

Optimization of Sea Anemone Toxin (fragaceatoxin C) Expression in *E.coli* BL21

Babak Abdi¹,
Rashid Jamei²,
Mehdi Imani³

¹ MSc Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

² Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

³ Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

(Received May 3, 2015 Accepted September 28, 2015)

Abstract

Background and purpose: Sea anemones of the genus *Actinia* are commonly found in the intertidal zone of the northern rocky coast of Spain. *Actinia fragacea* is one of the most important species that secretes a toxic protein, fragaceatoxin C (FraC), for defense and hunting purposes. The aim of this study was transformation of plasmid containing the gene encoding the FraC to *Escherichia coli* bacterial strain BL21, and identifying optimum expression condition.

Materials and methods: In this experimental study, chemical transformation was conducted by washing the bacteria with cold calcium chloride to take up the plasmid containing the FraC gene. To ensure the transformation of plasmids, bacteria were grown on a medium containing an appropriate antibiotic (ampicilin). For greater certainty, the minipreparation of transformed plasmids was done using GF-1 plasmid extraction Kit. The plasmids were then went under digestion check using *Nco*I and *Hind* III enzymes and PCR check. After confirming the presence of a plasmid containing FraC in the host bacteria, the bacteria were induced by 1mM IPTG in different times at 20 °C to find the optimum expression conditions. After collecting bacteria expressing FraC at different times, its expression was visualized on Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE).

Results: Our results showed that the plasmid containing the FraC was successfully transformed. Also SDS-PAGE results indicated that the FraC was successfully expressed at times of 6 and 8 h using 1mM IPTG at 20 °C.

Conclusion: According to the results, both steps of chemical transformation had significantly influenced the transformation efficiency. Following the principles and selecting optimum temperature could help us in finding the optimum conditions for expression of each specific protein in bacteria.

Keywords: Sea Anemones, Fragaceatoxin C, transformation, expression, *E.coli*

بهینه‌سازی بیان سم شقایق دریایی [فراگاسیاتوکسین C] در باکتری *E. coli* سویه BL21

بابک عبدی^۱
رشید جامعی^۲
مهدی ایمانی^۳

چکیده

سابقه و هدف: شقایق دریایی از جنس اکتینیا در مناطق جزری سواحل صخره‌ای شمال اسپانیا بسیار متداول است. اکتینیا فراگاسیا یکی از گونه‌های مهم است که پروتئین سمی فراگاسیاتوکسین C را جهت دفاع و شکار ترشح می‌کند. هدف اصلی از این مطالعه، انتقال پلاسمید حاوی ژن کدکننده فراگاسیاتوکسین C به اشیرشیاکلی سویه BL21، بیان و یافتن شرایط مطلوب بیان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برای انتقال شیمیایی، باکتری‌ها جهت جذب پلاسمید حاوی ژن FraC به‌وسیله کلسیم کلراید سرد شسته و جهت اطمینان از انتقال پلاسمیدها، باکتری‌ها روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب (آمپی‌سیلین) کشت داده شدند. برای اطمینان بیش‌تر، استخراج پلاسمیدها در حجم کم با استفاده از کیت استخراج پلاسمید GF-1 صورت گرفت. سپس تحت برش آنزیم‌های NcoI و Hind III و هم‌چنین کنترل PCR قرار گرفتند. بعد از تأیید حضور پلاسمید حاوی ژن FraC در باکتری میزبان، باکتری‌ها جهت یافتن شرایط مطلوب بیان پروتئین FraC توسط IPTG 1mM در زمان‌های مختلف و دمای ۲۰°C القا شدند. پس از جمع‌آوری باکتری‌های بیان‌کننده FraC در زمان‌های مختلف، بیان آن‌ها روی ژل سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) مشهود بود.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که پلاسمید حاوی ژن FraC با موفقیت انتقال یافت. هم‌چنین نتایج SDS-PAGE نشان داد که FraC در زمان‌های ۶ و ۸ ساعت با استفاده از IPTG 1mM در دمای ۲۰°C بیش‌ترین بیان را دارند. **استنتاج:** با توجه به نتایج، هر دو مرحله انتقال شیمیایی تأثیر قابل توجهی در کارایی انتقال دارند. رعایت اصول و دمای مطلوب می‌تواند ما را در یافتن شرایط مطلوب برای بیان هر پروتئین خاص در باکتری‌ها یاری کند.

واژه‌های کلیدی: شقایق دریایی، فراگاسیا توکسین C، انتقال، بیان، اشیرشیاکلی

مقدمه

سبب القای آسیب در سلول‌های هدف می‌گردند. این منافذ غیرانتخابی سبب نقص در دیواره سلولی، عدم تعادل یونی یا جریان کنترل نشده یونی و نفوذپذیری نسبت به انواع

یکپارچگی غشای پلاسمایی برای عملکرد و ثبات سلول‌های زنده ضروری است. بسیاری از پاتوژن‌ها از طریق ایجاد منافذ غشایی به‌وسیله پروتئین‌های سمی

E-mail: m.imani@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: مهدی ایمانی - ارومیه: کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. دانشیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار بیوشیمی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۲/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۶

