

مقاله پژوهشی

افزایش حلالیت آنزیم نوترکیب گلوکاتایون S- ترانسفراز استخراج شده از ماهی سفید (*Rutilus kutum*) با استفاده از روش مبتنی بر چپرون در باکتری *Escherichia coli*

سارا تراضی^۱، حسین غفوری^{۲*}، سجاد صاری خان^۳، ریحانه سریری^۴

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۹

چکیده

دستیابی به مقدار زیادی از پروتئین نوترکیب به صورت محلول یک نیاز اساسی و زیربنای بسیاری از پژوهش‌ها در تمام شاخه‌های بیوتکنولوژی است. به نظر می‌رسد بین روش‌های عمومی و اختصاصی موجود برای افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب، بیان مشترک پروتئین مورد نظر با چپرون‌های مولکولی یک راه حل مناسب برای کمک به تا شدن صحیح پروتئین تازه سنتز شده و کاهش تجمعات پروتئینی باشد. با این حال اثربخشی چپرون‌های مختلف به طور گسترده‌ای متفاوت است. به منظور بررسی کارایی چپرون‌های ماهیان در افزایش حلالیت پروتئین‌های نوترکیب، در این مطالعه کلون‌سازی و بیان همزمان دو پروتئین Hsp70 مربوط به اردک‌ماهی (*Esox lucius*) (El-Hsp70) و گلوکاتایون S- ترانسفراز کلاس μ از ماهی سفید *Rutilus kutum* (Rk-GST μ) در میزبان *E. coli* انجام شد و به منظور بررسی برهم‌کنش دو پروتئین از آنالیز الکتروفورز یک بعدی و محاسبه فعالیت ویژه آنزیم Rk-GST μ استفاده شد. با توجه به این که حلالیت و فعالیت ویژه آنزیم Rk-GST μ در سلول‌های بیان کننده نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش یافت، این مطالعه یافته امیدوارکننده دیگری در مورد نقش مثبت چپرون‌ها در افزایش محتوای محلول پروتئین‌های نوترکیب فراهم کرده است.

واژگان کلیدی: گلوکاتایون S- ترانسفراز، چپرون، پروتئین نوترکیب، تجمعات پروتئینی، حلالیت پروتئین.

۱- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳- مربی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران.

۴- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

مقدمه

پروتئین‌های خالص، محلول و دارای فعالیت در بیوتکنولوژی مدرن تقاضای زیادی دارند. منابع پروتئینی طبیعی به ندرت کمیت، سهولت در جداسازی یا قیمت مناسب مورد نیاز را برآورده می‌کنند و از این رو فناوری پروتئین‌های نوترکیب اغلب روش انتخابی مناسبی است. باکتری *Escherichia coli* با توجه به مزایای بسیاری که دارد اولین و گسترده‌ترین میزبانی است که برای تولید پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود، زیرا بیان پروتئین مورد نظر را با سادگی نسبی خود، کشت ارزان و سریع با تراکم بالا، ژنتیک شناخته شده و تعداد زیاد ابزارهای مولکولی سازگار، آسان می‌کند. با وجود همه این ویژگی‌ها، تولید پروتئین نوترکیب در *E. coli* با چالش‌هایی نیز روبه‌رو است که این چالش‌ها در رابطه با عدم تولید پروتئین، شکل‌گیری تجمعات پروتئینی و غیرفعال بودن پروتئین‌های تولید شده است (Idalia and Bernardo, 2017). در واقع هدف اصلی از بیان پروتئین نوترکیب اغلب به دست آوردن درجه بالایی از محصول مورد نظر به شکل محلول در سلول باکتری است. این رویکرد همیشه توسط سیستم متابولیک میزبان پذیرفته نمی‌شود و در بعضی از شرایط با استرس سلولی مواجه می‌شود. پاسخ دیگری که در سیستم‌های نوترکیب مشاهده می‌شود، تجمع پروتئین‌های هدف به شکل نامحلول است که به عنوان تجمعات پروتئینی (Inclusion Bodies: IBs) شناخته می‌شوند. این اجتماعات به طور کلی از پروتئین‌هایی با تاخوردگی نادرست تشکیل شده‌اند و بنابراین از نظر زیستی غیرفعال هستند. در شرایط طبیعی سلولی، تعدادی از پروتئین‌های سیتوپلاسمی به صورت خودبه‌خودی قادر به تا خوردن صحیح هستند، در حالی که پروتئین‌های مستعد تجمع، نیاز به وجود تعدادی از چپرون‌های (Chaperone) مولکولی دارند که با زنجیره‌های پلی‌پپتیدی نوپا ارتباط متقابل برقرار کرده تا از تجمع آن‌ها در طی فرآیند تاخوردگی جلوگیری کنند (Lund, 2001). تجمع پروتئین‌های نوترکیبی که در سلول‌های باکتریایی بیان بیش از حد دارند، می‌تواند ناشی از تجمع غلظت بالای واسطه‌های تاشونده یا پردازش ناکارآمد توسط چپرون‌های مولکولی باشد. یکی از روش‌های موثر در افزایش حلالیت پروتئین‌های نوترکیب، استفاده از ژن‌های کدکننده چپرون‌های مولکولی به منظور جلوگیری از تخریب پروتئین و یا کمک به اصلاح تاخوردگی پروتئین است. در واقع

