

محمد کریمیان^۱، مهران میراولیایی^{۱*}، کامران قانلی^۱، علی اکبر احسانپور^۲، زهره زهرایی^۲

۱. بخش علوم سلولی ملکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران ۲. بخش علوم گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران ۳. استادیار، بخش بیوتکنولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه کاشان، کاشان، ایران

چکیده/ پروتئین های ناقل لیپید (LTPs) گروهی از پروتئین ها با وزن ملکولی متوسط در نزد گیاهان هستند که دارای پتانسیل های کاربردی به ویژه در سیستم های رها سازی دارو می باشند. هدف از این تحقیق کلون کردن و بیان ناحیه کدکننده ژن LTP₂ برنج در *E. coli* (TOP10) بود. از آنجائیکه ژن LTP₂ برنج فاقد اینترون می باشد، ژنوم برنج جهت تکثیر ناحیه کدکننده این ژن استفاده شد. در انتهای ۵' پرایمر رفت جایگاه برش آنزیم BamHI و در انتهای ۳' پرایمر برگشت جایگاه برش آنزیم XhoI قرار داده شد. قطعه تکثیر شده پس از تیمار با آنزیم های محدود کننده مذکور در جایگاه BamHI-XhoI وکتور pGEX-6p-2 و در پائین دست ژن GST جهت تولید پروتئین همجوش GST-LTP قرار گرفت. در مرحله بعدی وکتور نوترکیب به داخل باکتری *E. coli* (TOP10) ترانسفورم شد. برای اطمینان از صحت عملیات کلونینگ، پلاسمیدهای استخراج شده، در ناحیه LTP₂ توالی یابی شدند. داده ها نشان داد که توالی قطعه کلون شده مشابه توالی گزارش شده در NCBI است. همچنین یافته ها نشان داد که موادی مثل بتائین، دی متیل سولفوکسید (DMSO) و آمونیوم سولفات (AMS) می توانند باعث افزایش محصولات اختصاصی PCR شوند. آنالیز SDS-PAGE هم بیان LTP₂ در باکتری را تأیید نمود.

واژگان کلیدی: پروتئین ناقل لیپید؛ همسازیه سازی ژن؛ PCR؛ پروتئین همجوش؛ برنج ایرانی.

اختصاصی نیست به آن nsLTP هم میگویند (۵). اعمال فیزیولوژیکی فراوانی از قبیل ساخت کوتین، دخالت در جنین زایی، واکنش دفاعی در مقابل پاتوژن های گیاهی و سازگاری گیاهی به LTP نسبت داده شده است (۶-۹). LTP های زیادی از گیاهان مختلف جدا شده که ساختمان سه بعدیشان توسط تکنیک های X-ray و اسپکتروسکوپی NMR تشخیص داده شده است. مهم ترین خصوصیت LTP ها حضور یک حفره ی هیدروفوب در مرکز ملکول میباشد، که محل اتصال ملکول های آبرگیز و اسیدهای چرب است (۱۰-۱۲). LTP های گیاهی توسط یک خانواده کوچک ژنی کد میشوند. در ژن LTP₂ مربوط به گیاه برنج هیچگونه اینترونی یافت نمیشود (۱۳-۱۵). از آنجائیکه LTP ها، نسبت به افزایش دما و هضم آنزیمی مقاوم هستند، می توانند به راحتی

مقدمه | پروتئین های ناقل لیپید (LTPs) پپتیدهای غنی امرا سیستمی هستند که عمل انتقال ملکول های هیدروفوب را در شرایط *in vitro* انجام می دهند (۱ و ۲). LTP ها بر اساس وزن ملکولی شان به دو زیرگروه LTP₁ و LTP₂ تقسیم میشوند (۳ و ۴). همه انواع LTP دارای ۴ باند دی سولفیدی میباشد. از آنجائیکه عملکرد این پروتئین چندان

* مهران میراولیایی، PhD

استادیار بیوشیمی، بخش زیست شناسی علوم سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، میدان آزادی، خیابان هزار جریب، اصفهان، ایران
 پست الکترونیک: mmiroliaie@gmail.com
 تاریخ دریافت: ۹۱/۰۲/۲۰ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۵/۱۵