مولکول‌ها می‌شوند (۱). بنابراین، عملکرد این پروتئین‌های تشکیل‌دهنده منفذ منجر به اختلال در تمامیت غشا و مرگ سلول می‌گردند (۲). سم‌های تشکیل‌دهنده منفذ^۱ در طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، حشرات، بی‌مهرگان دریایی، خزندگان سمی و پستانداران برای مقاصد مختلف از جمله دفاع، حمله و پیام‌رسانی تولید می‌شوند (۳). PFTs به‌طور کلی به‌صورت مونومرهای محلول ترشح شده و به سمت غشای سلول هدف منتشر می‌شوند. PFTs معمولاً بر اساس انواع عناصر ساختار دوم برای عبور از دو لایه لیپیدی پس از شکل‌گیری منفذ طبقه‌بندی می‌شوند (۴). از این رو، این سم‌ها معمولاً به دو دسته تقسیم شده‌اند: α -PFTs و β -PFTs. ساختار چند PFTs در حالت محلول در آب شناسایی شده است. در حالی که تعداد کمی از ساختارهای الیگومری محلول هستند (۵). یکی از نمایندگان α -PFTs یک خانواده از سم‌های یوکاریوتی است که به آن‌ها اکتینوپورین‌ها یا سیتولیزین‌ها گفته می‌شود (۷،۶). شقایق دریایی^۲ از جنس اکتینیا^۳ در مناطق جزری سواحل صخره‌ای شمال اسپانیا رو به دریای کانتابری^۴ و خلیج بیسکی فراوان است. اکتینیا اکوینا^۵ یکی از فراوان‌ترین گونه‌ها است و درجه بالایی از پلی‌مورفیسم را نشان می‌دهد: در نمونه‌هایی به‌صورت سبزرنگ، قهوه‌ای، راه‌راه یا خال‌خال قرمز می‌توانند دیده شوند. یکی از گونه‌های مهم دیگر اکتینیا فراگاسیا^۶ می‌باشد (۸). اکتینیا فراگاسیا به دلیل لکه‌های زرد یا سبز روی ستون‌های قرمز به‌عنوان توت‌فرنگی^۷ یا شقایق شناخته شده است. در مقایسه با اکتینیا اکوینا، اکتینیا فراگاسیا تا ۱۰ سانتی‌متر بزرگ‌تر است (۹). شقایق دریایی دونوع پروتئین سمی تولید می‌کند: نورو توکسین‌ها، با عملکرد در کانال‌های یونی (۱۰) و سیتولیزین‌ها یا اکتینوپورین‌ها، با فعالیت لیزکنندگی در انواع سلول‌ها (۱۱، ۱۲). اکتینوپورین‌هایی که توسط شقایق

دریایی تولید می‌شود، سم‌های سیتولیتیک بسیار قوی هستند که در هر دو عملکرد شکار و دفاع نقش دارند (۱۳). اکویناتوکسین^۸ که توسط اکتینیا اکوینا ترشح می‌شود نیز عضو این خانواده است که ساختار سه‌بعدی محلول آن به‌وسیله کریستالوگرافی X-ray تعیین شده است (۱۴). اکتینوپورین شقایق دریایی جز α -PFT است. در سم FraC هر مونومر شامل یک هسته ساندویچی بتای تشکیل شده از ۱۰ رشته بتا می‌باشد که به‌وسیله ۳ مارپیچ آلفا احاطه گردیده است. پایانه N، فراگاسیاتوکسین به یک هسته بتا متصل شده است. این هسته شامل یک رشته کوتاه بتا، یک دور مارپیچ ۳۱۰ و مارپیچ آلفا کوتاه می‌باشد. نه عدد مونومر به‌وسیله پایانه N خود در داخل غشا قرار گرفته و ساختار تاجی شکلی را ایجاد می‌کنند. در ارتباط بین پایانه N با این هسته سه نوع تعاملات درون مولکولی دخیل می‌باشند: ۱- پل نمکی بین Asp10 و Lys69 واقع شده در انتهای مارپیچ α_1 ۲- تعاملات آب‌گریز بین زنجیره جانبی باقی‌مانده‌های Val8,14,19 و lue19,23,26 ۳- پیوند هیدروژنی در پایانه C مارپیچ α_1 بین Lys23 و Gly27 (۱۵) (تصویر شماره ۱). این منافذ کاربردهای بالقوه پزشکی در درمان سرطان، شناسایی و نفوذپذیری غشاهای زیستی (۱۶، ۱۷) و فناوری بیوسنسور دارند. زمانی که سم‌های تشکیل‌دهنده منفذ با مولکول‌های هدف قراردهنده^۹ مناسب ترکیب شوند، می‌توانند به‌عنوان داروهای ضد توموری بسیار قدرتمند مورد استفاده قرار گیرند. ایمونوتوکسین‌ها و میتوتوکسین‌ها مولکول‌های کایمیریکی هستند که در آن‌ها لیگاندهای اختصاصی به سم‌ها متصل می‌شوند. اگر بخش لیگاند برای سلول توموری اختصاصی باشد، سم‌های کایمیریک می‌توانند به‌طور انتخابی این سلول‌ها را بکشند (۱۸).

هدف اصلی از این مطالعه انتقال پلاسمید pBAT حاوی ژن کدکننده پروتئین فراگاسیاتوکسین C و فراهم کردن شرایط مطلوب جهت بیان این پروتئین در

- 1- Pore-forming toxins or PFTs
- 2- Sea anemone
- 3- Actinia
- 4- Cantabrian
- 5- *A. equina*
- 6- *A. fragacea*
- 7- Strawberry

8- Equinatoxin-II
9- Targeting molecule

باکتری اشیرشیاکلی سویه BL21 با استفاده از تکنیک‌های معمول آزمایشگاهی می‌باشد.

ابگم^۷ بکاکس^۸ تولید ab116027.