آنزیم‌های گلو تاتیون S- ترانسفراز (GSTs; EC 2.5.1.18) که در موجودات گوناگونی مانند میکروب‌ها، حشرات، گیاهان، ماهی‌ها، پرندگان و پستانداران کشف شده‌اند، دارای فعالیت‌های متنوعی هستند و در چندین نوع از واکنش‌ها نقش دارند. از آنجایی که این آنزیم‌ها، به واسطه کاتالیز واکنش اتصال تری‌پپتید گلو تاتیون به ترکیبات الکتروفیل درون‌زا و برون‌زا، موجب تسهیل فرآیند حذف این ترکیبات از طریق مسیر مرکاپتوریک اسید می‌شوند، یکی از آنزیم‌های کلیدی در فرآیندهای سم‌زدایی فاز II به شمار می‌روند (Townsend and Tew, 2003). همچنین این آنزیم‌ها عملکردهای غیرکاتالیتیکی دارند که با جداسازی ترکیبات سرطان‌زا، انتقال درون سلولی طیف وسیعی از لیگاندهای هیدروفوب و تعدیل مسیره‌های انتقال سیگنال مرتبط است (Rudneva et al., 2010). گلو تاتیون S- ترانسفرازها در سه کلاس مجزا تقسیم‌بندی می‌شوند که شامل کلاس‌های سیتوزولی (cGSTs)، میتوکندریایی و متصل به غشا (Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism: MAPEG) است (Jakobsson et al., 2008). گلو تاتیون S- ترانسفرازهای سیتوزولی بر اساس

چپرون‌ها به دلیل توانایی اتصال و پایدار کردن پلی‌پپتیدهای نوپا، از واکنش‌های غیرمولد مانند تجمع جلوگیری می‌کنند (Castineiras et al., 2018).

یک نوع مشخص و شناخته شده چپرون‌های مولکولی، پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat Shock Protein: Hsp) هستند که پروتئین‌هایی کاملاً محافظت شده، القا شونده با استرس و فراگیر هستند و هومئوستاز را در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها حفظ می‌کنند (Iwama et al., 1998). پروتئین‌های Hsp70 به خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی تعلق دارند و از آنجایی که از فرآیندهای متعددی مانند انتقال از عرض غشا، تنظیم عملکرد پروتئین‌های تنظیمی، مونتاژ و جداسازی کمپلکس‌های پروتئینی و تاخوردگی دوباره پروتئین‌هایی با تاخوردگی نادرست پشتیبانی می‌کنند (Ghazaei, 2017)، در این مطالعه نیز از Hsp70 اردک ماهی (*Esox lucius* El-) به منظور افزایش حلالیت آنزیم نو ترکیب گلو تاتیون S- ترانسفراز کلاس μ از ماهی سفید (*Rutilus kutum* Rk-GST μ) که یکی از مهم‌ترین گونه‌های قسمت جنوبی دریای خزر است، استفاده شد.

اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) می‌تواند باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در موجودات دریایی شوند. تولید بیش از حد ROS می‌تواند به مولکول‌های زیستی مهم مانند DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب برساند. برای مقابله با استرس اکسیداتیو، جانداران از چندین راهکار مختلف استفاده می‌کنند. این مکانیسم‌های دفاعی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون S- ترانسفراز تشکیل شده است. سوپراکسید دیسموتاز می‌تواند رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل سلولی (O_2^-) را به پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و اکسیژن مولکولی (O_2) تبدیل کند، در حالی که کاتالاز آن را به H_2O و O_2 تبدیل می‌کند. در بین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، GSTها با اتصال گلووتاتیون (GSH) به مراکز الکتروفیلی بسیاری از ترکیبات سمی درون‌زا یا برون‌زا، شامل مواد سرطان‌زای شیمیایی، محصولات استرس اکسیداتیو، حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و عوامل شیمی درمانی سرطان (Ozaslan et al., 2018) نقش اصلی را در سم‌زدایی سلول و محافظت از بافت‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند (Doyen et al., 2005; Hayes et al., 2005). در واقع بخشی از

شباهت توالی اسیدهای آمینه، انتخاب سوپسترا و واکنش متقابل ایمونولوژیک (Immunological Cross Reactivity) به سیزده کلاس تقسیم‌بندی می‌شوند: آلفا (α)، بتا (β)، دلتا (δ)، کاپا (κ)، سیگما (σ)، تتا (θ)، مو (μ)، امگا (Ω)، پی (π)، تاو (τ)، زتا (ζ)، فی (ϕ) و اپسیلون (ϵ) (Hayes et al., 2005). گلووتاتیون S- ترانسفرازهای سیتوزولی عموماً پروتئین‌های دimer متشکل از زیر واحدهای ۳۰-۲۳ کیلودالتونی هستند که می‌توانند به دو دمین اضافی تقسیم شوند، دمین انتهای N شامل جایگاه اتصال گلووتاتیون است و توپولوژی $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ دارد که از نیای شبه تیوردوکسین تکامل یافته است و دمین انتهای C که از یک بسته‌بندی مارپیچ آلفا تشکیل شده است (Rudiger et al., 1997).

در سال‌های اخیر دریای خزر در معرض عوامل تنش‌زای زیادی در منطقه قرار گرفته است که بار آلودگی بسیاری را بر این پهنه آبی تحمیل کرده‌اند. آلودگی هوا، صنایع نفت و گاز، شیلات و آبی‌پروری، کشاورزی، رواناب و بارش، تغییرات آب و هوا، پسماندهای خشکی و دریایی و گردشگری عواملی هستند که زیست‌بوم دریای خزر را تهدید می‌کنند. بسیاری از این منابع آلودگی از طریق افزایش غلظت گونه‌های فعال

