 425 نانومتر انجام می شدند.

بررسی ساختار DNA چهار رشته ای توسط دورنگ نمایی دورانی

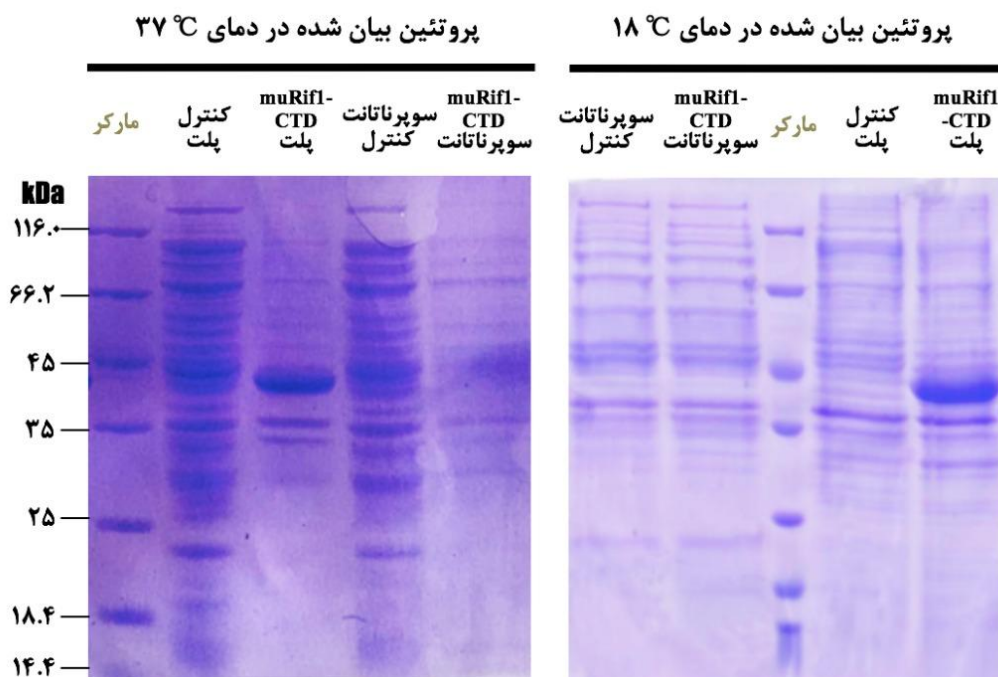
طیف های CD در دستگاه طیف سنج Jasco J-715 (ژاپن) با استفاده از یک کووت کوارتز با طول مسیر 1 سانتی متر در حجم واکنش 300 میکرولیتر در 20 درجه سانتی گراد ثبت شد. اسکن از 220 تا 320 نانومتر با سرعت 200 نانومتر در دقیقه، با پیچ² یک نانومتر و پهنای باند یک نانومتر انجام شد. غلظت DNA بین 4 تا 5 میکرومولار بود. برای هر آزمایش به طور متوسط دو اسکن گرفته شد و طیف بافر 20 میلی مولار Tris-HCl حاوی 100 میلی مولار KCl از خوانش ها کاسته شد. این آزمایش با استفاده از بافر HEPES به جای Tris-HCl نیز تکرار شد، زیرا از این بافر به عنوان بافر اتصال استفاده می شود (Bedrat et al. 2014; Renaud de la Faverie et al. 2014).

روش تغییر تحرک الکتروفورتیک (EMSA) به منظور بررسی اتصال پروتئین با DNA

به منظور راه اندازی روش EMSA، شرایط مختلف الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) بررسی شد. برای تشخیص غلظت G4 در تحقیقات (1 پیکومول) دو



شکل 1. ساخت سازه ژنی حاوی ژن *muRif1-CTD*. الف - استخراج پلاسمید *pPAL7* و وکتور حاوی *muRif1-CTD*؛ ب - هضم دوگانه وکتور یوکاریوتی حاوی ژن؛ ج - هضم دوگانه پلاسمید *pPAL7*؛ د - ترانسفورماسیون باکتری با وکتور *pPAL7* حاوی ژن بعد از لایگیشن؛ ه - تأیید حضور ژن توسط کلنی PCR مربوط به کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین؛ و - هضم دوگانه کلنی‌های مثبت به منظور تأیید حضور ژن.



شکل 2. بیان پروتئین Profinity eXact tag-muRif1-CTD و آنالیز خالص سازی پروتئین. آنالیز بیان Profinity eXact tag-muRif1-CTD در *E. coli* BL21 DE3 در محیط حاوی 0/5 میلی مولار IPTG، در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت و با همان شرایط در دمای 18 درجه سانتی گراد به مدت 20 ساعت.

سارکوزیل برای محلول سازی پروتئین بررسی شد و حداقل غلظت مناسب برای محلول سازی پروتئین 0/3 % به دست آمد (شکل 3-الف و ب).