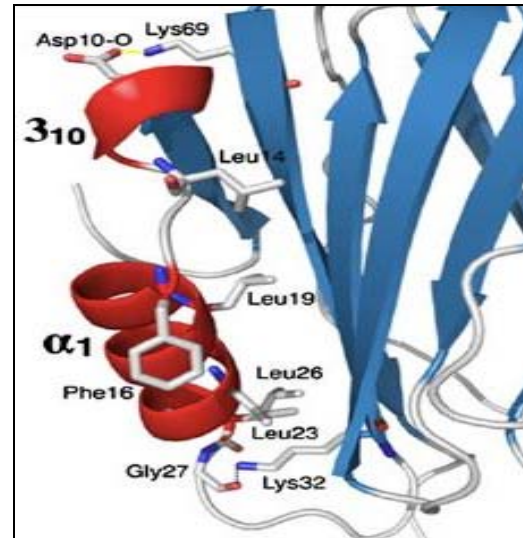
کشت باکتری

یک کلونی از باکتری اشیرشیاکلی BL21 را در دمای ۳۷°C و دور ۱۶۰rpm به مدت یک شب در ۱۰cc محیط کشت اولیه^۸ LB در انکوباتور شیکردار تلقیح شد. سپس ۱cc از محیط کشت اولیه به ۱۰۰cc محیط LB جدید (۱ به ۱۰۰) اضافه گردید. رشد باکتری‌ها با همان شرایط دمایی و دور چرخش به مدت ۴-۵ ساعت ادامه پیدا کرد. محیط کشت حاوی باکتری تا رسیدن به جذب نوری ۰/۷-۰/۵ در طول موج ۶۰۰nm، در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. در این بازه جذبی، باکتری‌ها در اوایل مرحله رشد لگاریتمی هستند. این مرحله بهترین زمان برای مستعد کردن باکتری‌ها است.

تهیه باکتری‌های مستعد^۹

محیط حاوی باکتری در دمای ۴°C با دور ۱۶۰rpm به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب باکتریایی دو بار با کلسیم کلراید سرد ۱۰۰mM شسته شد و هر بار به مدت ۲-۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی، برای بار سوم رسوب با کلسیم کلراید سرد مخلوط و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۰°C درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام زمان انکوبه کردن، محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴°C و با دور ۱۶۰rpm سانتریفیوژ شده و بعد از حذف مایع رویی، شناور کردن باکتری‌ها در کلسیم کلراید و گلیسرول ۱۵ درصد صورت گرفت. جهت اطمینان از زنده ماندن باکتری‌ها، آن‌ها روی محیط LB جامد بدون آمپی‌سیلین کشت داده شدند.

انتقال پلاسمید



تصویر شماره ۱: باقی مانده‌هایی که پایانه N را به هسته بتای سانندویچی متصل نگه می‌دارند.

مواد و روش‌ها

مواد

باکتری اشیرشیاکلی سویه BL21 خریداری شده از مرکز تحقیقات پاستور تهران، مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت^۱ LB (تریپتون، عصاره مخمر، NaCl) خریداری شده از شرکت شارلو^۲ انگلستان، مورد نیاز جهت تهیه ژل سدیم دودسیل سولفات پلی‌آکریل آمید^۳ (آکریل آمید، بیس آکریل آمید، APS^۴، TEMED^۴، تریس) از شرکت شارلو انگلستان، انگلستان، آنزیم‌های محدودکننده NcoI و HindIII از شرکت سیگما آمریکا، IPTG^۶ محصول شرکت فرمتاز فرمتاز جهت القای بیان و مارکر پروتئین از شرکت

1- Luria-Bertani
2- scharlo
3- Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
4- N,N,N',N'-Tetramethyl ethylene diamine
5- Ammonium persulfate
6- Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

7- Abcam
8- Pri-culture
9- Competent

ژن ۵۴۰ نوکلئوتیدی FraC بین جایگاه برش آنزیم‌های محدودالایر NcoI و Hind III در پلاسمید pBAT4 قبلاً کلون شده است. اطمینان از حضور ژن FraC در پلاسمید ضروری می‌باشد. به این منظور واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۳ توسط پرایمرهای مناسب از روی ژن الگو انجام شد و محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری گردید. پرایمرهای اختصاصی پیشرو و معکوس توسط نرم‌افزار (جین رانر)^۴ طراحی و توسط شرکت بیونیر کره جنوبی سنتز شد.

استخراج و برش پلاسمید

برای اطمینان بیش‌تر پلاسمیدهای منتقل شده، در مقدار کم استخراج^۵ شدند. این عمل با استفاده از روش لیز قلیایی توسط کیت استخراج پلاسمید GF-1، با هدف لیز کردن باکتری‌ها و استخراج پلاسمید صورت گرفت. برای اطمینان از حضور ژن کد کننده پروتئین فراگاسیاتوکسین C در داخل پلاسمید pBAT این پلاسمید توسط آنزیم‌های محدودکننده NcoI و HindIII برش داده شد.^۶ برای برش، در دو میکروتیوب میکروتیوب (هر کدام ۱۶ میکرولیتر) پلاسمید استخراج شده، ریخته شد. میکروتیوب اول را با ۲ میکرولیتر آنزیم NcoI و میکروتیوب دوم را با ۲ میکرولیتر آنزیم HindIII مخلوط کردیم. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه و پلاسمیدهای برش داده شده و استخراجی جهت رؤیت روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند. ظاهرسازی مولکول‌های DNA توسط اتیدیوم بروماید انجام گرفت. به دلیل حضور این ماده، مولکول‌های اسیدنوکلئیک در برابر تابش نور UV خاصیت فلورسانسی پیدا خواهند کرد. اندازه‌گیری غلظت پلاسمید، با قرائت جذب

برای انتقال ژن FraC از پلاسمید بیانی pBAT استفاده شد. این پلاسمید دارای ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین است. انتقال پلاسمید حاوی ژن کدکننده فراگاسیاتوکسین C به باکتری تکثیر شایع BL21 با روش شوک حرارتی صورت گرفت. ۰/۱ نانوگرم (۲ میکرولیتر با غلظت ۰/۰۵ نانوگرم بر میکرولیتر) از پلاسمید حاوی ژن FraC به میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر باکتری اشیرشیا کلی BL21 مستعد افزوده شد. میکروتیوب حاوی باکتری‌های مستعد و پلاسمید را به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۰°C قرار دادیم. به منظور ایجاد شوک حرارتی، انکوبه کردن باکتری‌ها به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴۲°C صورت گرفت. جهت رشد بهتر باکتری‌های ترانسفورم شده، ۱cc محیط مغذی^۱ SOC به میکروتیوب میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. سپس محتوای میکروتیوب به مدت ۳ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ و رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر از محیط SOC معلق گردید. جهت اطمینان از انتقال پلاسمید ۵۰ میکرولیتر از باکتری‌ها، به وسیله بخش‌کننده شیشه‌ای روی پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند. کنترل‌های مثبت و منفی نیز اعمال گردید.

