مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۵۱/هفته اول آبان ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱۱

بیان و تخلیص DNA پلیمراز Pfu متعلق به خانواده‌ی B

زهرا خلیلی بروجنی[۱]، دکتر داریوش عابدی[۲]، مهدی عباسیان[۳]، دکتر محمدرضا مفید[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: DNA پلیمرازها آنزیم‌هایی هستند که سنتز مولکول DNA را از دئوکسی ریبونوکئوتیدها بر عهده دارند. این آنزیم‌ها ابزارهای ضروری در زیست شناسی مولکولی به حساب می‌آیند. DNA پلیمراز Pfu از یک آرکئوباکتری گرمادوست که در رسوبات دریایی با دمای ۱۰۰-۹۰ درجه‌ی سلسیوس زندگی می‌کند، جدا گردیده است. این آنزیم، خصوصیت اگزونوکلئازی ۳ به ۵ را دارد که باعث اصلاح خطاهای ناشی از همانندسازی DNA می‌شود.

روش‌ها: در این مطالعه، قطعه‌ی کد کننده‌ی ژن DNA پلیمراز Pfu در ناقل بیانی pET-۱۵b کلون گردید. سپس با تغییر شرایط بیان مانند غلظت IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)، زمان و دمای القا، بیان این آنزیم بهینه شد. در نهایت در شرایط بهینه، پروتئین در مقیاس بالا تهیه و به روشی ساده تخلیص گردید. سپس آنزیم تخلیص شده، جهت بررسی فعالیت در واکنش (Polymerase chain reaction) PCR به کارگرفته شد.

یافته‌ها: کلونی‌هایی بعد از ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب ایجاد شد که اکثر آن‌ها حاوی پلاسمید بودند. بیان آنزیم Pfu باندی را در حدود kDa ۹۰ در ژل الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis) نتیجه داد. بیشترین میزان تولید پروتئین با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار ماده‌ی القا کننده‌ی IPTG، دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و ۳ ساعت پس از القا مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تخلیص پروتئین با به کارگیری روشی جدید بر مبنای پروتکل Desai منجر به ایجاد محصولی شد که در واکنش PCR فعالیتی مشابه با نمونه‌ی تجاری داشت.

واژگان کلیدی: DNA پلیمراز وابسته به DNA، PCR، کلونینگ، pET-۱۵b

ارجاع: خلیلی بروجنی زهرا، عابدی داریوش، عباسیان مهدی، مفید محمدرضا. **بیان و تخلیص DNA پلیمراز Pfu متعلق به خانواده‌ی B.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۱): ۱۴۰۴-۱۳۹۲

مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR یا Polymerase chain reaction) به دلیل قابلیت تکثیر مولکول DNA، انقلابی را در علوم زیست شناسی ایجاد کرد (۲-۱). دسترسی به این روش، به عنوان یکی از قوی‌ترین تکنیک‌های زیست شناسی سلولی و مولکولی منجر به پیشرفت‌های بزرگی در مهندسی ژنتیک، تشخیص بیماری‌های عفونی و تحقیقات

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۸۹۳۶۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی و مرکز تحقیقات بیوانفورماتیک، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمدرضا مفید
Email: mofid@pharm.mui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

بالینی و جنایی شده است (۳).

DNA پلیمرازها که در همه‌ی ابعاد متابولیسم اسیدهای نوکلئیک از جمله همانندسازی، اصلاح و نوترکیبی DNA، نقش اساسی دارند، از ضروریات این روش به حساب می‌آیند (۴). در ابتدا، جهت تکثیر DNA در واکنش PCR، از قطعه‌ی کلنو (آنزیم تعدیل شده‌ای که با حذف قطعه‌ای شامل ۲۳۳ اسید آمینه از DNA پلیمراز I باکتری E.coli به دست می‌آید) استفاده می‌گردید. فقدان قابلیت تحمل دماهای بالا توسط این آنزیم و در نتیجه‌ی آن، غیر فعال شدن آنزیم حین مرحله‌ی دناتوره شدن و پایین بودن دمای لازم برای فعالیت این آنزیم و همچنین اتصال پرایمرها به مکان‌های غیر اختصاصی، استفاده از این آنزیم را محدود می‌ساخت (۵). در این میان، با کشف DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت، به دلیل داشتن ظرفیت تکثیر DNA در دماهای بالا، مشکلاتی از این دست در طول مراحل مختلف تکثیر DNA حل شد (۶).

Taq پلیمراز که از نوعی مایکوباکتریوم گرما دوست به نام Thermus aquaticus به دست می‌آید، اولین DNA پلیمراز مقاوم به حرارتی بود که برای PCR معرفی شد. عیب اصلی این آنزیم، فقدان فعالیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ است که باعث عدم اصلاح خطاهای ناشی از فعالیت پلیمرازی آنزیم می‌شود (۱۰-۷). از دیگر پلیمرازهای مقاوم به حرارت، می‌توان به DNA پلیمراز Vent، که از Thermococcus litoralis جدا شده است، اشاره کرد. این آنزیم، مقاومت گرمایی بیشتری نسبت به Taq پلیمراز دارد و از طرفی، فعالیت اگزونوکئازی آن ۵ الی ۱۵ برابر از Taq بیشتر است و سطح اطمینان بیشتری را در سنتز DNA ایجاد می‌کند. Tth، Ultma، Dpo۴ و KOD نیز از انواع پلیمرازهای مقاوم به حرارت می‌باشند (۱۲-۱۱).

آنزیم Pfu یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت با دقت (Fidelity) بالا است که متعلق به خانواده‌ی B پلیمرازها می‌باشد (۱۳). این آنزیم ۹۲ کیلو دالتونی که از یک آرکئوباکتری بی‌هوازی و بسیار گرما دوست به نام Pyrococus furiosus جدا گردیده است، برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ تعیین خصوصیت شد. این آنزیم، دو خصوصیت DNA پلیمرازی ′۵ به ′۳ و تصحیح کنندگی اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ را دارا می‌باشد (۱۴). وجود خصوصیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ در این پلیمراز، امکان اصلاح اشتباهات همانندسازی را حین انجام PCR فراهم می‌کند (۱۵). میزان خطای این آنزیم، ۵ برابر کمتر نسبت به دیگر پلیمرازهای با دقت بالا از جمله Deep vent و ۱۰ برابر کمتر نسبت به Taq پلیمراز که خاصیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ را ندارد، گزارش شده است (۱۶).