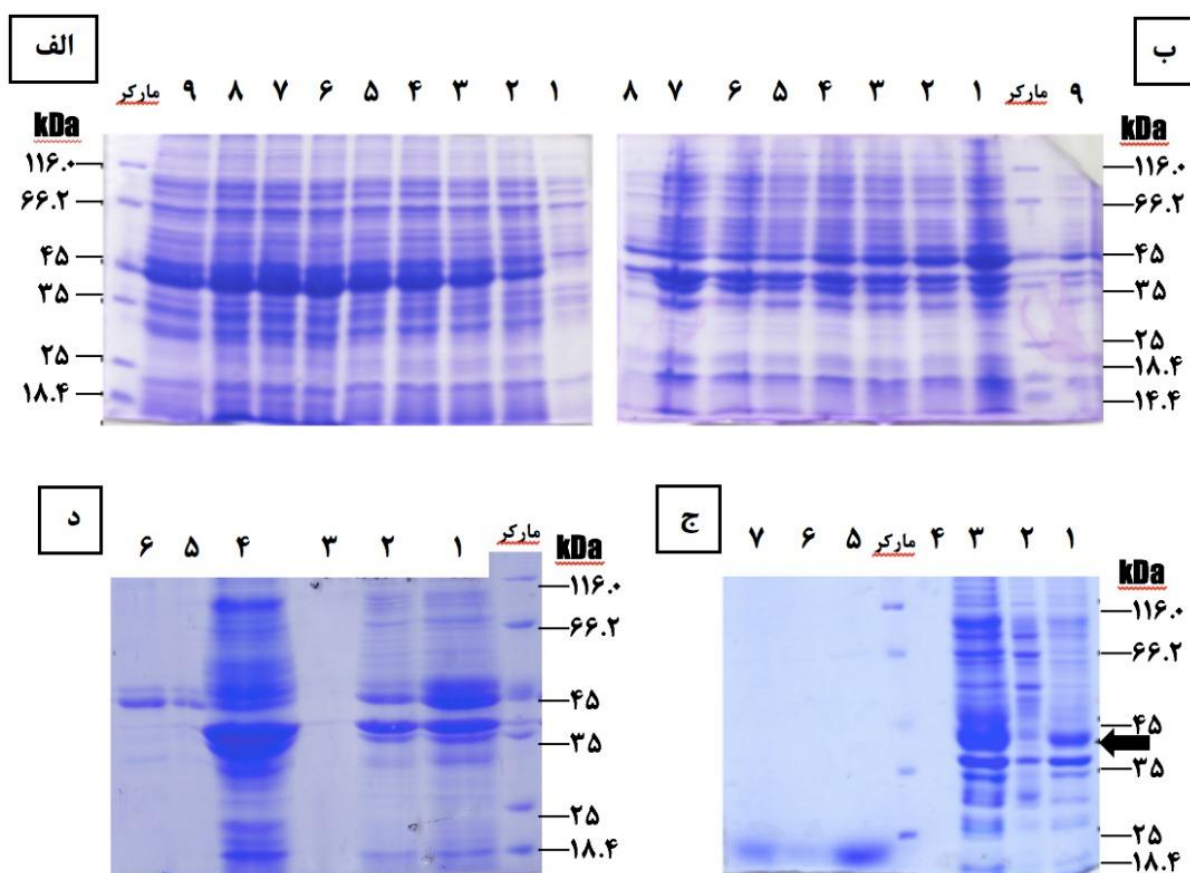
حذف دترجنت از پروتئین محلول شده با دیالیز
انجام اسپکتروفتومتری به منظور بررسی حذف دترجنت از محلول پروتئینی (شکل 4) نشان داد که این دترجنت بعد از گذشت یک و حتی دو روز همچنان به صورت متصل به پروتئین باقی می ماند. در روز دوم غلظت دترجنت به مقدار بسیار زیادی کاهش یافت و تجمعات پروتئینی در محلول داخل کیسه دیالیز دیده شد.

بررسی خالص سازی پروتئین Profinity eXact-muRif1-CTD
خالص سازی پروتئین بعد از 24 ساعت دیالیز نشان داد که این پروتئین از ستون در مرحله Elution خارج