محاسبه کارایی انتقال

کارایی انتقال بر اساس روش ژایمینگ توو و همکاران (۲۰۰۵) به وسیله فرمول‌های زیر محاسبه شد (۱۹).
تعداد کلنی‌های منتقل شده (CFU)^۲ = تعداد کلنی‌های باکتریایی × میزان رقت × میزان حجم مخلوط منتقل سازی | حجم پلیت
کارایی انتقال = تعداد کلنی‌های منتقل شده (CFU) | غلظت پلاسمید مورد استفاده بر حسب میکروگرم

حضور ژن در پلاسمید

3- Polymerase chain reaction (PCR)
4- Gene runner
5- Miniprep
6- Monodigest

1- Super Optimal Broth with catabolite repression
2- Colony forming units

محلول پلاسمیدی در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible انجام شد.

بیان^۱

در این مرحله یک کلنی از باکتری (باکتری‌هایی که پلاسمید به آن‌ها منتقل شده است) در ۱۰۰cc محیط کشت اولیه LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت یک‌شب در دمای ۳۷°C در انکوباتور شیکردار انکوبه گردید. سپس ۱cc از محیط کشت اولیه به ۱۰۰cc محیط LB جدید حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه و تا رسیدن به جذب نوری ۰/۵-۰/۷ در طول موج ۶۰۰nm در دمای ۳۷°C و دور ۱۶۰rpm انکوبه شد. بعد از رسیدن به کدورت مطلوب، ۱۰cc از محیط به عنوان نمونه بدون القا و شاهد برداشته شده و به باقی مانده محیط IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه گردید. بعد از اضافه کردن IPTG، دما را تا حد مطلوب (۲۰-۲۲°C) کاهش دادیم. در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت چندین ساعت بعد از القا فرایند بیان صورت گرفت.

لیز باکتری‌های حاوی پروتئین فراگاسیاتوکسین C

محلول باکتری‌های بیان‌کننده پروتئین مورد نظر در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و رسوبات باکتریایی در بافر لیز کننده^۲ (شامل 50mM HCL، 300mM NaCL، امیدازول ۱۰mM و PMSF 1mM) معلق گردید. محللول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰°C- انکوبه شد. قبل از لیز باکتری‌ها، جهت حفاظت از پروتئین^۳ DTT و EDTA با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار اضافه شد.

نهایتاً، بعد از ذوب محللول در حمام آب ۹۰°C، باکتری‌های بیان‌کننده توسط دستگاه سونیکاتور^۴ در ۳۰ چرخه ۱ دقیقه‌ای تحت لیز مکانیکی قرار گرفتند.

غلظت سنجی پروتئین

برای سنجش غلظت کل پروتئین موجود در محللول باکتریایی لیز شده، از روش سنجش پروتئین برادفورد^۵ استفاده شد. در این روش جهت رسم نمودار استاندارد در ۱۰ لوله آزمایش مقادیر ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ میکرولیتر از پروتئین استاندارد BSA^۶ با غلظت ۱mg/ml ریخته و حجم هر لوله را به وسیله آب دو بار تقطیر به ۱۰۰ میکرولیتر رساندیم. سپس به هر کدام از لوله‌ها ۲cc معرف برادفورد اضافه کردیم و بر اساس جذب نوری هر نمونه در طول موج ۵۹۵ نمودار استاندارد رسم گردید. بر اساس شیب نمودار استاندارد و جذب نمونه پروتئینی مورد نظر، غلظت مجهول به دست آورده شد.

بررسی بیان پروتئین

محیط حاوی باکتری لیز شده در دمای ۴°C و دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پروتئین‌های باکتریایی در مایع رویی شناور شده، اما اسیدهای نوکلئیک، لیپدها و بقایای باکتری‌های لیز شده رسوب می‌کنند. جهت مشاهده پروتئین بیان‌شده و مقایسه با الگو پروتئینی باکتری‌های القا نشده، مایع رویی روی ژل سدیم دود سیل سولفات پلی‌آکریل امید بارگذاری شد. برای یافتن شرایط مطلوب بیان پروتئین فراگاسیاتوکسین C، در زمان‌های ۲، ۳، ۴، ۶، ۸ و ۹ ساعت بعد از القا نمونه‌هایی جهت بارگذاری روی ژل برداشته شد. نهایتاً با مشاهده الگو باندها در مورد شرایط مطلوب بیان قضاوت به عمل آمد.