سازگاری موجودات زنده با زندگی در محیط‌های آلوده، در اختیار داشتن مکانیسم‌های کارآمد سم‌زدایی است که انتظار می‌رود با چنین مکانیسم‌هایی بتوانند با این محیط آلوده کنار بیایند (Ojopagogo et al., 2015). از آنجایی که آنزیم‌های گلو تاتیون S- ترانسفراز موجود در ماهی‌ها تحت تاثیر برخی آلاینده‌ها مانند سموم دفع آفات، آلودگی فلزات سنگین و آلودگی‌های نفتی قرار می‌گیرند (Rudneva et al., 2010) و به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب در اندازه‌گیری تاثیر آلودگی بر موجودات آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Amado et al., 2006) در اختیار داشتن فرم محلول آنزیم GST ماهی سفید، یکی از گونه‌های مهم دریای خزر که دارای ارزش غذایی و اقتصادی است (Dadar et al., 2016)، می‌تواند پایه و اساس مطالعات جدید و گسترده‌ای را در زمینه آلودگی‌های دریای خزر و میزان تاثیر آن‌ها بر آبزیان این منطقه فراهم کند. علاوه بر این، برخی از انواع این آنزیم با غیرفعال‌سازی یا سم‌زدایی از مواد الکتروفیل سرطان‌زا از آغاز فرآیندهای سرطانی جلوگیری می‌کنند. در طی مراحل شروع و پیشرفت سرطان، فرم‌های خاصی از GST در سلول‌های آغاز کننده و پیش‌سرطانی و همچنین در جمعیت‌های سرطانی بیان می‌شود.

همچنین، اشکال بیان شده این آنزیم در سلول‌های سرطانی، در مکانیسم مقاومت آن‌ها در برابر داروهای ضدسرطان نقش دارد (Coles et al., 1990) و با توجه به این که GST- μ در انسان نقش اساسی در سرطان‌های ریه و مثانه دارد (Tsuchida and Sato, 1992)، این کلاس از آنزیم برای ادامه مطالعات انتخاب شد. از آن جایی که ماهیان دارای درجه بالایی از همسانی در توالی و عملکرد با پستانداران از جمله انسان، هستند و تا به امروز بیشتر پروتئین‌های مورد مطالعه عملکرد مشابهی در ماهی و پستانداران نشان داده‌اند (Sakamaki and Satou, 2009). مطالعه و پژوهش روی ماهیان می‌تواند بینش خوبی در مورد فرآیندهای بیماری و مطالعات دارویی در انسان داشته باشد. بنابراین شناسایی، کلون‌سازی و بیان آنزیم Rk-GST μ توسط تیم تحقیقاتی Ahmadi و همکاران (۲۰۲۰) انجام گرفت. اما به دلیل تمایل زیاد این آنزیم به تجمع، مقدار زیادی از پروتئین به دست آمده به فرم نامحلول بود. به منظور یافتن راه حل مناسب برای این مسئله چالش برانگیز و بررسی میزان تاثیر چپرون‌ها در افزایش حلالیت پروتئین‌های نو ترکیب، از کلون‌سازی Rk-GST μ و E. coli با استفاده از یک وکتور در

(IPTG) از بایوبازیک (انگلستان) و کیت‌های استخراج از ژل و پلاسمید از شرکت کایژن تهیه شدند. وکتور بیانی pETDuet-1 از شرکت نوآژن تهیه شد.

کلونینگ ژن‌های El-Hsp70 و Rk-GST μ

برای ساختن سازه نو ترکیب بیان کننده ژن‌های El-Hsp70 و Rk-GST μ ، از پلاسمید pET28a حاوی ژن Rk-GST μ که در مرحله قبل از آزمایش آماده شده بود (Ahmadi et al., 2020) و با بهره‌گیری از آغازگرهایی که محل برش آنزیم‌های محدود الاثر Sall-NotI در آنان طراحی شده بود (کد شناسایی ژن Rk-GST μ در بانک جهانی ژن KY211992.1 است) توالی کامل نواحی کد کننده ژن Rk-GST μ توسط روش PCR جداسازی و تکثیر شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است. شرایط دمایی و تعداد چرخه‌ها شامل سه مرحله و به این شرح بود: مرحله اول واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و یک چرخه، مرحله دوم که ۳۲ چرخه بود شامل سه بخش دمایی واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال ۶۰-۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت

استفاده شد. در واقع به دلیل شباهت ساختار ژنتیکی انسان و ماهیان استخوانی (Teleost Fish) (Postlethwait et al., 2004) از جمله اردک ماهی، استفاده از آن‌ها در مطالعات بیماری‌های انسانی و مطالعات دارویی گسترش یافته است. در مطالعه حاضر با بیان همزمان این دو پروتئین و سنجش فعالیت ویژه آنزیم Rk-GST μ در حضور و عدم حضور El-Hsp70 تاثیر چپرون El-Hsp70 در جهت افزایش فرم محلول پروتئین هدف بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی، پلاسمیدها و سازه‌ها

تریس، گلیسین، ایمیدازول، آگارز، سوی پپتون، عصاره مخمر، سدیم دودسیل سولفات، NaCl و سایر نمک‌های مورد استفاده از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. DNA سایز مارکر از شرکت سیگما-آلد ریچ (آمریکا) و مارکر وزن مولکولی پروتئین، رنگ کوماسی برلیانت بلو G250، لیزوزیم، آنزیم‌های محدود الاثر، DNase، آنزیم‌های Taq DNA Polymerase و T4-DNA ligase از شرکت ترمو فیشر (انگلستان) تهیه شدند. آمپی‌سیلین و آیزوپروپیل بتا-دی-۱-تیو گالاکتو پیرانوزید

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

آغازگر	ژن
F: 5'- TTATATGTCGACATGGCAATGAAATTGGCATATTGGGATATACGC -3' R: 5'-TTATATGCGGCCGCTCACTCCTTCTTGTTCCTCCCATTTGGCCATCT -3'	Rk-GST μ
F: 5'-TTATATGGTACCATGTCAGCTACGGGCCTG -3' R: 5'-TTATATCTCGAGCTACCGGTGGCATCCCTC -3'	El-Hsp70

پلاسمید نو ترکیب pETDuet-1-GST-Hsp ساخته شد. سازه جدید نو ترکیب به سلول‌های مستعد *E. coli* BL21 منتقل شد و برای تایید کلونینگ PCR اختصاصی و به دنبال آن آنالیز محصولات PCR، توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت.