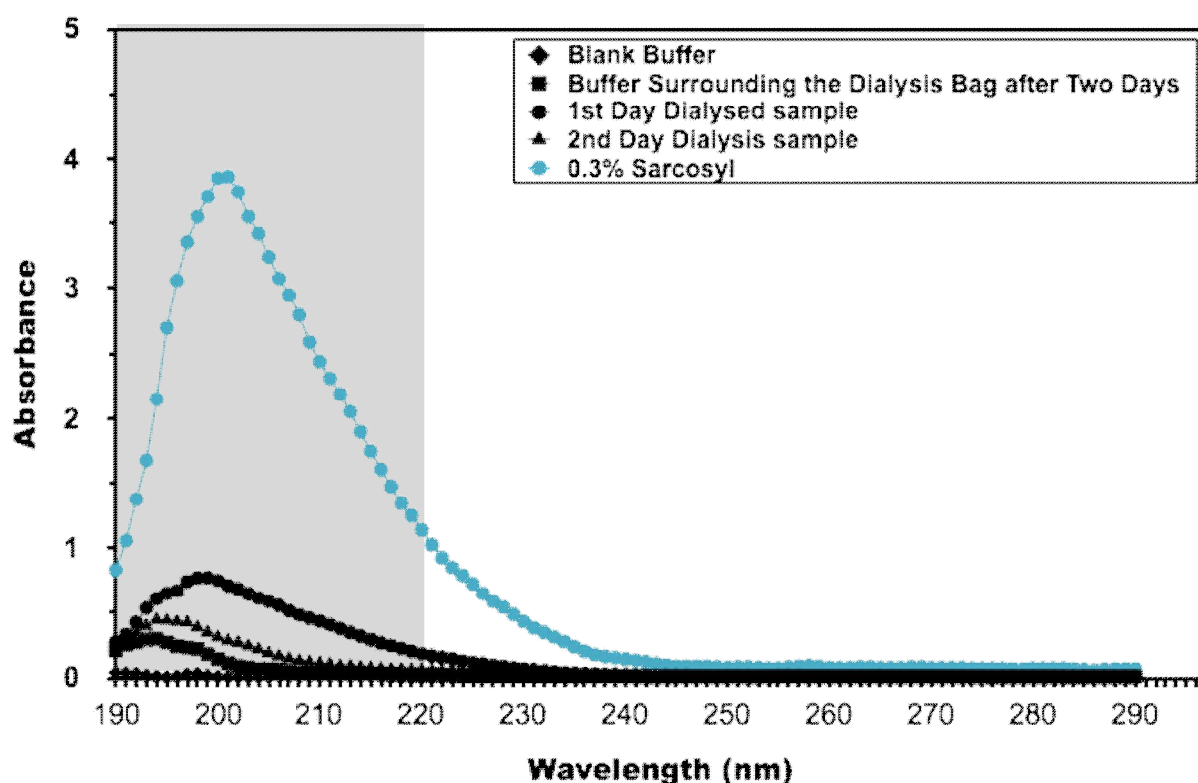
محلول سازی پروتئین Profinity eXact-muRif1-CTD
بیش از 12 نوع استراتژی مختلف برای محلول سازی پروتئین استفاده شد که هیچ کدام در بیان محلول پروتئین مؤثر نبودند (نتایج این موارد در این مقاله آورده نشده است). این استراتژی ها شامل: بافر لیز مختلف، افزودنی های مختلف به بافر لیز، افزودنی های مختلف به محیط بیان، زمان مختلف بیان، میزبان های مختلف بیانی، محیط های کشت مختلف، غلظت های مختلف IPTG، استفاده از لاکتوز به جای IPTG، استفاده از روش Auto induction، افزودن گلوکز، دانسیته متفاوت نوری در زمان القا و بررسی این استراتژی ها به صورت ترکیبی بودند. در این میان، پس از استفاده از دترجنت های مختلف، سارکوزیل (10%) توانست باعث محلول سازی پروتئین شود. سایر دترجنت های امتحان شده نتوانستند محلول سازی پروتئین انجام دهند. غلظت های مختلف

نمی‌شود، ولی بعد از استفاده از اسید فسفریک فقط برچسب استفاده شده در این سازه (همان Profinity eXact) را می‌توان مشاهده کرد (شکل 3-ج). همچنین، این امکان وجود داشت که پروتئین به صورت کامل با استفاده از اسید فسفریک بیرون کشیده شود، ولی از آنجاکه اثرات فسفریک اسید بر ساختار پروتئین پیش‌بینی‌پذیر

نبود، از این پروتئین برای بررسی اتصال استفاده نشد. در اینجا از مزیت بیان در انکلوژن بادی استفاده شد که پس از 3 بار شسته شدن پلت از بافر حاوی سارکوزیل به منظور محلول سازی استفاده شد. این پروتئین به صورت محلول و بیشتر از 95٪ خالص است (شکل 3-د).



شکل 3. محلول سازی و خالص سازی Profinity eXact tag-muRif1-CTD. الف- سوپرناتانت بافر لیز حاوی سارکوزیل با غلظت‌های به ترتیب 0.0، 0.1، 0.2، 0.3، 0.4، 0.5، 1.0، 2.0 درصد (w/v) سارکوزیل، چاهک شماره 9 نمونه حاوی بافر لیز بدون سارکوزیل است. ب- پلت بافر لیز حاوی سارکوزیل با غلظت‌های به ترتیب 0.0، 0.1، 0.2، 0.3، 0.4، 0.5، 1.0، 2.0 درصد (w/v) درصد سارکوزیل است. ج- خالص سازی Profinity eXact tag-muRif1-CTD. 1. سوپرناتانت باکتریایی حاوی پروتئین Profinity eXact tag-muRif1-CTD بعد از زدن سارکوزیل، 3. پلت باکتریایی بیان کننده Profinity eXact tag-muRif1-CTD بدون سارکوزیل، 4. فراکشن‌های مربوط به خالص سازی Profinity eXact tag-muRif1-CTD. 5-7. فراکشن‌های مربوط به جداسازی برچسب Profinity eXact tag-muRif1-CTD. د- شست و شوی انکلوژن بادی Profinity eXact tag-muRif1-CTD. 1. پلت بیان Profinity eXact tag-muRif1-CTD، 2. سوپرناتانت بیان Profinity eXact tag-muRif1-CTD، 3. خالی، 4. سوپرناتانت شست و شوی پلت، 5. پلت پروتئین Profinity eXact tag-muRif1-CTD حل شده در بافر حاوی سارکوزیل 0.3٪، 6. سوپرناتانت پروتئین Profinity eXact tag-muRif1-CTD حل شده در بافر حاوی سارکوزیل 0.3٪.