یافته‌ها

رشد باکتری‌های مستعد

پس از مستعد کردن باکتری‌های اشیرشیاکلی سوبه BL21 به وسیله کلسیم کلراید سرد، جهت اطمینان از زنده ماندن باکتری‌ها در طی فرایند مستعد کردن، آن‌ها را روی پلیت LB بدون آنتی‌بیوتیک رشد داده شدند. مشاهده

7- Expression
2- Lysis buffer
3- Dithiothreitol
4- Sonicator

5- Bradford assay
6- Bovine serum albumin

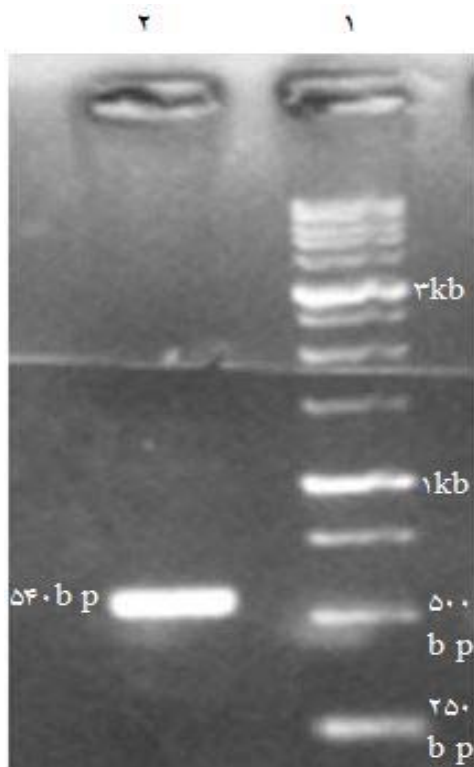
تأیید حضور ژن در پلاسمید

پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار جین رانر در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود.

جدول شماره ۱: پرایمرهای طراحی شده جهت PCR

پرایمر	توالی	آنزیم محدود کننده
پیشرو	GGAGGGATCCATGGCCGAT GTTGCAGGTG	BamHI NcoI
معکوس	GCGGAAGCTTAGCCTTGGTC ACGTGAATTCCAG	HindIII

محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد. نتایج یک باند ۵۴۰ نوکلئوتیدی را نشان داد. محصول واکنش که یک باند ۵۴۰ نوکلئوتیدی است، بر روی ژل آگارز ۱ درصد رؤیت شد. این باند تأیید کننده حضور ژن FraC در پلاسمید می‌باشد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR. چاهک ۱ ژن FraC با طول حدود ۵۴۰ نوکلئوتید را نشان می‌دهد و چاهک ۲ نردبان DNA Kb ۱ را نشان می‌دهد.

ژل آگارز

شد که باکتری‌ها زنده‌اند و بعد از انکوبه شدن پلیت در دمای ۳۷°C به مدت ۱۶ ساعت به راحتی رشد کردند.

تأیید انتقال

بعد از فرآیند انتقال پلاسمید pBAT به روش شوک حرارتی، برای تأیید صحت انتقال پلاسمید حاوی ژن FraC باکتری‌ها روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین رشد دادیم. باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید به دلیل ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین رشد کردند و کلنی تشکیل دادند. در این مرحله جهت اطمینان کنترل مثبت (باکتری‌هایی که پلاسمید pET28a حاوی ژن کد کننده اوریکاز را دریافت کرده‌اند) و کنترل منفی (آب جایگزین پلاسمید شده و به جای پلاسمید در میکروتیوب باکتری‌های مستعد ریخته شدند) قرار داده شد. باکتری‌های کنترل منفی روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین رشد نکردند. نشان‌دهنده این است که آنتی‌بیوتیک به خوبی عمل می‌کند. اما باکتری‌های کنترل مثبت روی پلیت حاوی کانامایسین رشد کردند (پلاسمید pET28a دارای ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است). رشد این باکتری‌ها ثابت کرد که در فرآیند انتقال مشکلی وجود نداشته و تمام مراحل صحیح بوده است. این کنترل جهت اطمینان از صحیح بودن مراحل انتقال و مستعد بودن باکتری‌ها اعمال شد.

کارایی انتقال

روی پلیت دارای آنتی‌بیوتیک حدوداً ۱۶۳ کلنی مشاهده شد. بنابراین طبق رابطه ژامینگ توو، تعداد کلنی‌های ترانسفورم شده این گونه محاسبه شد:

$$CFU_{326} = 1/50 \mu l \times 163 \times 10^4 = 326$$

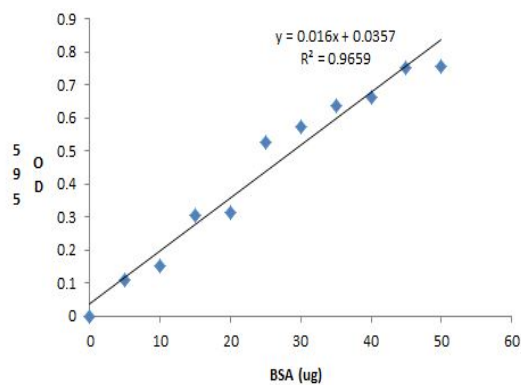
DNA پلاسمیدی اضافه شده به باکتری‌های مستعد شده ۲ میکرولیتر با غلظت ۰/۰۵ نانوگرم بر میکرولیتر بود، طبق این معلومات کارایی انتقال با فرمول زیر به دست آمد:

$$\mu g / CFU_{326} \times 10^4 = g / 10^{-4} \mu CFU_{326}$$

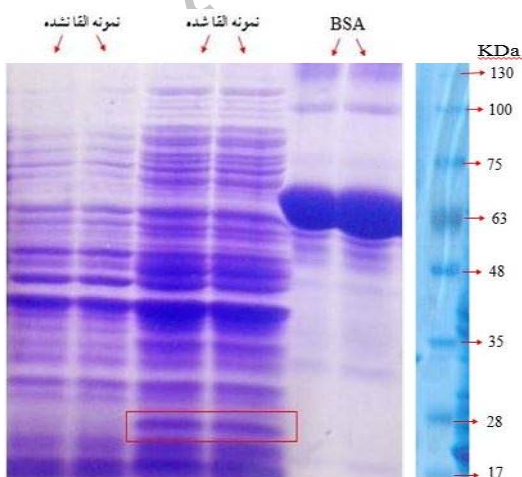
نمونه‌ها، غلظت کل پروتئین در نمونه‌های القا شده ۱/۰۶ mg/ml به دست آمد. این محاسبه با توجه به نمودار استاندارد و مقدار محلول پروتئینی برداشته شده برای بررسی جذب نوری انجام شد (نمودار شماره ۱).