در مطالعات قبل، این آنزیم با کمک سیستم با کولوویروس کلون و بیان گردید که امکان تولید مقادیر زیادی از آنزیم را فراهم می‌کرد، اما از نظر قیمت به صرفه نبود (۱۷). بنابراین، در مطالعات بعد از آن سعی بر تولید این آنزیم در E.coli شد که بسیار مقرون به صرفه‌تر بود (۱۸).

در سال‌های اخیر با پیشرفت فن‌آوری DNA نوترکیب، تا حدود زیادی از منابع میکروبی جهت تولید آنزیم‌ها استفاده گردیده است. با توجه به اهمیت PCR در علوم پزشکی و استفاده از DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت در PCR، به ویژه انواع

Archive of SID
www.SID.ir

با دقت (Fidelity) بالا، در این تحقیق سعی بر آن شد تا با کلون نمودن قطعه‌ی کد کننده‌ی DNA پلیمراز Pfu و بیان آن در سیستم E.coli و استخراج آن از این باکتری، زمینه برای تولید این آنزیم در آزمایشگاه فراهم گردد و به دنبال آن، آنزیم استخراج شده به عنوان جایگزینی مناسب برای انواع تجاری آن باشد.

در این مطالعه، پس از کلونینگ قطعه‌ی کد کننده‌ی DNA پلیمراز Pfu در ناقل بیانی pTE-۱۵b، در ابتدا اثر هر کدام از متغیرهای غلظت ماده‌ی القاگر، دما و مدت زمان انکوباسیون روی میزان تولید پروتئین بررسی شد. سپس بعد از انتخاب بهترین شرایط بیانی، بیان پروتئین در حجم بالا انجام و پروتئین استخراج گردید. در نهایت، فعالیت پروتئین استخراج شده توسط PCR بررسی شد.

روش‌ها

آمپی سیلین و IPTG مصرفی در این تحقیق از شرکت Sigma تهیه شد. آنزیم‌های برشی، T۴ DNA ligase، Pfu polymerase و آنزیم RNase از شرکت فرمنتاس (Fermentase) خریداری شد. مارکر وزن مولکولی پروتئین و DNA ladder نیز از شرکت فرمنتاس خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مصرفی و مواد لازم جهت تهیه‌ی محیط کشت، متعلق به شرکت Merck بود. کیت‌های استخراج پلاسمید، جداسازی DNA از ژل و کیت خالص‌سازی محصول PCR از شرکت کیاژن تهیه شدند.

در این تحقیق سویه‌ی XL1-Blue باکتری E.coli جهت همسان‌سازی و سویه‌ی BL۲۱(DE۳) باکتری E.coli به عنوان میزبان بیانی استفاده شد. ناقل pET-۱۵b به عنوان ناقل بیانی انتخاب شد. DNA ژنومی باکتری Pyrococcus furiosus از DSMZ آلمان خریداری شد.

جداسازی قطعه‌ی کد کننده‌ی آنزیم از ژنوم باکتری Pyrococcus furiosus

توالی کد کننده‌ی آنزیم Pfu پلیمراز باکتری P.furiosus از بانک اطلاعاتی NCBI استخراج گردید (Accession NO.D۱۲۹۸۳). دو آغازگر اختصاصی رفت و برگشت ′۳-TTTCATATGATTTTAGATGTGGATTACA-′۳ و pfu-R: ′۵-TAACTG GAAGGACCGAATTGTAATTTTTTAGGAT-′۳ حاوی جایگاه pfu-R: ′۵-CGAGCTCTTTTTT شناسایی آنزیم‌های برشی *Nde*I و *Xho*I با استفاده از نرم‌افزار Oligo.۵ طراحی شدند.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و در محلول حاوی ۰/۲ میکروگرم از DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP (Deoxynucleotide)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰x و ۲ واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase صورت گرفت. برنامه‌ی PCR شامل یک مرحله‌ی اولیه ۵ دقیقه دمای ۹۴ °C و ۳۵ سیکل متوالی (در هر سیکل ۲۰ ثانیه دمای ۹۴°C، ۴۵ ثانیه دمای ۵۸ °C و ۲/۵ دقیقه دمای ۷۲°C) بود و در نهایت، برنامه با ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ °C پایان یافت. کیفیت و کمیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز آگاروز TAE (Tris base، Acetic acid و EDTA) ۱ درصد ارزیابی شد.

همسان‌سازی قطعه‌ی DNA جداسازی شده در پلاسمید بیانی pET-۱۵b

محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی

Archive of SID
www.SID.ir

محصول PCR شرکت کیاژن (#۲۸۷۰۴) طبق دستورالعمل کیت، خالص‌سازی و توسط دو آنزیم NdeI و XhoI به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ °C برش داده شد. ناقل بیانی pET-۱۵b با استفاده از کیت اسخراج پلاسمید فرمنتاس (K۰۵۰۲) از باکتری میزبان XL۱-Blue طبق دستور شرکت سازنده، استخراج گردید. واکنش هضم برای ناقل بیانی مطابق قطعه‌ی PCR انجام گردید. محصول PCR برش داده شده و ناقل هضم شده به طور جداگانه توسط کیت خالص‌سازی از ژل شرکت کیاژن (#۲۸۷۰۴) از ژل آگاروز ۱ درصد استخراج گردید.