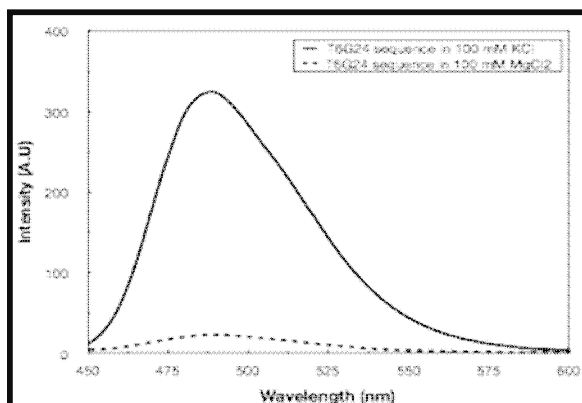
شکل 4. بررسی حذف سارکوزیل با روش دیالیز. طیف UV پروتئین محلول شده با سارکوزیل (0/3%) که علیه همان بافر که در آن حل شده (بافر فسفات 25 میلی مولار، 150 میلی مولار NaCl) و بدون سارکوزیل است، دیالیز شد. محدوده مشخص شده به رنگ خاکستری، به جذب سارکوزیل در این ناحیه مربوط می شود.

شکل گیری ساختار G4 و تأیید آن

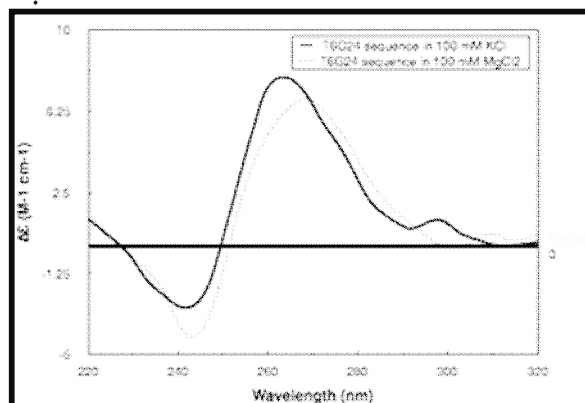
برای بررسی شکل گیری G4 با توالی T6G24، تجزیه و تحلیل فلورسانس با استفاده از روش ThT انجام شد. افزایش انتشار در 490 نانومتر از مخلوط حاوی ThT و G4 تشکیل ساختار G4 را نشان می دهد که این موضوع در حضور $MgCl_2$ به جای KCl مشاهده نشده است (شکل 5-الف).

الگوی طیف دورنگ‌نمایی دورانی G4 موازی، یک باند مثبت در حدود 260 نانومتر و یک باند منفی نزدیک به 240 نانومتر دارد که در حضور یون پتاسیم در طیف CD سکانس T6G24 مشاهده شد. استفاده از $MgCl_2$ این توپولوژی را برای ساختار G4 ایجاد نمی کند، زیرا به نظر می رسد Mg^{2+} تشکیل ساختارهای G4 را بی ثبات می کند (شکل 5-ب).