ژل سدیم دود سیل سولفات پلی آکریل آمید

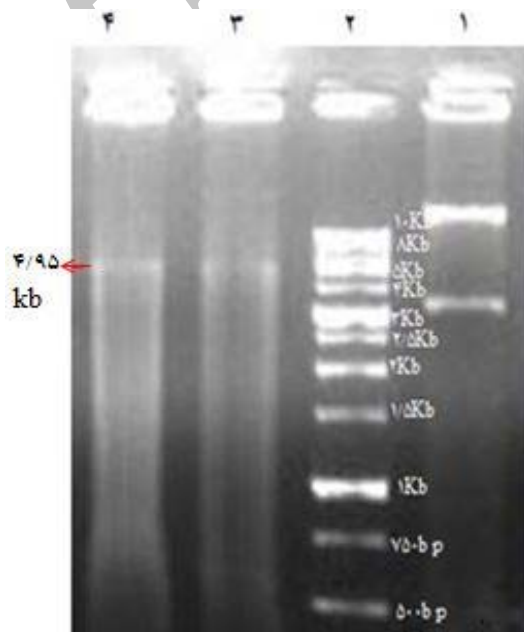
نتایج حاصل از بارگذاری نمونه‌ها روی SDS-PAGE بیان پروتئین موردنظر ما را با وزن مولکولی ۲۰ kDa نشان داد. باند موردنظر ما در برابر باند ۲۰ kDa لدر و پایین تر از تک باند BSA با وزن مولکولی ۶۶KDa مشهود است (تصویر شماره ۴). همان طور که مشاهده می‌شود، این باند در نمونه القا نشده، وجود ندارد. این امر تأیید کننده بیان فراگاسیاتوکسین در باکتری اشیرشیا کلی است.



نمودار شماره ۱: نمودار استاندارد جهت غلظت سنجی پروتئین به روش برادفورد.



ژن کد کننده پروتئین فراگاسیاتوکسین ۵۴۰ و پلاسمید pBAT، ۴۴۱۶ جفت باز طول دارند. نتایج حاصل از بارگذاری پلاسمیدهای استخراج شده و برش داده شده روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که انتقال پلاسمید به خوبی صورت گرفته است (تصویر شماره ۳). در چاهک ۱، باندهای مربوط به پلاسمیدهای استخراج شده در کونفورماسیون‌های مختلف مشهود بود. این باندها ثابت کردند که فرایند انتقال به درستی صورت گرفته است. در چاهک ۳ و ۴ مربوط به پلاسمید برش داده شده، یک باند ۴/۹۵ Kbp (ژن و پلاسمید که به دلیل برش با آنزیم‌های Hind III و NcoI به شکل خطی درآمده است)، در برابر باند مربوطه لدر مشاهده شد. این باند حضور ژن موردنظر در پلاسمید pBAT را ثابت کرد.



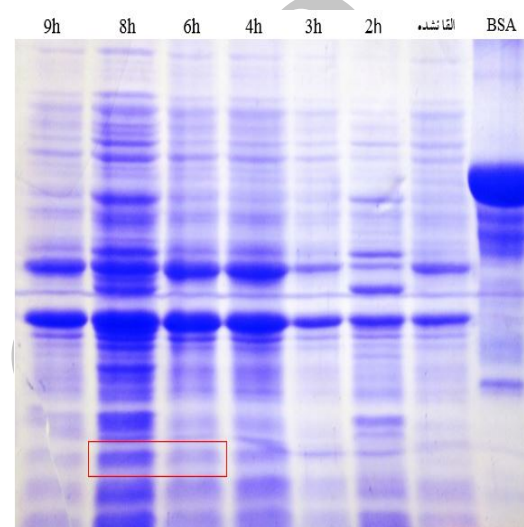
تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از بارگذاری ژل آگارز. چاهک ۱ پلاسمیدهای استخراج شده در کونفورماسیون‌های مختلف را نشان می‌دهد. در چاهک ۲ لدر ۱Kb به مقدار ۵ میکرولیتر بارگذاری شده است. چاهک ۳ پلاسمید حاوی ژن کد کننده فراگاسیاتوکسین C را نشان می‌دهد که به وسیله آنزیم Hind III برش داده شده است. چاهک ۴ نیز پلاسمید به وسیله آنزیم NcoI برش داده شده است

بعد از رسیدن محیط به کدورت مناسب القا توسط IPTG با موفقیت انجام شد. بعد از سونیکه کردن

دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین رشد داده شدند. این عمل جهت غربالگری باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید انجام گرفت. باکتری‌های دریافت کننده پلاسمید به دلیل حضور ژن مقاوم به آمپی‌سیلین در پلاسمید، روی این محیط رشد کرده و کلنی تشکیل دادند. جهت حصول اطمینان، پلاسمیدها با استفاده از روش لیز قلیایی استخراج شدند. پلاسمیدهای استخراج شده جهت اطمینان از حضور ژن موردنظر به وسیله آنزیم‌های محدودالثر مناسب برش داده و سپس پلاسمیدهای استخراجی و بریده شده، جهت مشاهده روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شدند. به دنبال انتقال پلاسمید به داخل باکتری، برای القا از IPTG با غلظت نهایی ۱mM استفاده شد. در فرایند بیان به باکتری‌ها کشت داده شده، IPTG اضافه شده و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار القا صورت گرفت. پس از جمع‌آوری باکتری‌های بیان‌کننده و لیز مکانیکی توسط دستگاه سونیکاتور، سنجش غلظت پروتئین به روش برادفورد با استفاده از منحنی استاندارد BSA صورت گرفت. نهایتاً مایع رویی محلول القا شده جهت مشاهده میزان تخلیص، روی SDS-PAGE بارگذاری شد. در این مطالعه باکتری‌ها به وسیله کلسیم کلراید بر اساس روش کوهن و همکاران (۱۹) و فرایند انتقال نیز با روش شوک حرارتی انجام شد. باکتری‌ها با سه روش می‌توانند DNA را از محیط دریافت کنند: کانژوگاسیون، ترانسفورماسیون و ترانسداکشن. تنها ترانسفورماسیون راهی برای دریافت مستقیم پلاسمید است. کانژوگاسیون نیازمند ارتباط سلول-سلول از طریق زوائد جنسی و ترانسداکشن نیازمند باکتریوفاژ واسط برای انتقال DNA از یک سلول به سلول‌های دیگر است. سلول‌ها در حضور کاتیون‌های دو ظرفیتی سرد مانند $CaCl_2$ و $MgCl_2$ نسبت به پلاسمید نفوذپذیر می‌شوند. این سلول‌ها جهت نفوذ DNA پلاسمیدی تحت شوک حرارتی قرار می‌گیرند (دمای $42^{\circ}C$ به مدت ۱۲۰-۶۰ ثانیه). این روش برای پلاسمیدهای حلقوی کاربرد دارد (۲۱).

تصویر شماره ۳: بیان پروتئین فراگاسیاتوکسین C. باند مشخص شده نشان دهنده بیان است (۲۰kDa). در دو چاهک حاوی نمونه القاشده، باندهایی با وزن مولکولی ۲۰kDa مشهود است. این باند در الگو باندهای اشیرشیاکلی وجود ندارد (نمونه‌های القا نشده). مارکر این شکل از ژل‌های کار شده قبلی گرفته شده است.

با توجه به تصویر شماره ۵ مشخص گردید که شرایط مطلوب برای بیان پروتئین فراگاسیاتوکسین C، ۶-۸ ساعت بعد از القا است. باند ۲۰ kDa موردنظر در چاهک‌های ۶ و ۸ ساعت بعد از القا غلظت مناسبی را نشان داد.



تصویر شماره ۴: بهینه‌سازی بیان پروتئین فراگاسیاتوکسین C. در ۶-۸ ساعت بعد از القا بیش‌ترین غلظت مشهود است. این باند در نمونه القا نشده وجود ندارد

بحث

سم‌های تشکیل دهنده منفذ، یکی از قوی‌ترین سلاح‌های بیولوژیکی طبیعت هستند. پایداری این سم‌ها در حالت محلول در آب یکی از ویژگی‌های قابل توجه این سم‌ها می‌باشد. به‌منظور تبدیل از حالت محلول در آب به حالت منافذ غشایی، این سم‌ها باید تحت تغییرات بزرگ کنفورماسیونی قرار گیرند (۲۰). در این مطالعه به‌منظور تکثیر پلاسمید pBAT حاوی ژن کد کننده پروتئین فراگاسیاتوکسین C، ۲ میکرولیتر از آن به روش انتقال شیمیایی به باکتری اشیرشیاکلی سویه BL21 انتقال یافت. باکتری‌های موردنظر روی محیط LB آگار

لاکتوز متصل شده و از اتصال آن به اپراتور Lac پلاسمید جلوگیری می‌کند. این عمل باعث می‌شود که RNA پلی‌مراز به پروموتور T-7 پلاسمید متصل شود و رونویسی ژن کلون شده در پلاسمید آغاز گردد. اتصالات ژنی از طریق تولید مولکول DNA نو ترکیب برای تسهیل و بیان ژن به کار رفته شده است. غالباً، پپتیدها با β -گالاکتوزیداز ترکیب شده، سپس به عنوان پروتئین متصل شده با استفاده از جایگاه اتصال ریبوزوم و شروع ترجمه ژن LacZ در اشریشیاکلی بیان می‌شوند (۲۵). سیستم‌های بیان باکتریایی برای تولید پروتئین‌های هتروولوگوس بسیار جذاب هستند. چون آن‌ها توانایی رشد سریع و تراکم بالا در بسترهای ارزان قیمت را دارند (۲۶).

به‌طور کلی پروتئین‌های بیان شده در سیتوپلاسم یا فضای پری‌پلاسمیک تجمع می‌یابند. سیتوپلاسم انتخاب اول برای تولید و بیان پروتئین است. چون عملکرد بالایی را موجب می‌شود (۲۷). پروموتورهای Lac برای تولید پروتئین‌های غشایی و یا محصولات بسیاری از ژن‌ها که برای سلول‌ها سمی هستند، مزیتی به شمار می‌آید (۲۸). Bellomio و همکاران (۲۰۰۹) کلونینگ و تخلیص این پروتئین را با روش مورد استفاده ما با موفقیت انجام دادند (۲۹).

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی صندوق حمایت از پژوهشگران کشور و معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه که بودجه و امکانات لازم برای این تحقیق را فراهم آوردند تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

Takahashi و همکاران (۱۹۹۲) به‌وسیله انجماد سریع یک روش ساده برای انتقال پلاسمید به اشریشیاکلی گزارش کردند (۱۵). کارایی انتقال در آزمایش‌های کلونینگ مولکولی بسیار مهم است و می‌تواند متأثر از عوامل مختلف باشد. اولین عامل مؤثر این است که سلول‌ها باید در ابتدای مرحله رشد لگاریتمی باشند. سلول‌های موجود در این مرحله آسان‌تر از سلول‌های موجود در سایر مراحل مستعد می‌شوند. چون سلول‌های این مرحله زنده، سالم و از نظر متابولیسی فعال می‌باشند (۲۱). Ryu و همکاران (۱۹۹۰) به اهمیت اوایل مرحله لگاریتمی اشاره کردند (۲۲).