واکنش اتصال با استفاده از T۴ DNA ligase (شرکت فرمنتاس) در دمای ۲۲ °C به مدت ۱ ساعت انجام شد. محصول فرایند اتصال، با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد XL۱-Blue (تهیه شده با روش شیمیایی) انتقال داده شد (۵). محصول واکنش انتقال روی محیط LB (Luria Bertani) آگار حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml کشت داده و در دمای ۳۷ °C انکوبه شد. غربالگری کلونی‌های به دست آمده، با روش هضم آنزیمی و PCR صورت گرفت. ناقل نوترکیب (pET-Pfu)، به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد شده‌ی باکتری E.coli سویه‌ی BL۲۱(DE۳) منتقل و تعدادی از کلونی‌های رشد کرده، روی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین برای مرحله‌ی بیان انتخاب شدند.

بیان پروتئین نوترکیب در میزبان بیانی

یک لوپ از هر کلونی منتخب در ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml در دمای ۳۷ °C کشت شبانه گردید. کشت اولیه، با ضریب رقت ۱/۱۰۰ به ۵ میلی‌لیتر محیط مایع جدید، حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml تلقیح گردید. پس از رسیدن ضریب جذب نوری طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۶-۰/۴، القا کننده‌ی IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) اضافه گردید و کشت باکتریایی به مدت ۳ ساعت دیگر در ۱۸۰ rpm و دمای ۳۷ °C انکوبه شد. سویه‌ی BL۲۱(DE۳) فاقد ناقل نوترکیب نیز در همین شرایط کشت داده شد. یک میلی‌لیتر از هرکشت باکتریایی در لوله‌ی اپندرف رسوب داده شد و رسوب در ۱ میلی‌لیتر بافر PBS (Phosphate- buffered saline) (Na_2HPO_4 ۰/۷۵ mM، NaCl ۰/۱ mM، KH_2PO_4 ۱/۷ mM و pH = ۷/۲) ورتکس گردید. بخشی از سوسپانسیون به نسبت ۳ به ۱ با بافر بارگذاری پروتئین مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ °C جوشانده شد. بررسی بیان با تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) در ژل ۱۰ درصد و با رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (Coomassie brilliant blue) انجام گردید.

بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین نوترکیب Pfu

به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین pfu سه عامل غلظت القا کننده، دمای انکوباسیون و مدت زمان القا، به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا غلظت‌های مختلف IPTG (۱ mM- ۰/۷۵- ۰/۵- ۰/۲۵) مورد بررسی قرار گرفت. سپس در غلظت بهینه و دمای ۳۷ °C مدت زمان انکوباسیون بعد از القا (۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت) بررسی شد. در مرحله‌ی بعد، در غلظت و زمان بهینه، دمای انکوباسیون (۲۵ °C، ۳۰ و ۳۷) بررسی شد.

Archive of SID
www.SID.ir

استخراج پروتئین نوترکیب Pfu

پس از بهینه‌سازی و انتخاب بهترین شرایط بیان به کمک نتایج حاصل از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE، بیان پروتئین pfu در حجم بالا و در شرایط بهینه انجام شد. بدین ترتیب که یک لوپ از کلونی باکتری در ۵ میلی‌لیتر محیط TB (Tubercle bacillus) حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml در دمای ۳۷ °C کشت شبانه گردید. کشت اولیه با ضریب رقت ۱/۱۰۰ به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع جدید حاوی آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml تلقیح گردید.

پس از رسیدن ضریب جذب نوری مناسب در طول موج ۶۰۰ nm، محیط کشت با غلظت بهینه‌ی IPTG القا شد. در کنار آن، سایر متغیرهای بهینه شده نیز جهت انکوباسیون لحاظ گردید. پس از اتمام بیان سلول‌های باکتری به مدت ده دقیقه و با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ و رسوب داده شدند. رسوب حاصل در ۲۵۰ میلی‌لیتر بافر A (EDTA ۱ mM، ۵۰ mM Dextrose، Tris-HCl ۵۰ mM و pH = ۷/۹) شستشو داده شد و بار دیگر رسوب داده شد.

رسوب به دست آمده، در ۵۰ میلی‌لیتر بافر A حاوی ۴ mg/ml لیزوزیم هموژن گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در ادامه، به همان حجم بافر B (KCl ۵۰ mM، ۱ mM EDTA، ۰/۵ درصد Tween ۲۰، ۰/۵ درصد Nonidet P۴۰، PMSF ۱ mM، Tris-HCl ۱۰ mM و pH = ۷/۹) به سوسپانسیون قبل اضافه شد و به بن ماری ۷۵ °C به مدت ۱ ساعت منتقل گردید. بعد از گذشت ۱ ساعت، باقی‌مانده‌ی سلولی و پروتئین‌های دناتوره شده توسط سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm جدا شدند. به فاز رویی حاصل از مرحله‌ی قبل، آمونیوم سولفات (۶۵ درصد اشباع) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. نمونه‌ی حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد.

رسوب ایجاد شده در جدار و ته لوله، حاوی پروتئین استخراج شده بود. رسوب در ۸ میلی‌لیتر بافر A حل شد و به مدت ۱۶ ساعت در بافر S (KCl ۵۰ mM، EDTA ۰/۱ mM، DTT ۱ mM، PMSF ۰/۵ mM، ۵۰ درصد Glycerol، Tris-HCl ۵۰ mM و pH = ۷/۹) و دمای ۴ °C دیالیز گردید.