۰/۳ μl از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (stock: ۱۰۰ pM)، ۲/۲۵ μl (۵M) μl Betaine ۴/۵، (stock: ۵۰ mM) ۲ μl MgCl₂، ۲/۲۵ μl Ammonium dimethyl sulfoxide (DMSO) (۱۰٪ V/V)، Buffer (AMS) sulfate و ۲/۵ μl از ژنوم برنج (stock: ۶۰۰ ng/μl) به عنوان الگوی سنتز انجام شد. (همه مواد PCR از شرکت Fermentas خریداری شدند). واکنش PCR توسط دستگاه Astec و با شرایط: دمای واسرشت^۱ اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه همراه با ۳۰ سیکل تکراری با دمای واسرشت ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۶۰°C^۲ به مدت ۲ دقیقه و دمای بسط^۳ ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. محصول PCR رسوب داده و در ۱۰۰ μl آب مقطر استریل حل شد.

کلون کردن ناحیه کدکننده ژن LTP2 برنج:

قطعه تکثیر شده، شامل ناحیه کدکننده ژن LTP2 و وکتور چسبنده^۴ توسط آنزیمهای BamHI (TakaRa) و XhoI (TaKaRa) و طبق پروتکل مربوطه تیمار شدند. در هر مرحله نمونه‌ها بوسیله الکتروفورمز بررسی شدند. در نهایت قطعه تکثیر شده به داخل جایگاه BamHI-XhoI وکتور وارد شد و عملیات الحاق^۵ بوسیله کیت الحاق (TaKaRa) انجام شد. تکثیر پلاسمید نو ترکیب به وسیله انتقال وکتور به داخل سلول‌های E.coli one shot Top10 انجام شد. در روز بعد کلونی‌های ایجاد شده بوسیله Colony PCR و با پرایمرهای اختصاصی وکتور بررسی شدند. توالی پرایمر رفت: ۵'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGTG-۳' و توالی پرایمر برگشت: ۵'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-۳' بود. یکی از کلونی‌های مثبت برداشته شد و به مدت یک شبانه روز کشت داده شد و سپس استخراج پلاسمید با استفاده از Miniprep DNA Purification Kit (TaKaRa) انجام شد. سپس پلاسمید نو ترکیب جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوری (تهران) ارسال شد.

آنالیز بیان LTP2 در عصاره سلول‌های E.coli:

سلول‌های E.coli ترانسفورم شده در ۵۰ ml محیط LB کشت داده شدند. هنگامی که O.D محیط کشت به ۰/۶ رسید بیان LTP2 بوسیله افزودن IPTG (Fermentas) (با غلظت نهایی ۱ mM) تحریک شد و سلول‌ها به مدت ۵ ساعت در شرایط رشد باقی ماندند. رسوب باکتری

وارد سیستم هومورال بدن شده و دستگاه ایمنی را تحریک نمایند. بنابراین LTP2 به عنوان یک آلرژن غذایی شناخته میشود (۱۶ و ۱۷). به علاوه LTP2ها خاصیت ضد میکروبی هم دارند (۱۸). اثر آنجائیکه این پروتئین‌ها به شدت پایدار هستند، میتوانند داروهای ناپایدار را در مقابل اکسیداسیون و یا تخریب محافظت کنند بنابراین در سیستم رهاسازی دارو^۱ نیز کاربرد دارند. همچنین اثر این پروتئین در ساخت حسگرهای زیستی هم استفاده شده است (۱۹ و ۲۰). در این مطالعه ناحیه کدکننده ژن LTP2 برگ گیاه برنج در وکتور pGEX-6p-2 کلون شد.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA از برگ برنج
بذر برنج ایرانی (Oryza Sativa, Indica Group, Nemat Variety): از موسسه تحقیقات برنج ایران (آمل، ایران) ۱۴۳-IR۹۷۱۰-۱-۹-۱ (۱-۱۰-۱۰۱) از موسسه تحقیقات برنج ایران (آمل، ایران) تهیه شد. بذرها در محلول هیپوکلریت ۱۰٪ (W/V) استریل شدند و سپس به مدت سه شبانه روز در آب قرار گرفتند و بعد از آن بذرها جوانه زدند. بافت برگ از گیاه جدا و داخل تیوپ قرار داده شد. سپس تیوپها به ظرف حاوی نیتروژن مایع منتقل شدند. برای استخراج DNA از برگ گیاه از تکنیک CTAB استفاده شد (۲۱). ژنوم استخراج شده در ۱۰۰ μl آب مقطر استریل حل شد. جهت اطمینان از صحت عمل استخراج، ۲ μl از نمونه‌ها الکتروفورز شدند.