الف Fluorescence analysis



ب Circular Dichroism analysis

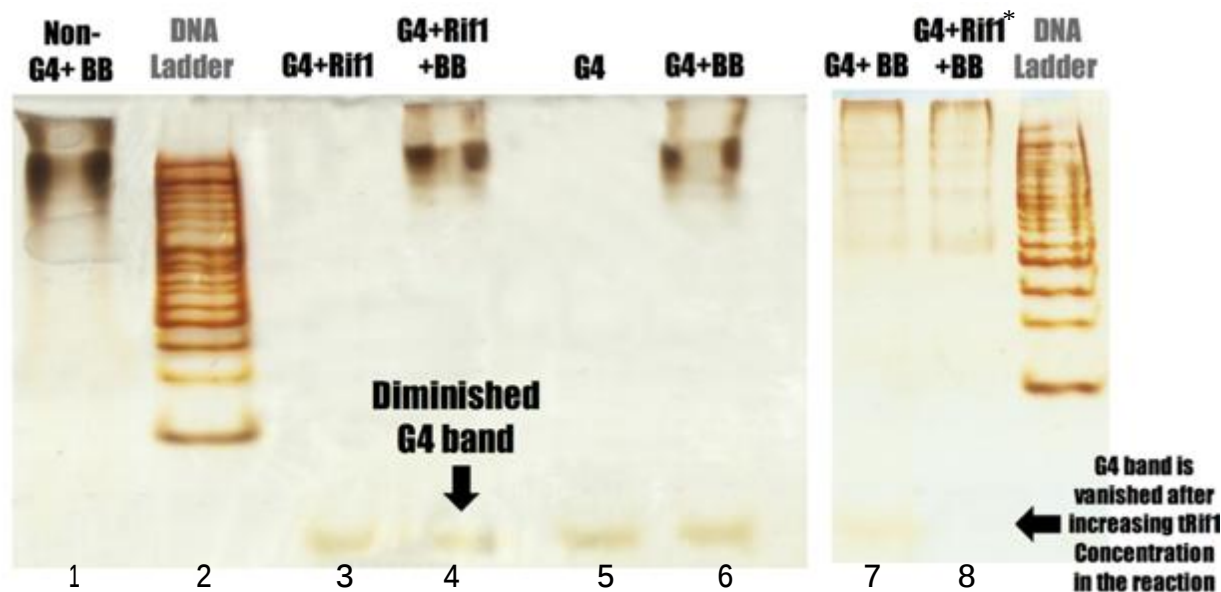


شکل 5. بررسی تشکیل ساختار G4. الف- آنالیز فلورسانس سکانس T6G24 توسط ThT، که در حضور 100 میلی مولار KCl (خط پیوسته)، در حضور 100 میلی مولار $MgCl_2$ (خط ناپیوسته)، ب- آنالیز CD سکانس T6G24 تشکیل شده در حضور 100 میلی مولار KCl (خط پیوسته)، در حضور 100 میلی مولار $MgCl_2$ (خط ناپیوسته).

این مطالعه، از شیب 4-12٪ (6 لایه) به عنوان بهترین حالت آشکارسازی PAGE برای شناسایی توالی های تشکیل دهنده G4 و غیر G4 استفاده شد. بهترین بافر برای انجام PAGE، TBE (تریس، اسید بوریک، EDTA) بود، زیرا ترکیب KCl و گلیسرول هیچ تأثیری در تشخیص G4 در ژل نداشت. بهترین غلظت G4 که با این روش تشخیص پذیر بود، بین 0.1-1 پیکومول بود. در آزمایشی دیگر، غلظت بیشتری از G4 یعنی 10 پیکومول نیز استفاده شده است، اما این غلظت در انتهای ژل اسمیر بزرگی تشکیل می داد و تشخیص ناپدید شدن آن بسیار سخت بود.

بررسی میان کنش Profinity eXact-muRif1-CTD و G4 با روش EMSA

برای تجزیه و تحلیل میان کنش Profinity eXact-muRif1-CTD و G4 از روش EMSA استفاده شد که نتایج آن در شکل 6 آورده شده است. بررسی بهترین شرایط نشان داد که از بین روش های مختلف تشخیص، رنگ آمیزی نقره که کومار و همکاران پیشنهاد کردند، برای تشخیص DNA جواب مناسب تری می داد (Kumar et al. 2015). این روش می توانست غلظت G4 مورد استفاده با تکرار آزمایش های مختلف تشخیص دهد. همچنین، غلظت ژل برای تشخیص ساختار G4-DNA مهم بود. در



¹Rif1: در ژل مربوط به این تصویر غلظت بالاتر پروتئین به کار برده شده است.

شکل 6. بررسی برهم کنش پروتئین محلول شده Profinity eXact-muRif1CTD با G4-DNA با روش ژل شیفت. Profinity eXact-muRif1CTD و G4-DNA (10 پیکومول معادل 9/664 میکروگرم)، میان کنش در حضور و عدم حضور بافر اتصال (Binding Buffer: (20 میلی مولار Tris-HCl، pH 7/4، 1 میلی مولار DTT، 0/1 میلی مولار EDTA، 50 میلی مولار KCl، 5% گلیسرول، 200 میکروگرم در میلی لیتر BSA). 1. non-G4 در حضور بافر اتصال، 2. مارکر، 3. G4، 4. G4 و Profinity eXact-muRif1CTD در حضور بافر اتصال، 5. G4 و Profinity eXact-muRif1CTD در عدم حضور بافر اتصال، 6. G4 در حضور بافر اتصال، 7. G4 در حضور بافر اتصال، 8. G4 و Profinity eXact-muRif1CTD در حضور بافر اتصال (در این واکنش از غلظت بالاتر پروتئین استفاده شد).