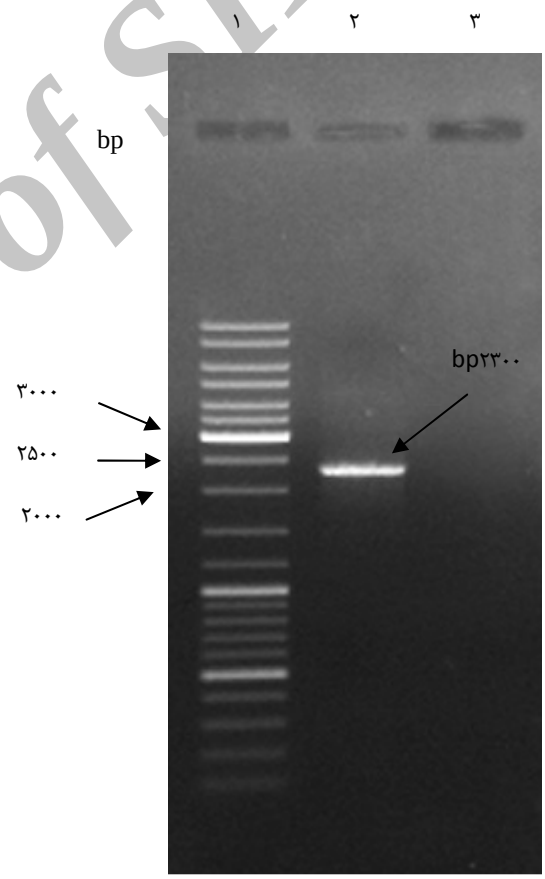
بررسی فعالیت آنزیم استخراج شده

فعالیت آنزیم استخراج شده توسط واکنش PCR و در مقایسه با نوع تجاری (Fermentas) آن بررسی گردید. بدین منظور، قطعاتی از DNA با اندازه‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ جفت باز در PCR توسط هر دو آنزیم تجاری و تخلیص شده در دو ویال جداگانه تکثیر شدند. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر و در محلول حاوی ۰/۲ میکروگرم از DNA الگو، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، ۱/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x PCR و ۲ واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase تجاری و تخلیص شده صورت گرفت. برنامه‌ی PCR شامل یک مرحله‌ی اولیه ۵ دقیقه دمای ۹۴ °C و ۳۵ سیکل متوالی (در هر سیکل ۲۰ ثانیه دمای ۹۴ °C، ۴۵ ثانیه دمای ۵۴ °C و ۱ دقیقه دمای ۷۲ °C) بود و در نهایت، برنامه با ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ °C پایان یافت. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز آگاروز TAE ۱ درصد ارزیابی شد.

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

قطعه‌ی کد کننده‌ی آنزیم pfu پلیمراز با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی pfu-F و pfu-R از DNA ژنومی باکتری تکثیر گردید. جایگاه‌های برشی NdeI و XhoI به نحوی در آغازگرها تعبیه شدند که توالی کد کننده، در چهارچوب خواندن صحیح ناقل pET-۱۵b قرار گیرد. قطعه‌ی تکثیر شده، بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، الکتروفورز گردید و باند مورد نظر به طول حدود ۲۳۰۰ bp مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱. ارزیابی محصول PCR (Polymerase chain reaction)
۱) Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas #SM۰۳۳۲)، ۲) محصول PCR، ۳) کنترل منفی PCR (نمونه‌ی فاقد DNA الگو)

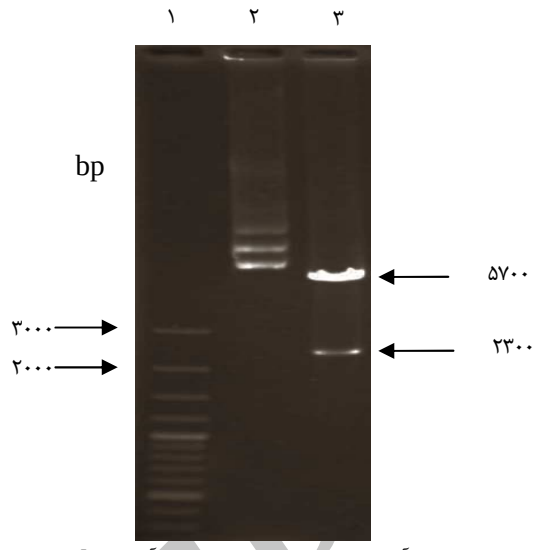
در مرحله‌ی بعد، ناقل pET-۱۵b استخراج شده با استفاده از دو آنزیم برشی NdeI و XhoI به طور کامل هضم گردید. به منظور افزایش راندمان، واکنش اتصال قطعه به ناقل برش یافته، ناقل برش یافته با دو آنزیم از ژل آگاروز ۱ درصد جداسازی و خالص گردید. از طرفی، محصول PCR نیز پس از برش با همان دو آنزیم، خالص‌سازی گردید. پس از انجام واکنش اتصال و انتقال ناقل‌های نوترکیب به باکتری E.coli سویه‌ی XL۱-Blue، صحت اندازه‌ی قطعه‌ی همسان‌سازی شده در باکتری‌های تراریخته با استفاده از روش هضم آنزیمی ناقل نوترکیب، توسط آنزیم‌های NdeI و XhoI تأیید گردید.

هضم آنزیمی با ۲ آنزیم ذکر شده، دو قطعه در حدود ۲۳۰۰ bp و ۵۷۰۰ bp را نشان داد که به ترتیب مربوط به توالی کد کننده‌ی آنزیم pfu پلیمراز و ناقل pET-۱۵b می‌باشند (شکل ۲). ناقل نوترکیب پس از تأیید اندازه‌ی قطعه‌ی همسان شد و به سویه‌ی بیانی LB۲۱(DE۳) منتقل شد. نتایج حاصل از آنالیز بیان با تکنیک SDS-PAGE در مقایسه با نمونه‌ی شاهد (باکتری فاقد ناقل نوترکیب) وجود نوار پروتئینی در حدود ۹۰ kDa را نشان داد که به درستی با اندازه‌ی پیش‌بینی شده‌ی پروتئین مورد نظر (۹۲ کیلو دالتون) مطابقت داشت.