بیان و تخلیص پروتئین Rk-GST μ

برای تهیه کشت اولیه، از تک کلنی ترانسفورماتور استفاده شد و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یک شب انکوبه شد. کشت اولیه با رقت ۱: ۱۰۰ به محیط LB حاوی آمپی‌سیلین منتقل و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس القا با ۰/۵ میلی‌مولار IPTG صورت گرفت و به مدت ۲۰ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به منظور تخریب سلول‌های باکتری، از بافر لیز کننده حاوی

۳۰ ثانیه و توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. مرحله سوم (Total Extension) به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. طول قطعه ژنی تولید شده ۶۲۵ جفت باز بود. همچنین به منظور تکثیر نواحی کد کننده ژن El-Hsp70، از پلاسمید pET28a حاوی ژن El-Hsp70 استفاده شد و از آغازگرهایی که محل برش آنزیم‌های محدود الاثر KpnI-XhoI در آنان طراحی شده بود استفاده شد که توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است. شرایط دمایی مشابه با ژن Rk-GST μ و طول قطعه تولید شده ۲۳۸۳ جفت باز بود. سپس ژن Rk-GST μ با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر SalI و NotI به جایگاه کلونینگ چندگانه ۱ (MCS1) و کتور بیانی pETDuet-1 وارد شد و ژن El-Hsp70 تحت اثر آنزیم‌های XhoI و KpnI، در جایگاه کلونینگ چندگانه ۲ (MCS2) pETDuet-1-GST قرار گرفت. در نتیجه

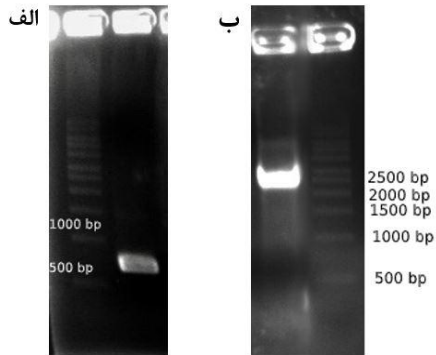
هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۱۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۳۰۰ میلی‌مولار با pH ۸) برای جمع‌آوری μ -GSK-Rk خالص اضافه شد و بخش‌های شستشو توسط SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

سنجش فعالیت و فعالیت ویژه آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز

برای سنجش فعالیت آنزیم μ -GSK-Rk، از ۱-کلرو-۲،۴-دی‌نیترو بنزن (CDNB) و گلوتاتیون (GSH) به عنوان سوبسترا استفاده شد و جذب محصول واکنش (S) - (۲،۴-دی‌نیترو فنیل) گلوتاتیون) در ۳۴۰ نانومتر طی ۳ دقیقه ثبت شد. یک واحد فعالیت آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز با اتصال ۱ میکرومول CDNB به GSH در هر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعریف می‌شود. ۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش حاوی محلول نمک فسفات با خاصیت بافری (Phosphate-Buffered Saline: PBS) ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۷/۵، گلوتاتیون ۱۰۰ میلی‌مولار، CDNB ۱۰۰ میلی‌مولار و مقدار مناسبی از آنزیم گلوتاتیون S- ترانسفراز بود (Kalita et al., 2019). تغییرات جذب با دستگاه طیف‌سنج (UV/Vis، Biochrom، انگلستان) در دمای ۲۵ درجه

۳۰۰ NaCl، ۵۰ میلی‌مولار، NaH_2PO_4 میلی‌مولار، ایمیدازول (Imidazole) ۱۰ میلی‌مولار همراه با ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر لیزوزیم با pH ۸/۰ استفاده شد. سپس همگن‌سازی (Sonication) در حمام آب یخ و به دنبال آن تیمار با DNase، به منظور از بین بردن ویسکوزیته سوسپانسیون، انجام گرفت. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) شد، سوپرناتانت به دست آمده برای مطالعات بیشتر ذخیره شد و به پلت بافر شستشو حاوی اوره ۸ مولار اضافه و در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پروتئین‌های محلول و نامحلول از طریق SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. علاوه بر این، ژن μ -GSK-Rk نیز به تنهایی و به طور جداگانه با شرایط مشابه انتقال، بیان و آنالیز شد. فرآیند خالص‌سازی با استفاده از ستون Ni-NTA His-Bind Resin انجام گرفت. پس از بارگذاری سوپرناتانت آنزیمی، ستون توسط بافر شستشو ۱ (Washing Buffer، تریس هیدروکلراید ۲۰ میلی‌مولار، سدیم کلراید ۱۵۰ میلی‌مولار، ایمیدازول ۱۰۰ میلی‌مولار با pH ۸) شسته شد و سپس بافر شستشو ۲ (Elution Buffer، تریس

نامحلول توسط SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.



شکل ۱: نتایج Colony PCR سلول‌های باکتری کوترنسفرم شده با استفاده از الف) آغازگرهای pET Upstream و DuetDOWN1 برای جایگاه MCS1 در ناقل pETDuet-1 که حاوی ژن Rk-GSTμ با ۶۲۵ جفت باز است و ب) آغازگرهای DuetUP2 و T7 Terminator برای جایگاه MCS2 در ناقل pETDuet-1-GST که حاوی ژن El-Hsp70 با ۲۳۸۳ جفت باز است.

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، آنالیز کمی باندهای مربوط به Rk-GSTμ در حضور و عدم حضور El-Hsp70 توسط نرم‌افزار ImageJ، به خوبی نشان می‌دهد که بیان همزمان El-Hsp70 و Rk-GSTμ منجر به افزایش سطح محلول Rk-GSTμ شد. علاوه بر این، پس از تخلیص آنزیم Rk-GSTμ توسط ستون Ni-NTA His-Bind resin

سانتی‌گراد ثبت شد. همچنین به منظور تعیین فعالیت ویژه آنزیم Rk-GSTμ از روش برادفورد (Bradford Protein Assay) برای ارزیابی غلظت پروتئین محلول استفاده شد (Harlow and Lane, 2006).