بحث و نتیجه گیری

مطالعات اخیر نشان می دهد، عوامل زیادی در تنظیم زمان بندی فرایند همانندسازی نقش دارند. یکی از این عوامل مهم پروتئین Rif1 است که در تنظیم برنامه زمان بندی همانندسازی در مخمر و یوکاریوت های پیشرفته تر نقشی اساسی دارد. Rif1 به عنوان یک پروتئین مهم در تکثیر و ترمیم DNA مطرح است. به منظور تعیین عملکردهای مولکولی Rif1 این پروتئین باید خالص سازی و چگونگی تنظیم بسیاری از فرایندهای موجود در سلول توسط این پروتئین مشخص شود. بررسی های اخیر نشان می دهد، الگوی زمان بندی همانندسازی DNA در برخی از بیماری ها و همچنین سلول های سرطانی تغییر می کند. این نتایج پتانسیل پروفایل زمان بندی همانندسازی برای

مطرح شدن به عنوان یک بیومارکر تشخیصی را نشان می دهد. همچنین، افزایش بیان Rif1 در سلول های سرطان پستان، احتمال استفاده از این پروتئین را به عنوان یک مارکر تشخیصی قوت بخشیده است (Yamazaki, Hayano, and Masai 2013).

پیش از این، Rif1 و بخش های مختلف آن در یک سیستم بیانی یوکاریوتی با استفاده از سلول های 293T HEK با روشی مناسب و مقرون به صرفه بیان شده بود (Moriyama, Yoshizawa-Sugata, and Masai 2018). این پروتئین محلول بوده و نشان داده شده است که با توالی هایی که ساختار G4 را تشکیل می دهند، تعامل دارد (Kanoh et al. 2015; Moriyama, Yoshizawa-Sugata, and Masai 2018).

(2013)، نکته درخور تأمل چسبیدن دترجنت به ساختار پروتئین و جدانشدن آن از ساختار است (Chisnall et al. 2014)، در پروتئین muRif1-CTD نیز این موضوع آزمایش شد و با وجود اینکه این دترجنت باعث محلول سازی پروتئین شد، ولی اتصال آن به ساختار پروتئینی و خارج نشدن آن با دیالیز باعث شد از این پروتئین که دارای مقدار اندکی دترجنت (این مقدار قابل کمی سازی نبود) است در آنالیز اتصال پروتئین با G4 استفاده شود.

در بخشی از این مطالعه، درباره ایجاد ساختار G4 تحقیق شد که در آن پس از تشکیل ساختار G4، این مولکول ها با تست فلورسانس (ThT) و تست CD بررسی شدند. در تست ThT که اخیراً به عنوان ابزاری برای تشخیص ساختارهای G4 به ویژه نوع موازی آن معرفی شده است (Renaud de la Faverie et al. 2014)، ایجاد ساختار به صورت اولیه تأیید شد. این موضوع درباره ساختار تشکیل شده در حضور $MgCl_2$ مشاهده نشده است و افزایش فلورسانس فقط در ساختار ایجاد شده در حضور KCl دیده می شود. از آنجاکه در مطالعات قبلی ساختار موازی G4 استفاده شده در این بررسی، با آنتی بادی اختصاصی تأیید شده بود (Hisao Masai et al. 2019)، برای اطمینان از تست CD استفاده شد. در تست CD، برای هر دو ساختار G4 تشکیل شده در حضور KCl و $MgCl_2$ با اختلاف 10 نانومتری همان پیک های گزارش شده درباره G4 موازی مشاهده شدند. در مقاله ای در سال 2019 بیان شد که این پیک ها به ساختار صفحه ای B خطی مربوط می شوند (Mishra et al. 2019). در نهایت، روش ThT اثبات کرد G4 تشکیل شده است، اما این موضوع که آیا این ساختار شکل گرفته موازی، غیر موازی یا هیبرید است با استفاده از تحلیل CD تأیید و مشخص شد که در حضور یون K^+ ساختار G4

مسئله اصلی در بیان پروتئین Rif1 این است که پیش بینی می شود تا حد زیادی ساختار نامنظم دارد (Sukackaite et al. 2014) و خالص سازی پروتئین Rif1 کامل یا دمین های آن بسیار دشوار است (Moriyama, Yoshizawa-Sugata, and Masai 2018). بررسی ها نشان داد مقدار پروتئین بیان شده در میزبان یوکاریوتی بسیار کم است و به دلیل همراهی این پروتئین با غشای هسته، خالص سازی آن به صورت کامل حاصل نشد (Cornacchia et al. 2012; Sukackaite et al. 2014;) (Yamazaki, Hayano, and Masai 2013). این موضوع، مانع تحقیقات بیشتر روی این پروتئین شده و بیشتر مطالعات تاکنون با همان پروتئین نو ترکیب بیان شده در میزبان یوکاریوتی انجام شده است (Kano et al. 2015; Moriyama, Yoshizawa-Sugata, and Masai 2018). مطالعات مقایسه ای سیستم بیان E. coli نشان داد که بیان در مقیاس بالا برای >50٪ پروتئین های باکتریایی و >15٪ پروتئین های با منشأ دیگر، در شکل محلول آن است (Braun and LaBaer 2003; Rosano and Ceccarelli 2014).

ساختار کریستالی Rif1 در مخمر (ScRif1 CTD) نشان داده شده است و پیشنهاد می شود می توان عملکرد تترامریزاسیون برای این پروتئین متصور بود (H Masai et al. 2013; Shi et al. 2018). ساختار کریستال این پروتئین در پستانداران به دلیل نیاز به غلظت بالاتری از پروتئین محلول هنوز بررسی نشده است (برای ScRif1 این مقدار 3,5 میلی گرم در میلی لیتر بود) (Shi et al. 2013).