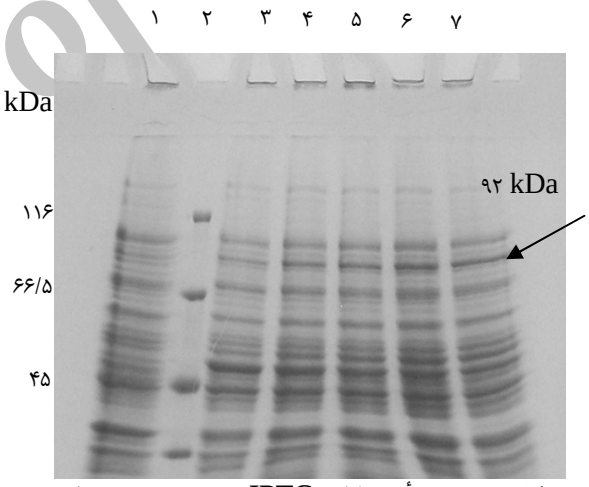
در مرحله‌ی بعد، جهت بهینه‌سازی میزان تولید پروتئین نوترکیب، سه عامل غلظت القا کننده، دمای انکوباسیون و مدت زمان القا بررسی شد. بیشترین میزان تولید پروتئین در غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار ماده‌ی القا کننده‌ی IPTG، دمای ۳۷ °C و ۳ ساعت پس از القا مشاهده شد (شکل‌های ۳، ۴ و ۵). بیان در حجم بالا و با لحاظ کردن کلیه‌ی شرایط بهینه شده انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

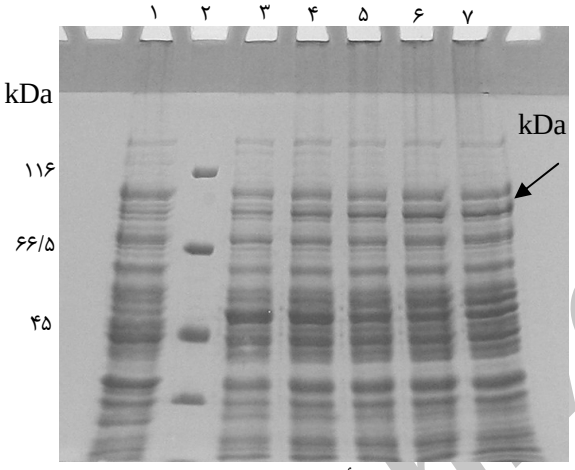


شکل ۲. هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با دو آنزیم NdeI و XhoI
۱) Gene Ruler Ladder Mix (Fermentas# SM۰۳۲۱)، ۲) pET-۱۵b-Pfu، ۳) محصول برش pET-۱۵b-Pfu با دو آنزیم NdeI و XhoI



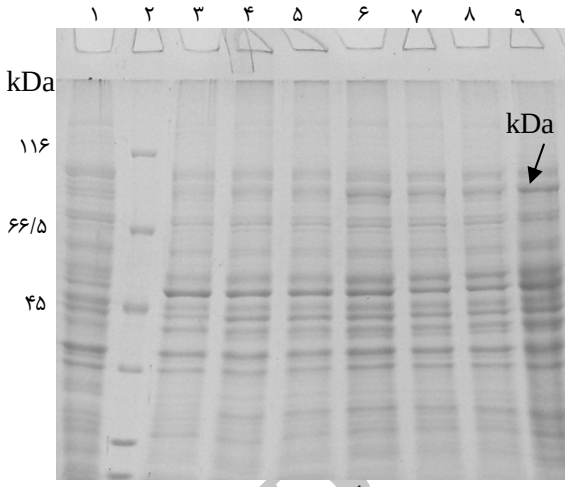
شکل ۳. بررسی تأثیر غلظت IPTG بر میزان پروتئین تولید شده
۱) BL۲۱(DE۳) (به عنوان نمونه‌ی فاقد پلاسمید نوترکیب و کنترل منفی باکتری)، ۲) مارکر وزن مولکولی پروتئین (Fermentas#SM۰۴۳۱)، ۳) نمونه‌ی القا نشده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب، به عنوان نمونه‌ی دارای پلاسمید و کنترل منفی نبود ماده‌ی القا کننده]، ۴) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با ۰/۲۵ mM IPTG، ۵) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با ۰/۵ mM IPTG، ۶) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با ۰/۷۵ mM IPTG، ۷) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با ۱ mM IPTG.

پروتئین pfu تولید و استخراج گردید. حاصل استخراج در ژل الکتروفورز SDS-PAGE وجود نوار پروتئینی در حدود ۹۰ kDa را نشان داد که به درستی با اندازه‌ی پیش‌بینی شده‌ی پروتئین مورد نظر (۹۲ کیلو دالتون) مطابقت داشت (شکل ۶). آنزیم استخراج شده در واکنش PCR استفاده و با نوع تجاری آن مقایسه شد. نتیجه‌ی حاصل از الکتروفورز ژل آگاروز، نشان داد که آنزیم تخلیص شده توانست DNAهای الگو را به طور مشابه با نمونه‌ی تجاری تکثیر نماید (شکل ۷).



شکل ۴. بررسی تأثیر زمان بر میزان پروتئین تولید شده
۱) BL۲۱(DE۳) (به عنوان نمونه‌ی فاقد پلاسمید نوترکیب و کنترل منفی باکتری)، ۲) مارکر وزن مولکولی پروتئین (Fermentas#SM۰۴۳۱)، ۳) نمونه‌ی القا نشده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب، به عنوان نمونه‌ی دارای پلاسمید و کنترل منفی نبود ماده‌ی القا کننده]، ۴) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ mM IPTG (۱ ساعت پس از القا)، ۵) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ mM IPTG (۲ ساعت پس از القا)، ۶) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ mM IPTG (۳ ساعت پس از القا)، ۷) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ mM IPTG (۴ ساعت پس از القا)