تکثیر ناحیه کدکننده ژن LTP2 برنج

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت عملیات کلونینگ، توالی کامل ژن LTP2 برنج از NCBI بدست آمد (Accession No. CT۸۲۹۹۹۰۱) و با نرم‌افزار oligo۶ آنالیز شد. جایگاه برش آنزیم BamHI در سمت ۵' پرایمر رفت و جایگاه برش آنزیم XhoI در سمت ۵' پرایمر برگشت قرار داده شد. توالی پرایمر رفت: ۵'-TAAGGATCCATGAG-۳' و توالی پرایمر برگشت ۳'-GAAGTTGGCGGTGTTGGTG-۳'-TAAGGATCCATGAG-۳' بود. (سایت‌های برشی به صورت Italic نشان داده شده است). پرایمرها از شرکت Metabion (آلمان) سفارش داده شد. برای تکثیر ناحیه کدکننده ژن LTP2، PCR در حجم ۲۵ μl شامل ۰/۳ μl Smar Taq polymerase (stock: ۵۰ μl) و ۰/۳ μl dNTPs mix (stock: ۱۰ mM) انجام شد.

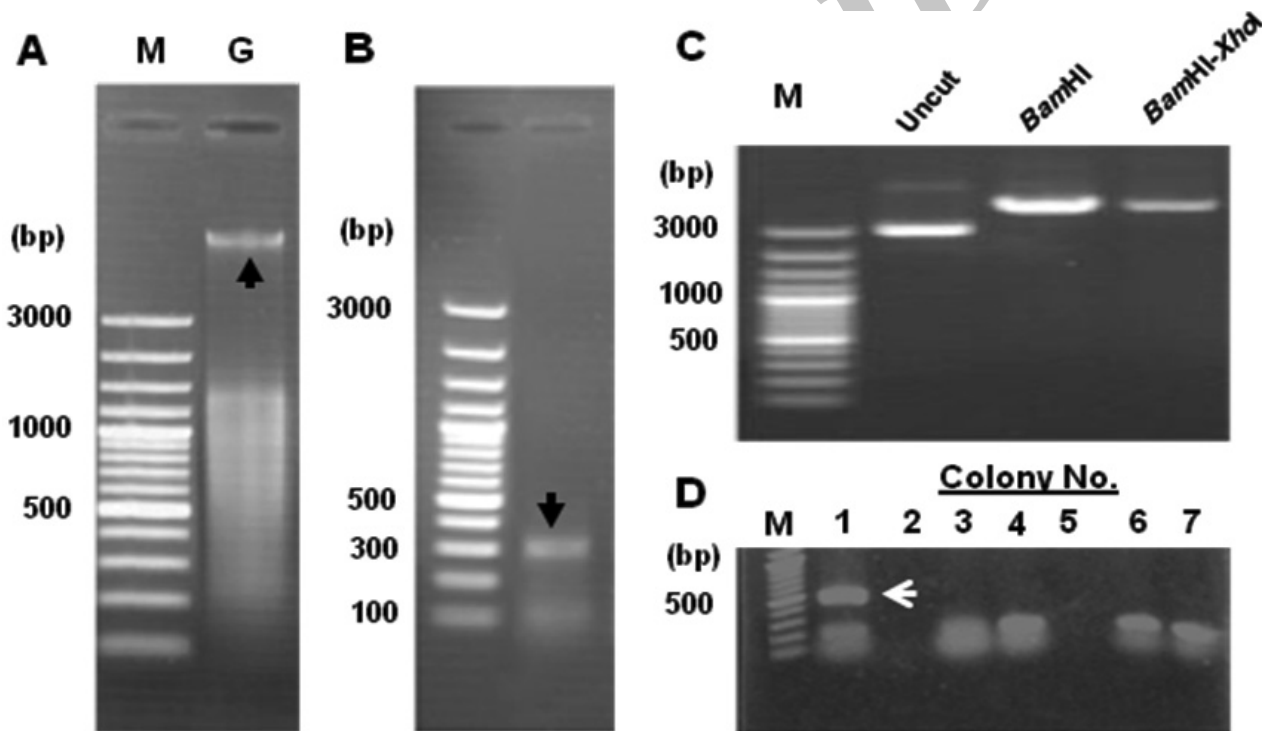
1. Drug Delivery
2. Denaturation
3. Annealing
4. Extension
5. Sticky End
6. Ligation

