



## DNA Cloning and Expression of alpha-Synuclein Protein in *E. coli*

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Sheykhi S.<sup>1</sup> MSc,  
Amininasab M. \* Ph.D,  
Saffari B.<sup>1</sup> MSc,  
Abdi S.<sup>1</sup> MSc

#### How to cite this article

Sheykhi S, Amininasab M, Saffari B, Abdi S. DNA Cloning and Expression of alpha-Synuclein Protein in *E. coli*. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(1):145-152.

\*Cell & Molecular Biology Department, Faculty Biology, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Cell & Molecular Biology Department, Faculty Biology, University of Tehran, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Cell & Molecular Biology Department, Faculty Biology, College of Science, University of Tehran, Enghelab Street, Tehran, Iran. Postal Code: 141556658  
Phone: +98 (21) 61112293  
Fax: +98 (21) 66492992  
amininasab@khayam.ut.ac.ir

#### Article History

Received: August 12, 2017  
Accepted: October 22, 2017  
ePublished: March 20, 2018

### ABSTRACT

**Aims** Identifying the structure and function of alpha-Synuclein protein can lead to the development of appropriate treatments for Parkinson disease. The aim of the current study was to investigate DNA cloning and the expression of alpha-Synuclein protein in *E. coli*.

**Materials & Methods** In this experimental study, the sequence of encoding alpha-Synuclein in pRK172 recombinant plasmid was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), using best primers. The synthesized DNA was, then, digested by restriction enzymes and cloned into pET28a and recombinant plasmid was transferred into the expression strain of *E. coli* (BL21) by Calcium Chloride method. The expression of alpha-Synuclein gene was induced by Isopropyl-Beta-D-Thiogalactoside (IPTG) and the expression of alpha-Synuclein was investigated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method. Sequencing was done, using the ClustalW algorithm by the BioEdit 5.0.9 program.

**Findings** In products of DNA enzymatic digestive reactions and pET28a plasmid with restriction enzymes, the size of the fragments indicated the correctness of the enzymatic reactions. The synthesized DNA and pET28a plasmid were 407 and 5369 nucleotides, respectively. The translation of the sequence of the cloned fragment revealed a 100% similarity to the human alpha-Synuclein protein. In expressing the recombinant protein in comparison with negative control samples, adding IPTG increased the expression of alpha-Synuclein protein in all samples, especially 2 hours after induction. Most of alpha-Synuclein expressed from the pET28a-alpha-Synuclein plasmid accumulated in the bacteria as incorporated objects.

**Conclusion** The alpha-Synuclein protein is cloned into the pET28a plasmid and formation of the objects incorporated by alpha-Synuclein is confirmed by the expression of the pET28a-alpha-Synuclein system and paves the way for producing this protein in high scale.

**Keywords** Parkinson Disease; Alpha- Synuclein; Cloning; Polymerase Chain Reaction; Genetic Engineering

### CITATION LINKS

[1] Association of anosmia with autonomic failure in Parkinson ... [2] Non-motor symptoms in Parkinson's ... [3] Autonomic dysfunction in 3414 Parkinson's disease patients ... [4] Clinical criteria for the diagnosis of Parkinson's ... [5] Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for ... [6] Lewy ... [7] Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from ... [8] Etiology and pathogenesis of Parkinson's ... [9] Recent advances in the genetics of Parkinson's s ... [10] The central theme of Parkinson's disease ... [11] Inhibition of alpha-synuclein aggregation by small heat ... [12] Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression ... [13] Identification, localization and characterization of the ... [14] The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated ... [15] High-resolution mapping of SNCA encoding alpha-synuclein, the non-A beta component ... [16] Genes associated with Parkinson ... [17] Alpha-synuclein in extracellular vesicles: Functional implications ... [18] The aggregation and fibrillation of ... [19] Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's ... [20] Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic ... [21] Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid ... [22] A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary ... [23] Identification of two distinct synucleins ... [24] Both familial Parkinson's disease mutations accelerate ... [25] Rapid purification and analysis of alpha-synuclein proteins ... [26] Cloning, expression, purification, and spectroscopic analysis of the ... [27] CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple [28] BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor... [29] A new method for purification of recombinant ... [30] NACP, a protein implicated in Alzheimer's ... [31] Evidence for a partially folded ... [32] Human recombinant NACP/alpha-synuclein is ... [33] Effect of temperature on protein ... [34] Kinetic model of the aggregation ... [35] Recombinant protein expression ...