Archive of SID
www.SID.ir

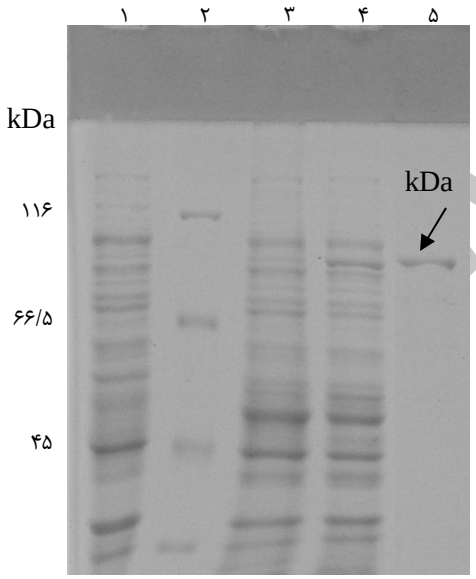


شکل ۵. بررسی تأثیر دما بر میزان پروتئین تولید شده ۱) BL۲۱(DE۳) (به عنوان نمونه‌ی فاقد پلاسمید نوترکیب و کنترل منفی باکتری)، ۲) مارکر وزن مولکولی پروتئین (Fermentas#SM۰۴۳۱)، ۳) نمونه‌ی القا نشده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب، به عنوان نمونه‌ی دارای پلاسمید و کنترل منفی نبود ماده‌ی القا کننده]، ۴) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۳ ساعت پس از القا (۲۵ °C)، ۵) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۳ ساعت پس از القا (۳۰ °C)، ۶) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۳ ساعت پس از القا (۳۷ °C)، ۷) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۱۶ ساعت پس از القا (۲۵ °C)، ۸) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۱۶ ساعت پس از القا (۳۰ °C)، ۹) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۱۶ ساعت پس از القا (۳۷ °C)

بحث

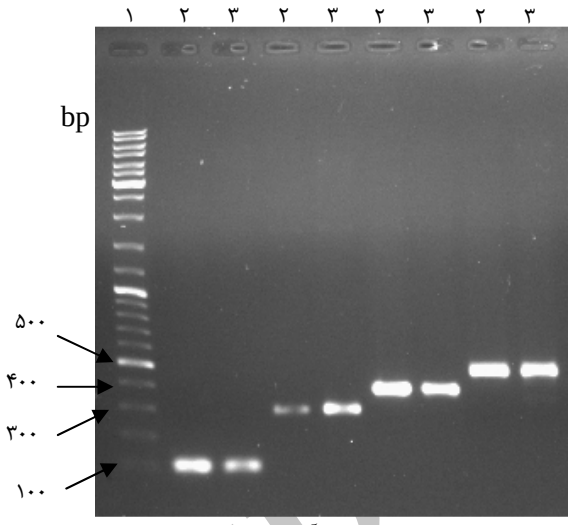
با توجه به این که در اکثر موارد، ویژگی‌های ساختاری و فعالیت پروتئین‌های نوترکیب، مشابه انواع طبیعی آن‌ها است، تولید پروتئین با کمک تکنولوژی DNA نوترکیب، کاری مقرون به صرفه است (۱۹). در خصوص باکتری P.furiosus که در شرایط ویژه‌ای از قبیل دمای بالا، محیط بی‌هوازی و گوگرد زیاد رشد می‌کند، تولید پروتئین‌های داخلی این میکروارگانیسم مثل DNA پلیمراز در سیستم‌های بیانی دیگر از استخراج مستقیم این پروتئین از خود میکروارگانیسم به صرفه‌تر است (۲۱-۲۰).

در میان انواع میزبان‌های بیانی مختلف اعم از پروکاریوت و یوکاریوت، سیستم‌های باکتریایی به علت رشد سریع و مقرون به صرفه بودن، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۲). از میان گونه‌های مختلف باکتریایی، باکتری E.coli به دلیل ژنتیک شناخته شده، ایجاد غلظت‌های بالای پروتئین، وجود سویه‌های فراوان و ناقل‌های مختلف در کلونینگ و بیان، اولویت اول را دارد (۲۳).



شکل ۶. تخلیص پروتئین بیان شده ۱) BL۲۱(DE۳) (به عنوان نمونه‌ی فاقد پلاسمید نوترکیب و کنترل منفی باکتری)، ۲) مارکر وزن مولکولی پروتئین (Fermentas#SM۰۴۳۱)، ۳) نمونه‌ی القا نشده BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب، به عنوان نمونه‌ی دارای پلاسمید و کنترل منفی نبود ماده‌ی القا کننده]، ۴) نمونه‌ی القا شده [BL۲۱(DE۳) حاوی پلاسمید نوترکیب] با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مولار IPTG ۳ ساعت پس از القا (۳۷ °C)، ۵) حاصل تخلیص

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۷. آزمایش فعالیت
۱) Gene ruler DNA ladder mix (Fermentas#SM۰۳۳۲)، ۲) محصول PCR با آنزیم تجاری، ۳) محصول PCR با آنزیم استخراج شده

در یکی از مطالعات قبلی ژن کد کننده‌ی این آنزیم در سیستم باکولوویروس کلون و پلیمراز حاصل از محیط کشت حشره جدا گردیده است (۱۷). مزیت سلول حشره بر E.coli، دارا بودن سیستم‌های آنزیمی لازم جهت انجام اصلاحات پس از ترجمه روی پروتئین تولید شده می‌باشد؛ اما استفاده از این سیستم، به جهت گران قیمت بودن مقرون به صرفه نیست (۲۴).

عوامل مختلفی از قبیل پلاسمید حاوی ژن کد کننده‌ی پروتئین، قدرت پروموتور نسخه‌برداری، غلظت ماده‌ی القا کننده، مدت زمان و دمای انکوباسیون و نوع محیط کشت، در میزان تولید یک پروتئین نوترکیب اثر گذارند. با تغییر در این شرایط، می‌توان میزان تولید پروتئین نوترکیب را تغییر داد (۲۵-۲۶).

ناقل بیانی pET-۱۵b استفاده شده در این مطالعه، با دارا بودن راه انداز (Promoter) بسیار قوی TV و تنظیم کننده‌ی (Operator) Lac که قابل القا با IPTG می‌باشد، یک سیستم قوی جهت کلونینگ و بیان ژن است (۲۷). باکتری BL۲۱(DE۳) نیز میزبان تراریخته‌ای است که در ژنوم آن قطعه‌ای محتوی توالی کد کننده‌ی RNA پلیمراز TV تحت کنترل راه‌انداز و تنظیم کننده‌ی Lac UV۵ قرار داده شده است (۲۸).