در طول پروسه استخراج می‌باشد. ناحیه کد کننده شرن LTP2 تکثیر شده توسط تکنیک PCR حدود ۳۰۰ bp طول دارد (شکل B۱). قطعه تکثیر شده و وکتور pGEX-6p-2 به جهت تولید انتهاهای چسبنده با آنزیم‌های محدودکننده تیمار شدند که حرکت پلاسمید روی ژل آگاروز، قبل و بعد از برش متفاوت است (شکل C۱). عملیات الحاق جهت تولید وکتور نوترکیب pGEX-6p-2/GST-LTP انجام شد. جهت بررسی وجود وکتور نوترکیب در کلونی‌های تولید شده عملیات Colony PCR انجام شد. آنالیز Colony PCR نشان داد که یکی از هفت کلونی بررسی شده حاوی وکتور نوترکیب است (شکل D۱).

بعد از سانتریفیوژ در بافر فسفات (V=pH) حل شد و باکتری‌ها با کمک روش سونیکاسیون لیز شدند. بعد از سانتریفوژ با دور بالا، عصاره باکتری از مواد زاید جدا و ۱۰۰ μl از آن، روی ژل SDS-PAGE بارگزاری و با CBB (Commasie brilliant blue) رنگ آمیزی شد (۲۲).

نتایج

کلون کردن ناحیه کد کننده ژن LTP2 برنج
ژنوم استخراج شده برنج شامل یک باند اصلی با تحرک کم روی ژل آگاروز می‌باشد (شکل A۱). وجود اسمیر، حاکی از شکست نسبی ژنوم



شکل ۱: مراحل کار ساخت ناحیه کدکننده LTP2 برنج، (A) استخراج شرنوم (G) از برگ برنج، باند مورد نظر بوسیله نوک پیکان نشان داده شده است. (B) محصول PCR با اندازه حدود ۳۰۰bp که نشان‌دهنده طول ناحیه کدکننده LTP2 برنج می‌باشد. محصول PCR با نوک پیکان نشان داده شده است.

که هدف از آزمایش، تولید پروتئین همجوش GST-LTP2^v است. توالی کامل ناحیه کدکننده LTP2 شامل ۲۹۱bp است (شکل A۲). قسمتی از توالی ابتدا و انتهای ناحیه کدکننده LTP2 در شکل B۲ و C۲ نشان داده شده است.

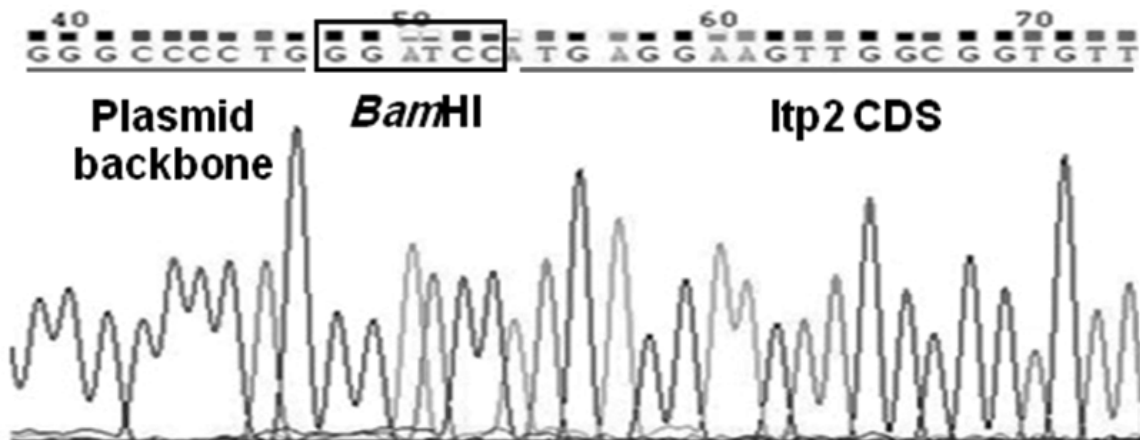
آنالیز توالی ناحیه کدکننده LTP2 برنج
به منظور اطمینان از صحت عملیات کلونینگ و عدم وجود جهش، پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده، توالی یابی شدند. داده‌ها صحت توالی LTP2 را تایید نمود. توالی LTP2 فاقد متیونین ابتدایی است، چرا