الکتروفورز پروتئین با تکنیک SDS-PAGE

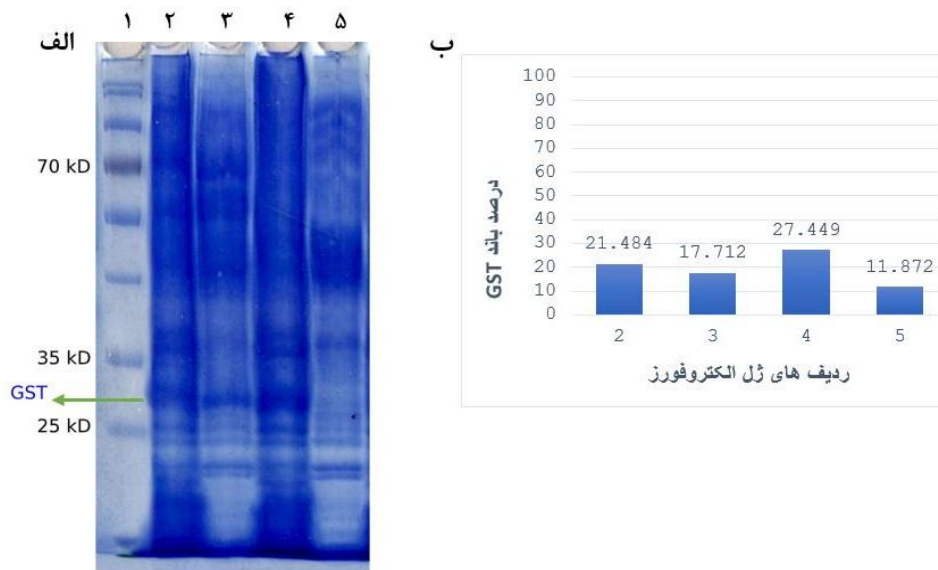
الکتروفورز پروتئین‌های به دست آمده به صورت SDS-PAGE و مطابق با روش Laemmli، در ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام گرفت و از کوماسی برلیانت بلو G250 برای تشخیص نوارهای پروتئینی استفاده شد (Gallagher, 2006).

نتایج

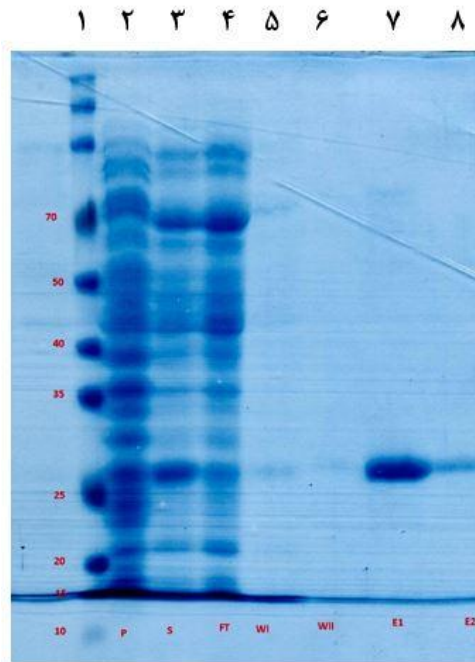
ناقل pETDuet-1 دارای دو جایگاه کلونینگ چندگانه (MCS) با پروموتورهای جداگانه و یک محل اتصال ریبوزوم است. ژن‌های Rk-GSTμ و El-Hsp70 به ترتیب در MCS1 و MCS2 قرار گرفتند و صحت کلونینگ با PCR تایید شد (شکل ۱).

برای دستیابی به سطوح بالایی از پروتئین محلول Rk-GSTμ، بیان در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت انجام گرفت و پس از تخریب سلول‌ها، پروتئین‌های محلول و

(شکل ۳)، فعالیت ویژه آن محاسبه شد که در حضور El-Hsp70 مشهود بود (جدول ۲). مقایسه با نمونه شاهد، افزایش فعالیت ویژه در



شکل ۲: نتایج SDS-PAGE مربوط به بیان مشترک μ Rk-GST و El-Hsp70 در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۰ ساعت. الف) باند مربوط به آنزیم μ Rk-GST در حدود ۲۵ کیلوالتون و باند مربوط به آنزیم El-Hsp70 در حدود ۷۰ کیلوالتون مشخص است. ردیف ۱: مارکر وزن مولکولی، ردیف ۲: رسوب مربوط به سلول های تولید کننده μ Rk-GST + El-Hsp70، ردیف ۳: سوپرناتانت مربوط به سلول های تولید کننده μ Rk-GST + El-Hsp70، ردیف ۴: رسوب مربوط به سلول های تولید کننده μ Rk-GST و ردیف ۵: سوپرناتانت مربوط به سلول های تولید کننده μ Rk-GST. ب) آنالیز کمی بیان آنزیم μ Rk-GST توسط نرم افزار ImageJ. مقایسه درصد باندهای مربوط به ردیف ۳ و ۵، به خوبی افزایش سطح محلول آنزیم μ Rk-GST را در بیان همراه با El-Hsp70 نمایش می دهد.