در این مطالعه، به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب DNA پلیمراز Pfu چندین متغیر از مجموعه‌ی عوامل مؤثر بر میزان تولید پروتئین تغییر داده شد و در بررسی هر عامل، نتایج حاصل در ارزیابی عامل دیگر نیز در نظر گرفته شد.

اولین متغیر، غلظت ماده‌ی القاگر بود. حضور القا کننده‌ها در محیط و غلظت آن‌ها تأثیر غیر قابل انکاری بر میزان تولید پروتئین دارد. در این مطالعه، با افزایش غلظت IPTG از ۰/۲۵ mM تا ۰/۷۵ mM، میزان بیان افزایش داشت. غلظت‌های بالاتر به افزایش بیان منجر نشدند و علت این امر، می‌تواند ناشی از القا و اشباع شدن پروموتورهای ناقل باشد.

در خصوص دو عامل مدت زمان القا و دمای رشد، شرایط بهینه در ۳ ساعت انکوباسیون بعد از القا در دمای ۳۷ °C انتخاب گردید. در دماهای ۲۵ °C و ۳۰، با گذشت ۳ ساعت میزان رشد کم و بیان به صورت محسوس مشاهده نشد؛ در صورتی که در نمونه‌هایی که در این دو دما کشت شبانه (Over night) شدند، هم میزان رشد افزایش یافت و هم بیان مشاهده شد. بیان به صورت طولانی مدت و شبانه در ۳۷ °C نتایجی مشابه با بیان به مدت ۳ ساعت در ۳۷ °C را داشت. باید به این نکته توجه داشت که در صورت ادامه‌ی زمان کشت باکتری‌ها در ۳۷ °C، میزان وزن سلولی افزایش می‌یابد؛ اما به دلیل این که باکتری‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

کم‌کم فاز ثابت (Stationary phase) خود را پشت سر می‌گذارند و به فاز مرگ (Death phase) نزدیک می‌شوند، جهت بیان‌های طولانی مدت و به صورت شبانه (Over night) دماهای پایین‌تر از قبیل ۲۵ °C و ۳۰ توصیه می‌شود که در این حالت، میزان لیز سلولی و اثر پروتئازها افزایش می‌یابد و در پی آن، مقدار زیادی از پروتئین‌های درون سلولی در مرحله‌ی سانتریفوژ در حین مراحل استخراج به دلیل لیز باکتری و خروج از سلول از بین می‌روند.

استفاده از کلونی‌های تازه ترانسفورم شده، تأثیر بسیاری در افزایش میزان پروتئین دارد؛ به طوری که مقدار پروتئین تولید شده از یک کشت ثانویه نسبت به حالتی که از کشت تازه ترانسفورم شده استفاده شود، کمتر است (۲۹، ۵). در طی این پژوهش نیز به طور تجربی مشاهده شد که میزان پروتئین تولید شده به هنگام استفاده از سلول‌های تازه ترانسفورم شده، نسبت به حالتی که از استوک فریز شده استفاده می‌شود، بیشتر است.

در این پژوهش، ضمن ایجاد شرایط بهینه برای تولید آنزیم Pfu، روشی ساده (بر مبنای روش Desai) جهت استخراج این پروتئین به کار گرفته شد (۳۰). در سایر مطالعات قبلی، جهت تخلیص آنزیم Pfu از ستون‌های خالص‌سازی مختلف استفاده شده است (۳۱، ۱۸، ۱۳). با این وجود، روش Desai به دلیل سادگی و نداشتن مکانیسم و وسایل پیچیده از جمله ستون‌های خالص‌سازی، ارزان قیمت و مقرون به صرفه است. یکی از مهم‌ترین مراحل خالص‌سازی پروتئین، لیز سلول‌های هدف است. در میان روش‌های مختلف لیز سلولی، استفاده از لیزوزیم (لیز آنزیمی) دناتوراسیون پروتئین‌ها را به حداقل می‌رساند (۳۳-۳۲).

به دلیل پایداری حرارتی آنزیم Pfu، می‌توان با انکوباسیون نمونه در دمای ۷۵ °C سایر پروتئین‌های مداخله کننده‌ی E.coli را دناتوره کرد. استفاده از نمک آمونیوم سولفات در غلظت‌های بالا، مولکول‌های آب را از دسترس پروتئین خارج می‌نماید. این امر، موجب کاهش حلالیت پروتئین و در نتیجه رسوب آن می‌شود. اساس این روش Salting out می‌باشد (۳۳). در آخرین مرحله‌ی استخراج جهت حذف نمک و ناخالصی‌ها از دیالیز استفاده می‌شود. در نهایت، این مطالعه امکان تولید یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت و با دقت بالا را توسط روشی ارزان و مقرون به صرفه فراهم نمود. DNA پلیمراز تخلیص شده، فعالیتی مشابه با نمونه‌ی تجاری داشت.

تشکر و قدردانی

هزینه‌ی اجرای این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردید. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان در انجام این طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

References

1. Arezi B, Xing W, Sorge JA, Hogrefe HH. Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. Anal Biochem 2003; 321(2): 226-35.
2. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresour Technol 2003; 89(1): 17-34.
3. Shekatkar S, Harish BN, Parija SC. Diagnosis