A

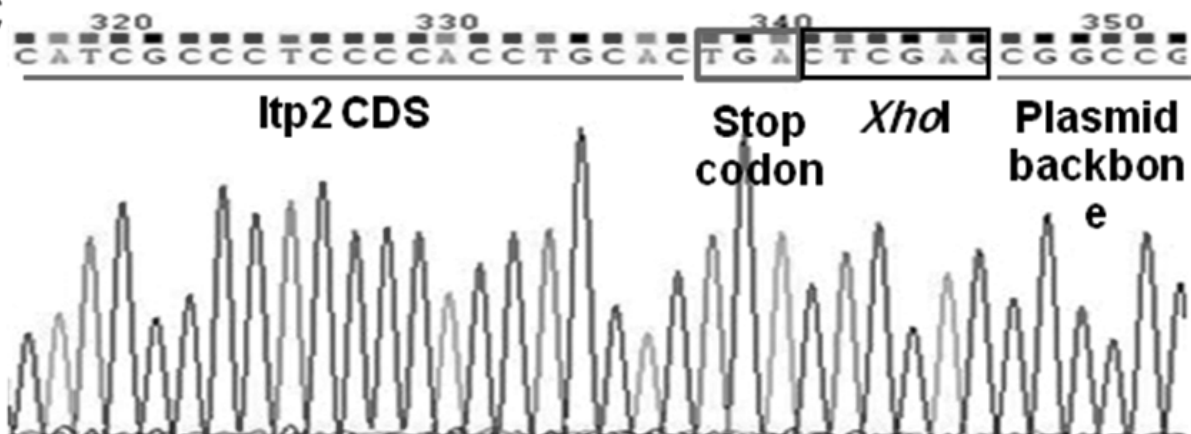
```

5' ATGATGAGGAAAGTTGGCGGTGTTGGTGTGGCGGTGGCGA
  TGGTGGCGGCGTGC GGCGGCGGCGTCTGGGTGTAGCGGG
  GGCCAGTTGCAACGCTGGGCAGCTGACGGTGTGCGCGGGG
  GCGATCGCGGGCGGGGCGCGGCCGACGGCGGCGTGCTGCT
  CCAGCCTGCGGGCGCAGCAGGGCTGCTTCTGCCAGTTCGCC
  AAGGACCCGCGCTACGGGCGCTACGTCAACAGCCCCAACG
  CCCGCAAGGCCGTCTCCTCCTGCGGCATCGCCCTCCCCACC
  TGCCACTGA 3'
    
```

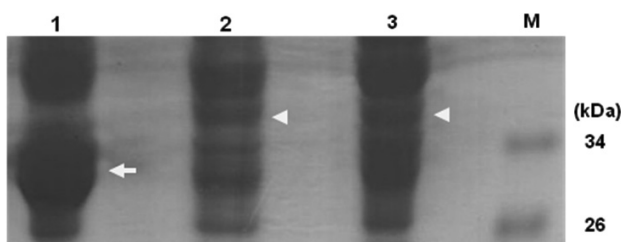
B



C



شکل ۲: (A) تصویر شماتیک ناحیه کدکننده ژن LTP2 برنج. (B و C) قسمتی از توالی ابتدا و انتهای ناحیه کدکننده ژن LTP2.