در این مطالعه، یک استراتژی جدید برای بیان muRif1-CTD به شکل محلول آن در E. coli ارائه داده شد. از بین چند دترجنت امتحان شده، فقط سارکوزیل توانست باعث محلول سازی پروتئین شود. کاربرد این دترجنت در موارد بسیار زیادی موفقیت آمیز بوده است (Chisnall et al. 2014; Frankel, Sohn, and Leinwand 1991; Massiah, Wright, and Du 2016; Pullara et al.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816114>.

4. Burgess, Richard. 2009. "Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins." *Methods in enzymology* 463: 259–82.

5. Chisnall, B, C Johnson, Y Kulaberoglu, and Y W Chen. 2014. "Insoluble Protein Purification with Sarkosyl: Facts and Precautions." *Methods Mol Biol* 1091: 179–86.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24203332>.

6. Cornacchia, D et al. 2012. "Mouse Rif1 Is a Key Regulator of the Replication-Timing Programme in Mammalian Cells." *EMBO J* 31(18): 3678–90.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850673>.

7. Frankel, S, R Sohn, and L Leinwand. 1991. "The Use of Sarkosyl in Generating Soluble Protein after Bacterial Expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4): 1192–96.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705029>.

8. Hardy, C F, L Sussel, and D Shore. 1992. "A RAP1-Interacting Protein Involved in Transcriptional Silencing and Telomere Length Regulation." *Genes Dev* 6(5): 801–14.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1577274>.

9. Kanoh, Y et al. 2015. "Rif1 Binds to G Quadruplexes and Suppresses Replication over Long Distances." *Nat Struct Mol Biol* 22(11): 889–97.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26436827>.

10. Kumar, Manu, Seong Ryong Kim, Prabodh Chander Sharma, and Ashwani Pareek. 2015. "Simple and Efficient Way to Detect Small Polymorphic Bands in Plants." *Genomics Data* 5: 218–22.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S213596015001075>.

11. Leibly, D J et al. 2012. "Stabilizing Additives Added during Cell Lysis Aid in the Solubilization of Recombinant Proteins." *PLoS One* 7(12): e52482.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285060>.

12. Lewin, B. 2014. *Lewin's GENES XI*. Jones & Bartlett Publishers.

13. Li, F et al. 2001. "The Replication Timing Program of the Chinese Hamster Beta-Globin Locus Is Established Coincident with Its Repositioning near Peripheral Heterochromatin in Early G1 Phase." *J Cell Biol* 154(2): 283–92.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470818>.

14. Lilie, Hauke, Elisabeth Schwarz, and Rainer Rudolph. 1998. "Advances in Refolding of Proteins

تشکیل شده موازی است (نمایش ساختار موازی G4 در شکل زیر ارائه شده است).

همچنین، بررسی‌های مربوط به تعامل آن با G4 با سنجش تغییر تحرک الکتروفورتیک (EMSA) انجام شد. تجزیه و تحلیل شیف در ژل نشان داد که این پروتئین با وجود محلول‌سازی با دترجنت می‌تواند به ساختار G4 متصل شود، اما هیچ برهم‌کنشی برای Profinity eXact-muRif1-CTD در حضور ساختارهای غیر G4 وجود نداشت. برای تأیید این که شرایط آزمایشگاهی معیوب نبوده است و به صورت مثبت کاذب نیست، از یک پروتئین کنترل با تقریباً همان وزن مولکولی استفاده کردیم و تعامل آن با G4 را بررسی کردیم. این پروتئین نمی‌توانست تعامل کند و باند برای G4 پس از اتمام واکنش اتصال کاملاً مشهود بود (داده مربوط به این ژل آورده نشده است). بنابراین، مشخص شد که Profinity eXact-muRif1-CTD با G4 در تعامل است.

مطالعه ما، مطالعات قبلی در زمینه اتصال Rif1-CTD پستانداران به ساختار G4 موازی T6G24 را تأیید کرد. در آزمایش‌های بعدی، این نتایج با رویکردی دقیق‌تر مانند تشدید پلاسمون سطحی (SPR) تأیید می‌شود تا با استفاده از این روش کمی ارزیابی برهم‌کنش، مشخص شود که muRif1-CTD به G4 با چه میزان تمایلی متصل می‌شود.

منابع

1. Bedrat, Amina et al. 2014. "Thioflavin T as a Fluorescence Light-up Probe for G4 Formation." : 1–8.
2. Braun, Pascal, and Josh LaBaer. 2003. "High Throughput Protein Production for Functional Proteomics." *Trends in Biotechnology* 21(9): 383–88. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00189-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00189-6).
3. Brazda, V, R C Laister, E B Jagelska, and C Arrowsmith. 2011. "Cruciform Structures Are a Common DNA Feature Important for Regulating Biological Processes." *BMC Mol Biol* 12: 33.