شکل ۳: مراحل مختلف تخلیص آنزیم μ Rk-GST. باند مربوط به آنزیم μ Rk-GST در حدود ۲۵ کیلو دالتون و باند مربوط به آنزیم μ El-Hsp70 در حدود ۷۰ کیلو دالتون مشخص است. از چپ به راست: شماره ۱: مارکر وزن مولکولی، ۲: رسوب مربوط به سول‌های تولید کننده μ Rk-GST + μ El-Hsp70، ۳: سوپرناتانت مربوط به سلول‌های تولید کننده μ Rk-GST + μ El-Hsp70، ۴: فلو ترو (Flow Through)، ۵ و ۶: فراکشن‌های به دست آمده از شستشو با بافر حاوی ۱۰۰ میلی مولار ایمیدازول (Washing Buffer)، ۷ و ۸: فراکشن‌های به دست آمده از شستشو با بافر حاوی ۳۰۰ میلی مولار ایمیدازول (Elution Buffer).

جدول ۲: فعالیت ویژه آنزیم μ Rk-GST در حضور و عدم حضور چپرون μ El-Hsp70

فعالیت ویژه ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	نمونه
۲۰/۱۶	سلول‌های تولید کننده μ Rk-GST + μ El-Hsp70
۲/۲۵	سلول‌های تولید کننده μ Rk-GST
۸/۹۶	نسبت

بحث

al., 2002). در این مطالعه نیز، El-Hsp70 به عنوان چپرون مولکولی برای بهبود حلالیت پروتئین نوترکیب Rk-GST μ استفاده شد. روش‌های مختلفی برای بیان مشترک دو ژن در *E. coli* مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش اول، استفاده از ناقل‌های متعدد با نشانگرهای مقاومت مختلف است که هر ناقل یک ژن جداگانه را حمل می‌کند، این روش ممکن است منجر به رقابت پلاسمیدها با محل آغاز همانندسازی (Ori) مشابه شود و ارزش پلاسمیدها را برای میزبان باکتریایی کاهش دهد. در روش دوم، کلونینگ ژن‌ها در یک ناقل با یک پروموتور واحد و محل اتصال ریبوزوم مجزا برای هر ژن انجام می‌شود که در نهایت منجر به ایجاد یک mRNA پلی‌سیسترونیک طولانی می‌شود. سومین روش استفاده از یک ناقل واحد با چندین واحد رونویسی است (Romier et al., 2006) که به دلیل کارایی بیشتر این روش نسبت به دو روش دیگر (Kim et al., 2004) در مطالعه حاضر از همین روش برای بیان مشترک Rk-GST μ با El-Hsp70 در سلول‌های *E. coli* استفاده شد که افزایش محتوای محلول Rk-GST μ در نتیجه بیان همزمان با El-Hsp70، پشتوانه روشی برای صحت این روش است. این مطالعه به خوبی،

از آنجایی که پروتئین‌های نوترکیب کاربردهای گسترده‌ای در صنایع بیوتکنولوژی و دارویی دارند، علاقه به زمینه تولید پروتئین نوترکیب در طی چند سال گذشته به طور چشمگیری در حال رشد است. در این راستا، اگرچه برخی از این پروتئین‌ها به راحتی تولید و خالص‌سازی می‌شوند، اما فرآیند تولید بسیاری از آن‌ها با مشکلات متعددی همراه است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها عدم بیان کافی پروتئین مورد نظر به فرم محلول است (Esposito and Chatterjee, 2006). عوامل خارجی و ذاتی متعددی در حلالیت پروتئین‌های نوترکیب دخیل هستند مانند قدرت یونی، دما، pH، وزن مولکولی، ترکیب اسیدهای آمینه، آبگریزی، نقطه ایزوالکتریک، ساختار و قطبیت باقی مانده‌های سطحی (Bhandari et al., 2020) و بر همین اساس رویکردهای متنوعی برای بهبود حلالیت پروتئین‌های بیان شده پیشنهاد شده است (Hoffmann et al., 2004; Rinas et al., 2007; Singh et al., 2015; Upadhyay et al., 2016). در این میان بیان همزمان پروتئین مورد نظر با چپرون‌های مولکولی در یک میزبان روش موثری برای افزایش حلالیت پروتئین نوترکیب به شمار می‌آید (Ikura et

مطالعات قبلی را که در آن بیان مشترک با چپرون‌های مولکولی تاثیر قابل توجهی در افزایش حلالیت پروتئین مورد نظر داشت، تایید می‌کند (Peng et al., 2016). در شرایط تنش، مانند استرس گرمایی یا اکسیداتیو، یا تحت شرایط بیان بیش از حد پروتئین، ماشین‌های تاخوردگی پروتئین اشباع می‌شوند و این باعث تاخوردگی نادرست پروتئین‌ها و در نتیجه تجمع آن‌ها می‌شود. دلایل دیگر تجمع می‌تواند جهش در توالی ساختار اولیه پروتئین به دلیل جهش RNA/DNA، اشتباهات طی فرآیند ترجمه یا غلظت بالای پروتئین در حال ساخت باشد (Kopito, 2000). بنابراین، فرآیند تجمع پروتئین‌ها یک پدیده رایج است که در طول تولید پروتئین نو ترکیب مشاهده می‌شود. این تجمعات پروتئینی عموماً به تعداد کمتری در سیتوپلاسم یا پری پلاسم سلول وجود دارند که توسط طیف گسترده‌ای از ساختارهای مختلف پروتئینی، از جمله پلی‌پپتیدهایی که تا حدی دچار تاخوردگی شده‌اند و همچنین پروتئین‌هایی که به فرم اصلی خود رسیده‌اند، تشکیل می‌شوند (Speed et al., 1996). به طور خاص، عوامل مختلفی که در تشکیل تجمعات پروتئینی تاثیر می‌گذارند عبارت هستند از غلظت بالای پروتئین نوپا، وجود یک محیط کاهنده در سیتوپلاسم، عدم تغییرات پس از ترجمه و پیوندهای دی‌سولفیدی نامناسب (Garcia-Fruitos et al., 2011). واسطه‌هایی که تا حدی دچار تاخوردگی شده‌اند، به عنوان پیش‌سازهای اصلی تجمع پروتئین‌ها شناخته می‌شوند، زیرا دناتوره شدن جزئی آن‌ها و یا عدم وجود کوفاکتورهای اساسی برای تاخوردگی آن‌ها در سیتوپلاسم موجب واکنش‌های نامناسب آن‌ها و تشکیل IBS می‌شود. در شرایط سلولی طبیعی، چپرون‌های مولکولی با زنجیره‌های پلی‌پپتیدی نوپا ارتباط متقابل برقرار می‌کنند تا از تجمع در طی فرآیند تا شدن جلوگیری کنند. بعضی از چپرون‌ها از تجمع پلی‌پپتیدها جلوگیری می‌کنند، در حالی که چپرون‌های دیگر به تاخوردگی مجدد و حل شدن پروتئین‌های غلط تاخوردگی کمک می‌کنند. پروتئین‌های Hsp70، یک خانواده پروتئین بسیار محافظت شده است که به طور فراگیر در همه پروکاریوت‌ها و در اندامک‌های سلولی موجودات یوکاریوتی وجود دارند (Evans et al., 2010). تجزیه و تحلیل چگونگی اتصال Hsp70 با استفاده از رویکردهای مختلف نشان داده است که این چپرون‌ها توالی‌های غنی از اسیدهای آمینه آبگریز را تشخیص می‌دهند و به روشی وابسته به ATP به آن‌ها متصل می‌شوند