شکل ۳: رنگ آمیزی CBB برای ژل SDS-PAGE بارگزاری شده با عصاره محتوی پروتئین‌های GST و GST-LTP2. لاین ۱: عصاره باکتری‌های ترانسفورم شده با pGEX-6p-2. لاین‌های ۲ و ۳: عصاره باکتری‌های ترانسفورم شده با pGEX-6p-2/GST-LTP2. مارکر پروتئینی با وزن متوسط. M

برای بهینه‌سازی تکثیر ژن LTP2 اتر بتائین، بافر آمونیوم سولفات و دی متیل سولفوکسید استفاده شد. در مطالعات قبلی LTP2 اتر برنج تخلیص شده (۱۲) که در پروژه حاضر به دلیل نصب برچسب GST به ابتدای پروتئین، تخلیص آن به مراتب آسان‌تر می‌شود. اعتقاد بر این است که LTP، کاندید مناسبی برای ساخت حسگرهای زیستی و کاربرد در سیستم رهاسازی دارو می‌باشد (۲۰ و ۲۹). ساخت وکتور نوترکیب pGEX-6p-2/GST-LTP2 در این پروژه می‌تواند راه را برای مطالعات بعدی، مثل کاربرد انواع نوترکیب و جهش یافته LTP2 در ساخت حسگرهای زیستی و رهاسازی دارو، هموار سازد.

تشکر و قدردانی

در پایان از پرسنل پژوهشکده رویان اصفهان که همکاری صمیمانه‌ای را در طی این پروژه داشته‌اند تشکر می‌نمائیم.

آنالیز بیان LTP2

جهت بررسی بیان GST-LTP2، عصاره سلول‌های ترانسفورم شده با pGEX-6p-2 و pGEX-6p-2/GST-LTP2 الکتروفورز شدند. بیان GST به وضوح بر روی ژل SDS-PAGE و با وزن ملکولی ۲۶ kDa مشخص شد (شکل ۳، لاین ۱). بیان GST-LTP2 هم با وضوح کمتر و با وزن ملکولی ۳۷ kDa تشخیص داده شد (شکل ۳، لاین ۲ و ۳).

بحث

به علت کاربرد زیاد LTP در بیوتکنولوژی، محققان پژوهش‌های زیادی بر روی این پروتئین انجام داده‌اند. کلونینگ LTP2 برنج در سال‌های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۷ به ترتیب در وکتورهای pGEM-Vzf (+) (۲۳) و pBluescript SK+ (۲۴) انجام شد. در این تحقیق ما LTP2 را در وکتور pGEX-6p-2 با برچسب GST کلون نمودیم. Elmorgani و همکارانش ساخت وکتور بیانی حامل شرن LTP (LTPW) را گزارش دادند. آن‌ها LTP را در وکتور pETDTP کلون کردند (۲۵). در تحقیق دیگری LTP لوبیا در وکتور pCR2.1-TOPO کلون شد. به علت وجود اینترون در ژن RNA، LTP1 اتر بافت دانه لوبیا جدا و سپس cDNA ساخته شد و اتر آن برای تکثیر ناحیه کدکننده LTP1 استفاده شد (۲۶ و ۲۷). شرن LTP1 اترای یک اینترون می‌باشد در حالی که LTP2 اینترون ندارد (۱۳) بنابراین برای تکثیر شرن LTP2 اتر روش genomic PCR استفاده شد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تکثیر توالی‌های غنی اتر بازهای سیتوزین و گوانین با بکارگیری بتائین و دی متیل سولفوکسید بهبود می‌یابد (۲۸) لذا در پروژه حاضر

References / منابع

1. Kader J-C. Proteins and the intracellular exchange of lipids: stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochim. Biophys. Acta.* 1975; 380: 31-44.
2. Kader J-C. Lipid-transfer proteins in plants. *J Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1996; 47: 627-654.
3. Lee JY, Min K, Cha H, HwangKY, Suh SW. Rice nonspecific lipid transfer protein: the 1.6Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J Mol. Biol.* 1998; 276: 437-448.
4. Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, Suh SW. High resolution crystal structure of the non-specific lipid transfer protein from maize seedlings. *J Structure.* 1995; 3: 189-199.
5. Carvalho A, Gomes V. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology. *J Peptide.* 2007; 28: 1144-1153.
6. Wang Z, Xie W, Chi F, Li C. Identification of non-specific lipid

- transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in Arabidopsis. *FEBS Letters*. 2005; 579: 1683–1687.
7. Douliez J-P, Pato C, Rabesona H, Molle D, Marion D. Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *Eur. J Biochem*. 2001; 268: 1400-1403.
 8. Estanyol M, Gomis-Rüth F, Puigdomènech P. The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant. Physiol. Biochem*. 2004; 42: 355-365.
 9. Lin KF, Liu YN, Hsu ST, et al. Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *J Biochem*. 2005; 44: 5703-5712.
 10. Pyee J, Yu H, Kolattukudy PE. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch. Biochem. Biophys*. 1994; 311: 460-468.
 11. Samuel D, Liu Y-J, Cheng C-S, Lyu P-C. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol. Chem*. 2002; 277: 35267-35273.
 12. Liu Y-J, Samuel D, Lin C-H, Lyu P-C. Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002; 294: 535-540.
 13. Kalla R, Shimamoto K, Potter R, Nielsen PS, Linnestad C, Olsen OA. The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. *Plant J*. 1994; 6: 849-860.
 14. Arondel V, Vergnolle C, Cantre C, Kader J-C. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in Arabidopsis thaliana. *J Plant. Sci*. 2000; 157: 1-12.
 15. Freddy B, Nathalie C, Marie-Françoise G. Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLTP) gene families and identification of wheat nsLTP genes by EST data mining. *BMC. Genomics*. 2008; 9: 86.
 16. Mills NEC, Madsen C, Shewry PR, Wichers HJ. Food allergens of plant origin their molecular and evolutionary relationships. *J Trends. Food. Science & Technology*. 2003; 14: 145-156.
 17. Salcedo G, Sanchez-monge R, Diaz-perales A, Garcia-casado G, Barber D. Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *J Clin. Exp. Allergy*. 2004; 34: 1336-1341.
 18. Wang S, Wu J, Ng TB, Ye X, Rao P. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *J Peptides*. 2004; 25: 1235-1242.
 19. Pato C, Borgne M, Baut G, Pape P, Marion D, Douliez J. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. *J Biochem, Pharmacol*. 2001; 62: 555-560.
 20. Choi E, Mao J, Mayo S. Computational design and biochemical characterization of maize nonspecific lipid transfer protein variants for biosensor applications. *J Protein Sci*. 2007; 16: 582–588.
 21. Ehsanpour A. A, Tavassoli M, Arab L. Sex determination of Pistaciavera. using ISSR markers. *J Malays. Appl. Biol*. 2008; 37: 25-28.
 22. Wingfield PT. Purification of recombinant proteins. (Unit 6) in current protocols in protein science. Taylor G., 2010, John Wiley and Sons Co. New York, USA.
 23. Garcèa-Garrido J, Menossi M, Puigdomènech P, Martènez-Izquierdo J, Delseny M. Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice. *FEBS Letters*. 1998; 428: 193-199.
 24. Xiaohui L, Tingting L, Shuliang Y, et al. A collection of 10,096 indica rice full-length cDNAs reveals highly expressed sequence divergence between *Oryza sativa* indica and japonica subspecies. *Plant. Mol. Biol*. 2007; 65: 403-415.
 25. Elmorjani Kh, Lurquin V, Lelion A, Rogniaux H, Marion D. A bacterial expression system revisited for the recombinant production of cystine-rich plant lipid transfer proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 316: 1202-1209.
 26. Carvalho A, Filho G, Ferreira B, et al. Cloning and characterization of a cowpea seed lipid transfer protein cDNA: expression analysis during seed development and under fungal and cold stresses in seedlings' tissues. *J Plant Physiol. Biochemist*. 2006; 44: 732-742.
 27. Monnet F, Dieryck W, Boutrot F, Joudrier P, Gautier M. Puri-

- fication, characterisation and cDNA cloning of a type 2 (7 kDa) lipid transfer protein from *Triticum durum*. *J Plant. Science*. 2001; 161: 747-755.
28. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a Powerful Mixture for Amplification of GC-Rich DNA Sequences. *JMD*. 2006; 8: 544-550.
29. Chao-Sheng C, Min-Nan C, Yaw-Jen L, Lin-Yi H, Ku-Feng L, Ping-Chiang L. Evaluation of plant non-specific lipid-transfer proteins for potential application in drug delivery. *J Enzyme. Microbial. Technology*. 2004; 35: 532-539.

Archive of SID