عامل دومی که می‌تواند بر کارایی انتقال مؤثر باشد، این است که سلول‌های مستعد در هنگام نگهداری و استفاده در محیط سرد باشند. Dagert و همکاران (۱۹۷۹) گزارش کرد که سلول‌های مستعد می‌توانند در دمای $4-0^{\circ}\text{C}$ برای ۴۸-۲۴ ساعت در کلسیم کلراید نگهداری شوند. در ۲۴-۱۲ ساعت اولیه کارایی انتقال ۳-۵ برابر افزایش می‌یابد. اگر باکتری‌های مستعد در ۲۰-درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند، کارایی انتقال بالایی را در ۷-۲ روز دارند (۲۳). سومین عامل مهم غلظت کلسیم کلراید است. معمولاً کلسیم کلراید ۱۰۰-۵۰ میلی‌مولار استفاده می‌شود (۲۴).

در این مطالعه بر اساس اطلاعات ارائه شده، سعی گردید که باکتری‌ها، جهت مستعد کردن در مرحله مناسب رشد انتخاب گردند. هم‌چنین باکتری‌های مستعد در دمای ۲۰-درجه نگهداری شدند و چند ساعت بعد از مستعد شدن برای انتقال مورد استفاده قرار گرفتند. کلسیم کلراید نیز با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. در طی بیان IPTG و لاکتوز مورد استفاده به مهارکننده

References

- Iacovache I, van der Goot FG, Pernot L. Pore formation: an ancient yet complex form of attack. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. *Biomembranes et Biophysica Acta* 2008; 1778(7-8): 1611-1623.

2. Bischofberger M, Gonzalez MR, van der Goot FG. Membrane injury by pore-forming proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 2009; 21(4): 589-595.
3. Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* 2005; 88(1): 91-142.
4. Gouaux E. Channel-forming toxins: tales of transformation. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7(4): 566-573.
5. Iacovache I, Bischofberger M, van der Goot FG. Structure and assembly of pore-forming proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2010; 20(2): 241-246.
6. Kristan KČ, Viero G, Dalla Serra M, Maček P, Anderluh G. Molecular mechanism of pore formation by actinoporins. *Toxicon* 2009; 54(8): 1125-1134.
7. Alegre-Cebollada J, Oñaderra M, Gavilanes JG, del Pozo AM. Sea anemone actinoporins: the transition from a folded soluble state to a functionally active membrane-bound oligomeric pore. *Curr Protein Pept Sci* 2007; 8(6): 558-572.
8. Carter MA, Thorpe JP. Reproductive, genetic and ecological evidence that *Actinia equina* var. *mesembryanthemum* and var. *fragacea* are not conspecific. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1981; 61(01): 79-93.
9. Walton CL. Notes on various British Anthozoa. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)* 1911; 9(02): 236-242.
10. Honma T, Shiomi K. Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects. *Marine Biotechnology* 2006; 8(1): 1-10.
11. Anderluh G, Maček P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon* 2002; 40(2): 111-124.
12. Álvarez C, Mancheño JM, Martínez D, Tejuca M, Pazos F, Lanio ME. Sticholysins, two pore-forming toxins produced by the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*: their interaction with membranes. *Toxicon* 2009; 54(8): 1135-1147.
13. Kristan K, Viero G, Macek P, Dalla Serra M, Anderluh G. The equinatoxin Nterminus is transferred across planar lipid membranes and helps to stabilize the transmembrane pore. *FEBS J* 2007; 274(2): 539-550.
14. Mancheño JM, Martín-Benito J, Martínez-Ripoll Mn, Gavilanes JG, Hermoso JA. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure* 2003; 11(11): 1319-1328.
15. Potrich C, Tomazzolli R, Dalla Serra M, Anderluh G, Malovrh P, Macek P, et al. Cytotoxic activity of a tumor protease-activated pore-forming toxin. *Bioconjug Chem* 2005; 16(2): 369-376.
16. Panchal R, Smart M, Bowser D, Williams D, Petrou S. Pore-forming proteins and their application in biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3(2): 99-115.
17. Pastan I, Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 31(1-2): 53-88.
18. Tu Z, He G, Li KX, Chen MJ, Chang J, Chen L, et al. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* 2005; 8(1): 113-120.
19. Moran Y, Gordon D, Gurevitz M. Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels—molecular and evolutionary features. *Toxicon* 2009; 54(8): 1089-1101.

20. Dubnau D. DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53(1): 217-244.
21. Takahashi R, Valeika SR, Glass KW. A simple method of plasmid transformation of *E. coli* by rapid freezing. *Biotechniques* 1992; 13(5): 711-715.
22. Ryu J, Hartin RJ. Quick transformation in *Salmonella typhimurium* LT2. *Bio Techniques* 1990; 8(1): 43-45.
23. Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 1979; 6(1): 23-38.
24. Brian P, Heler M. High efficiency 5 min transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(3): 536-537.
25. Löwenadler B, Nilsson B, Abrahmsen L, Moks T, Ljungqvist L, Holmgren E, et al. Production of specific antibodies against protein A fusion proteins. *The EMBO journal* 1986; 5(9): 2393-2398.
26. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65(4): 363-372.
27. Georgiou G, Segatori L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16(5): 538-545.
28. De Boer HA, Comstock LJ, Vasser M. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80(1): 21-25.
29. Bellomio A, Morante K, Barlič A, Gutiérrez-Aguirre I, Viguera AR, González-Mañas JM. Purification, cloning and characterization of fragaceatoxin C, a novel actinoporin from the sea anemone *Actinia fragacea*. *Toxicon* 2009; 54(6): 869-880.

Archive of SID