نتایج به دست آمده در این مطالعه شواهدی را در مورد نقش محسوس چپرون‌های مولکولی در ارتقای حلالیت پروتئین‌های نوترکیب ارائه می‌دهد و پژوهش‌های آینده را در این راستا تضمین می‌کند. علاوه بر این، استفاده از ژن‌های کد کننده چپرون‌های مولکولی جدید، به عنوان یک شریک بیان مشترک، می‌تواند زمینه مهمی را برای مطالعات آینده فراهم کند.

تشکر و قدردانی

انجام بخشی از این پژوهش با حمایت پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر صورت گرفت که شایسته قدردانی و سپاس است (شماره گرنت ۹۴۱۱۱۳۱۰۱۰۱).

(Rudiger et al., 1997). به دلیل ماهیت آبگریز بودن، این موتیف‌های اتصالی به طور معمول در داخل یک پروتئین به درستی تاخوردگی قرار می‌گیرند. در نتیجه، قرار گرفتن چنین توالی‌های آبگریزی در سطح، ممکن است یک ویژگی متمایز از ترکیبات تاخوردگی باشد. چنین مناطق آبگریزی احتمالاً در همه پلی‌پپتیدهای بدون تاخوردگی وجود دارند. ارتباط با Hsp70 منجر به تثبیت پروتئین شده و در نتیجه از تجمع آن جلوگیری می‌شود (Ghazaei, 2017).

طبق یافته‌های این مطالعه، بیان همزمان Rk-GST μ با چپرون El-Hsp70 از تاخوردگی نادرست Rk-GST μ جلوگیری می‌کند و منجر به افزایش حلالیت و فعالیت ویژه آن می‌شود.

منابع

- Ahmadi S., Ghafouri H., Tarazi S., Sarikhan S. and Saberi K.O. 2020.** Cloning, purification and biochemical characterization of two glutathione S-transferase isoforms from *Rutilus frisii kutum*. Protein Expression and Purification, 179: 1–9 (105800).
- Amado L.L., Rosa C.E. Da Leite A. M., Moraes L., Pires W.V., Pinho G.L.L., Martins C.M.G., Robaldo R.B., Nery L.E.M., Monserrat J.M., Bianchini A., Martinez P.E. and Geracitano L.A. 2006.** Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. Marine Pollution Bulletin, 52(2): 199–206.
- Bhandari B.K., Gardner P.P. and Lim C.S. 2020.** Solubility-weighted index: Fast and accurate prediction of protein solubility. Bioinformatics, 36(18): 4691–4698.
- Castineiras T.S., Williams S.G., Hitchcock A.G. and Smith D.C. 2018.** *E. coli* strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. FEMS Microbiology Letters, 365(15): 1–10.
- Coles B., Ketterer B. and Hinson J.A. 1990.** The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 25(1): 47–70.
- Dadar M., Adel M., Saravi H. N. and Dadar M. 2016.** A comparative study of trace metals in male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) from the southern basin of Caspian Sea. Environmental Science and Pollution Research, 23(24): 24540–24546.
- Doyen P., Vasseur P. and Rodius F. 2005.** cDNA cloning and expression pattern of pi-class glutathione S-transferase in the freshwater bivalves *Unio tumidus* and *Corbicula fluminea*. Comparative Biochemistry and Physiology (C), 140(3-4): 300–308.
- Esposito D. and Chatterjee D.K. 2006.** Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. Current Opinion in Biotechnology, 17(4): 353–358.
- Evans C.G., Chang L. and Gestwicki J.E. 2010.** Heat shock protein 70 (Hsp70) as an emerging drug target. Journal of Medicinal Chemistry, 53(12): 4585–4602.
- Gallagher S.R. 2006.** One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. Current