Archive of SID
www.SID.ir

of Leptospirosis by Polymerase. Chain Reaction. International Journal of Pharma and Bio Sciences 2010; 1(3): 1-6.
4. Hashimoto H, Nishioka M, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T, Inoue T, et al. Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon Pyrococcus kodakaraensis KOD1. J Mol Biol 2001; 306(3): 469-77.
5. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY: Cold Spring Harbor laboratory Press; 2001.
6. Kim DJ, Jang HJ, Pyun YR, Kim YS. Cloning, expression, and characterization of thermostable DNA polymerase from Thermoanaerobacter yonseiensis. J Biochem Mol Biol 2002; 35(3): 320-9.
7. Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M, Vander Horn PB. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. Nucleic Acids Res 2004; 32(3): 1197-207.
8. Dietrich J, Schmitt P, Zieger M, Preve B, Rolland JL, Chaabihi H, et al. PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from Pyrococcus abyssi. FEMS Microbiol Lett 2002; 217(1): 89-94.
9. Korolev S, Nayal M, Barnes WM, Cera ED, Waksman G. Crystal structure of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I at 2.5-A resolution: structural basis for thermostability. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(20): 9264-8.
10. Ho DL, Byrnes WM, Ma WP, Shi Y, Callaway DJ, Bu Z. Structure-specific DNA-induced conformational changes in Taq polymerase revealed by small angle neutron scattering. J Biol Chem 2004; 279(37): 39146-54.
11. McPherson MJ, McPherson SG. PCR. 1st ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 2000.
12. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. J Biol Chem 1989; 264(11): 6427-37.
13. Kim SW, Kim DU, Kim JK, Kang LW, Cho HS. Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from Pyrococcus furiosus. Int J Biol Macromol 2008; 42(4): 356-61.
14. Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from Pyrococcus furiosus. Gene 1991; 108(1): 1-6.
15. Griffiths K, Nayak S, Park K, Mandelman D, Modrell B, Lee J, et al. New high fidelity polymerases from Thermococcus species. Protein Expr Purif 2007; 52(1): 19-30.
16. Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. Nucleic Acids Res 1996; 24(18): 3546-51.
17. Mroczkowski BS, Huvar A, Lernhardt W, Misono K, Nielson K, Scott B. Secretion of thermostable DNA polymerase using a novel baculovirus vector. J Biol Chem 1994; 269(18): 13522-8.
18. Lu C, Erickson HP. Expression in Escherichia coli of the thermostable DNA polymerase from Pyrococcus furiosus. Protein Expr Purif 1997; 11(2): 179-84.
19. Turner P, Mamo G, Karlsson EN. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microb Cell Fact 2007; 6: 9.
20. Komori K, Ishino Y. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'-->5' exonucleolytic activities in Pyrococcus furiosus DNA polymerase I. Protein Eng 2000; 13(1): 41-7.
21. Schut GJ, Brehm SD, Datta S, Adams MW. Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: Pyrococcus furiosus grown on carbohydrates or peptides. J Bacteriol 2003; 185(13): 3935-47.
22. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 72(2): 211-22.
23. Baneyx F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(5): 411-21.
24. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nat Biotechnol 2005; 23(5): 567-75.
25. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol 2005; 115(2): 113-28.
26. Schumann W, Ferreira LCS. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. Genet Mol Biol 2004; 27(3): 442-53.
27. Kilikian BV, Suárez ID, Liria CW, Gombert AK. Process strategies to improve heterologous protein production in Escherichia coli under lactose or IPTG induction. Process Biochemistry 2000; 35(9): 1019-25.
28. Makino T, Skretas G, Georgiou G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. Microb Cell Fact 2011; 10: 32.
29. Pan SH, Malcolm BA. Reduced background expression and improved plasmid stability with

Archive of SID
www.SID.ir

pET vectors in BL21 (DE3). Biotechniques 2000; 29(6): 1234-8.
30. Desai UJ, Pfaffle PK. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. Biotechniques 1995; 19(5): 780-2, 784.
31. Dabrowski S, Kur J. Cloning and expression in Escherichia coli of the recombinant his-tagged DNA polymerases from Pyrococcus furiosus and Pyrococcus woesei. Protein Expr Purif 1998; 14(1): 131-8.
32. Kim Y, Babnigg G, Jedrzejczak R, Eschenfeldt WH, Li H, Maltseva N, et al. High-throughput protein purification and quality assessment for crystallization. Methods 2011; 55(1): 12-28.
33. Cutler P. Protein Purification Protocols. New Mexico, US: Springer; 2004.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Received: 10.06.2013

Vol. 31, No. 251, 1st Week, Novemberr 2013 Accepted: 02.09.2013

Expression and Purification of *Pfu* DNA Polymerase Belonging to the B Family Polymerase

Zahra Khalili-Boroujeni[1], Daryoush Abedi PhD[2], Mahdi Abbasian Msc[3], Mohammad-Reza Mofid PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: DNA polymerases are enzymes directing the synthesis of DNA molecules from deoxyribonucleotides. They are essential tools for molecular biology. *Pfu* DNA polymerase was initially isolated from *Pyrococcus furiosus*, anaerobic hyperthermophilic archaeon lived in geothermally heated marine sediments with temperatures between 90°C and 100°C. This enzyme possesses 3´ to 5´ exonucleotic activity; so that makes correcting the errors made in DNA replication.

Methods: In this research, the DNA fragment encoding *Pfu* DNA polymerase was cloned in to pET-15b expression vector. Then, by changing expression conditions such as isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration, and time and temperature of the induction, the expression of this enzyme was optimized. Finally, *Pfu* DNA polymerase was produced in large scale in optimized conditions and purified with simple method. Then, purified enzyme was used in polymerase chain reaction (PCR) for evaluating the activity.

Findings: Transformation of recombinant vector produced some colonies that most of them have the plasmid. The expression of *Pfu* DNA polymerase resulted in a bond approximately 90 kDa in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Maximum amount of protein production was observed in IPTG concentration of 0.75 mM, at 37°C, 3 hours incubation.

Conclusion: Protein purification with using the method based on Desai protocol caused a product that had the activity like commercial one in PCR reaction.

Keywords: DNA-dependent DNA polymerase, Polymerase chain reaction (PCR), Cloning, pET-15b

Citation: Khalili-Boroujeni Z, Abedi D, Abbasian M, Mofid MR. **Expression and Purification of *Pfu* DNA Polymerase Belonging to the B Family Polymerase.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(251): 1392-404

Archive of SID

* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 389369 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- PharmD Student, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Department of Agricultural Biotechnology, School of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Biochemistry AND Bioinformatics Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammad-Reza Mofid PhD, Email: mofid@pharm.mui.ac.ir

www.SID.ir