- From Membrane Receptors to Multiprotein Complexes." *Protein Expr Purif* 87(2): 111–19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137940>.
23. Renaud de la Faverie, A et al. 2014. "Thioflavin T as a Fluorescence Light-up Probe for G4 Formation." *Nucleic Acids Res* 42(8): e65. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510097>.
24. Rosano, Germán L, and Eduardo A Ceccarelli. 2014. "Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: Advances and Challenges." *Frontiers in microbiology* 5: 172. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860555>.
25. Shi, Tianlai et al. 2013. "Rif1 and Rif2 Shape Telomere Function and Architecture through Multivalent Rap1 Interactions."
26. Sreesankar, E et al. 2012. "Functional Diversification of Yeast Telomere Associated Protein, Rif1, in Higher Eukaryotes." *BMC Genomics* 13: 255. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22712556>.
27. Sukackaite, R et al. 2014. "Structural and Biophysical Characterization of Murine Rif1 C Terminus Reveals High Specificity for DNA Cruciform Structures." *J Biol Chem* 289(20): 13903–11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634216>.
28. Tao, Hu et al. 2010. "Benchmarks Purifying Natively Folded Proteins." : 61–63.
29. Xu, D et al. 2010. "Rif1 Provides a New DNA-Binding Interface for the Bloom Syndrome Complex to Maintain Normal Replication." *EMBO J* 29(18): 3140–55. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711169>.
30. Yamazaki, S, M Hayano, and H Masai. 2013. "Replication Timing Regulation of Eukaryotic Replicons: Rif1 as a Global Regulator of Replication Timing." *Trends Genet* 29(8): 449–60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23809990>.
- Produced in E. Coli." *Current Opinion in Biotechnology* 9(5): 497–501. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166998800359>.
15. Masai, H et al. 2010. "Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How?" *Annu Rev Biochem* 79: 89–130. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20373915>.
16. Masai, H et al. 2018. "Telomere-Binding Factors in the Regulation of DNA Replication." *Genes Genet Syst* 92(3): 119–25. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28674277>.
17. Masai, Hisao et al. 2019. "Rif1 Promotes Association of G-Quadruplex (G4) by Its Specific G4 Binding and Oligomerization Activities." *Scientific Reports* 9(1): 8618. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44736-9>.
18. Massiah, M.A., Wright, K.M., and Du, H. 2016. "Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS." In *Application to LB and M9 Minimal Media*, Curr. Protoc. Protein Sci., 1–6.
19. Massiah, Michael A, Katharine M Wright, and Haijuan Du. 2016. "Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl , Triton X-100 , and CHAPS : Application to LB and M9 Minimal Media." : 1–24.
20. Mishra, Subodh Kumar et al. 2019. "Characterization of Highly Conserved G-Quadruplex Motifs as Potential Drug Targets in Streptococcus Pneumoniae." *Scientific Reports* 9(1): 1791. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38400-x>.
21. Moriyama, K, N Yoshizawa-Sugata, and H Masai. 2018. "Oligomer Formation and G-Quadruplex Binding by Purified Murine Rif1 Protein, a Key Organizer of Higher-Order Chromatin Architecture." *J Biol Chem* 293(10): 3607–24. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29348174>.
22. Pullara, F et al. 2013. "A General Path for Large-Scale Solubilization of Cellular Proteins:

The expression of Recombinant C-terminal domain of Rif1 Protein and its Solubilization with Sarcosyl

Hamed Ghadiri¹, Sana Alavi², Bahareh Dabirmanesh³, Khosro Khajeh^{4*}

1. PhD, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. PhD, Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Accepted: 2019/10/23 Received: 2020/1/8

*Corresponding author: khajeh@modares.ac

Abstract:

The eukaryotic genome contains several replication Origins. Studies showed that the phenomenon and order of the origin activation is in a particular discipline, called the “**Replication Timing**”. Recent studies show that many factors are involved in regulating the timing of the replication process. One of the most important factors amongst them is the Rap1 interacting Factor 1 (Rif1) protein, which plays a key role in regulating the replication schedule in yeast and more advanced eukaryotes. Structure of this protein is mostly irregular and these properties prevent Rif1 from being expressed in a stable manner and makes it difficult to study.

The aim of the present study was to investigate the expression of recombinant C-terminal domain of mouse-Rif1(muRif1-CTD) protein in solution. For this purpose, the muRif1-CTD gene was extracted from eukaryotic constructs containing the complete Rif1 gene by PCR and was inserted into the pPAL7 expression vector comprising the Profinity eXact tag. Protein solubilization was carried out using different detergents and then detergent removal was performed by dialysis. In order to ensure that the soluble protein is active, the interaction analysis of the Rif1 protein with the G4 structures (previously reported to bind Rif1) was investigated using the gel shift assay. The results of this study showed the use of detergent for Rif1 solubilization without affecting its purification steps. But in the case of this protein, if the detergent is removed completely, it will not remain soluble.

Keywords: Rif1 protein, sarcosyl, solubilization, replication timing, expression in prokaryotic systems