- Protocols in Molecular Biology, 75(1): 1–38 (10.2A).
- Garcia-Fruitos E., Sabate R., De Groot N.S., Villaverde A., and Ventura S. 2011.** Biological role of bacterial inclusion bodies: A model for amyloid aggregation. *FEBS Journal*, 278(14): 2419–2427.
- Ghazaei C. 2017.** Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 66(3): 259–265.
- Harlow E. and Lane D. 2006.** Bradford assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6: 4644.
- Hayes J.D., Flanagan J.U. and Jowsey I.R. 2005.** Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 51–88.
- Hoffmann F., Van Den Heuvel J., Zidek N. and Rinas U. 2004.** Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3–4): 235–241.
- Idalia V.M.N. and Bernardo F. 2017.** *Escherichia coli* as a model organism and its application in biotechnology. P: 253–274. In: Samie A. (Ed.). *Escherichia coli*-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. IntechOpen, England.
- Ikura K., Kokubu T., Natsuka S., Ichikawa A., Adachi M., Nishihara K., Yanagi H. and Utsumi S. 2002.** Co-overexpression of folding modulators improves the solubility of the recombinant guinea pig liver transglutaminase expressed in *Escherichia coli*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 32(2): 189–205.
- Iwama G.K., Thomas P.T., Forsyth R.B. and Vijayan M.M. 1998.** Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1): 35–56.
- Jakobsson P.J., Morgenstern R., Mancini J., Ford-Hutchinson A. and Persson B. 2008.** Common structural features of mapeg-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, 8(3): 689–692.
- Kalita J., Shukla R. and Tripathi T. 2019.** Structural basis of urea-induced unfolding of *Fasciola gigantica* glutathione S-transferase. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4): 4491–4503.
- Kim K.J., Kim H.E., Lee K.H., Han W., Yi M.J., Jeong J. and Oh B.H. 2004.** Two-promoter vector is highly efficient for overproduction

- of protein complexes. *Protein Science*, 13(6): 1698–1703.
- Kopito R.R. 2000.** Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, 10(12): 524–530.
- Lund P.A. 2001.** Microbial molecular chaperones. *Advances in Microbial Physiology*, 44: 93–140.
- Ojopagogo Y.A., Adewale I.O., Adeyemi J.A. and Afolayan A. 2015.** Some novel features of glutathione transferase from juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to lindane-contaminated water. *Perspectives in Science*, 4: 62–65.
- Ozaslan M. S., Demir Y., Aksoy M., Kufrevioglu O. I. and Beydemir S. 2018.** Inhibition effects of pesticides on glutathione-S-transferase enzyme activity of Van Lake fish liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(9): 1–5 (e22196).
- Peng S., Chu Z., Lu J., Li D., Wang Y., Yang S. and Zhang Y. 2016.** Co-expression of chaperones from *P. furiosus* enhanced the soluble expression of the recombinant hyperthermophilic α -amylase in *E. coli*. *Cell Stress and Chaperones*, 21(3): 477–484.
- Postlethwait J., Amores A., Cresko W., Singer A. and Yan Y.L. 2004.** Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends in Genetics*, 20(10): 481–490.
- Rinas U., Hoffmann F., Betiku E., Estape D. and Marten S. 2007.** Inclusion body anatomy and functioning of chaperone-mediated in vivo inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 127(2), 244–257.
- Romier C., Ben Jelloul M., Albeck S., Buchwald G., Busso D., Celie P.H.N., Christodoulou E., De Marco V., Van Gerwen S., Knipscheer P., Lebbink J.H., Notenboom V., Poterszman A., Rochel N., Cohen S.X., Unger T., Sussman J.L., Moras D., Sixma T.K. and Perrakis A. 2006.** Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: Experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallographica Section (D)*, 62(10): 1232–1242.
- Rudiger S., Buchberger A. and Bukau B. 1997.** Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nature Structural Biology*, 4(5): 342–349.
- Rudneva I.I., Kuzminova N.S. and Skuratovskaya E.N. 2010.** Glutathione-S-transferase activity in tissues of Black Sea fish species. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(1): 141–150.

- Sakamaki K. and Satou Y. 2009.** Caspases: Evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *Journal of Fish Biology*, 74(4): 727–753.
- Singh A., Upadhyay V., Upadhyay A.K., Singh S.M. and Panda A.K. 2015.** Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1): 1–10.
- Speed M.A., Wang D.I.C. and King J. 1996.** Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: The molecular basis of inclusion body composition. *Nature Biotechnology*, 14(10): 1283–1287.
- Townsend D.M. and Tew K.D. 2003.** The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47): 7369–7375.
- Tsuchida S. and Sato K. 1992.** Glutathione transferases and cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 27(4–5): 337–384.
- Upadhyay V., Singh A., Jha D., Singh A. and Panda A.K. 2016.** Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microbial Cell Factories*, 15(1): 1–13.



Research Paper

Increasing the solubility of recombinant Glutathione S-transferase from *Rutilus kutum* using chaperone-based method in *Escherichia coli*

Sara Tarazi¹, Hossein Ghafouri^{2*}, Sajjad Sarikhan³, Reyhaneh Sariri⁴

Received: January 2021

Accepted: June 2021

Abstract

Attainment of soluble recombinant protein in high quantity is a critical demand in all types of biotechnology. Between the available general and protein-specific techniques used for enhancing the protein solubility, the co-expression of desired protein with molecular chaperones seems to be a proper solution to assist the folding of newly synthesized protein and reduce the inclusion bodies formation, however the effectiveness of different chaperones varies widely. In order to evaluate the efficiency of fish chaperones in increasing the solubility of recombinant proteins, cloning and simultaneous expression of *Esox lucius* Hsp70 (El-Hsp70) and the μ -class glutathione S-transferase from *Rutilus kutum* (Rk-GST μ) was performed on *E. coli* host. In order to investigate the protein-protein interaction, the SDS-PAGE electrophoresis and measuring the specific activity of Rk-GST μ was applied. Since the solubility and specific activity of Rk-GST μ were increased in co-expressing cells, this work has provided another promising finding on the positive role of chaperones in enhancing the soluble content of expressed recombinant proteins.

Key words: *Glutathione S-transferase, Chaperone, Recombinant Protein, Inclusion Body, Protein Solubility.*

1- Ph.D. Student in Biochemistry, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3-Scientific Member in Iranian Biological Resource Center, Tehran, Iran.

4- Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: h.ghafoori@guilan.ac.ir