## کلون کردن DNA و بیان پروتئین آلفا-سینوکلئین در باکتری اشریشیاکلی

سارا شیخی MSc

گروه زیست‌شناسی سلولی- ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مهریار امینی‌نسب \* PhD

گروه زیست‌شناسی سلولی- ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

بابک صفاری MSc

گروه زیست‌شناسی سلولی- ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

سپیده عبدی MSc

گروه زیست‌شناسی سلولی- ملکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** شناخت ساختار و عملکرد پروتئین آلفا-سینوکلئین می‌تواند زمینه‌ساز توسعه روش‌های درمانی مناسب علیه بیماری پارکینسون باشد. هدف پژوهش حاضر، کلون کردن DNA و بیان پروتئین آلفا-سینوکلئین در باکتری اشریشیاکلی بود.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش تجربی حاضر، توالی کدکننده آلفا-سینوکلئین موجود در پلازمید نوترکیب pRK172، به کمک روش PCR و با استفاده از پرایمرهای مناسب تکثیر شد. DNA سنتز شده توسط آنزیم‌های محدودگر *HindIII* و *Sall* بریده و در حامل pET28a کلون و پلازمید نوترکیب به روش کلسیم کلراید به سویه بیانی باکتری اشریشیاکلی (BL21) منتقل شد. بیان آلفا-سینوکلئین توسط محلول IPTG القا و بیان پروتئین نوترکیب با روش الکتروفورز SDS-PAGE ارزیابی شد. ردیف‌سازی توالی‌ها به کمک الگوریتم ClustalW با برنامه BioEdit 5.0.9 صورت پذیرفت.

**یافته‌ها:** در محصولات واکنش‌های برش آنزیمی DNA و پلازمید pET28a با آنزیم‌های محدودگر، اندازه قطعات، نشان‌دهنده صحت واکنش‌های آنزیمی بود. DNA تکثیر شده و پلازمید pET28a مورد استفاده به ترتیب با طول‌های ۴۰۷ و ۵۳۶۹ نوکلئوتید بودند. ترجمه حاصل از توالی قطعه کلون شده، مشابه ۱۰۰٪ با پروتئین آلفا-سینوکلئین انسانی را نشان داد. در بیان پروتئین نوترکیب در قیاس با نمونه‌های شاهد منفی، افزودن IPTG موجب افزایش بیان پروتئین آلفا-سینوکلئین در تمامی نمونه‌ها به‌ویژه ۲ ساعت پس از القا شد. بیشتر آلفا-سینوکلئین بیان شده از پلازمید pET28a-alpha-Synuclein به‌صورت اجسام گنجانده در باکتری تجمع یافتند.

**نتیجه‌گیری:** پروتئین آلفا-سینوکلئین در پلازمید pET28a کلون و تشکیل اجسام گنجانده توسط آلفا-سینوکلئین به‌هنگام بیان از سامانه pET28a-alpha-Synuclein تایید می‌شود و راه را بر تولید این پروتئین در مقیاس بالا هموار می‌سازد.

**کلیدواژه‌ها:** پارکینسون، آلفا-سینوکلئین، کلونینگ، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مهندسی ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰

\* نویسنده مسئول: amininasab@khayam.ut.ac.ir

### مقدمه

بیماری پارکینسون، یک نارسایی پیشرونده و تحلیل‌برنده سیستم عصبی است که توسط جیمز پارکینسون در سال ۱۸۱۷ معرفی و توصیف شد. از نقطه‌نظر بالینی، این بیماری در زمره نارسایی‌های حرکتی قرار می‌گیرد، اما این نارسایی‌های حرکتی معمولاً با کاهش سطح هوشیاری و توانایی‌های شناختی در بیماران همراه است [1-3].

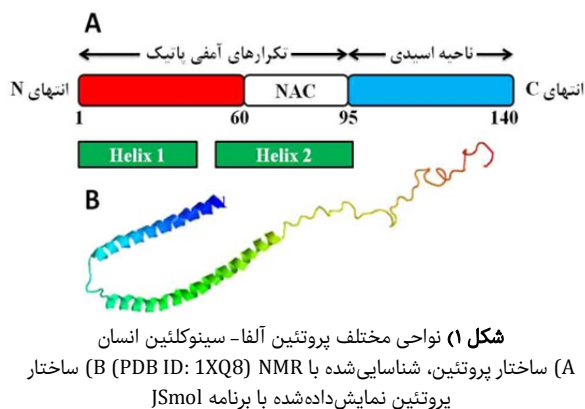
علایم بالینی این بیماری شامل لرزش در حال استراحت و کندی حرکات است. در صورت پیشرفت بیماری، علایم دیگری چون فقدان حرکت و ناپایداری وضعیت هم ممکن است در بیماران دیده

شوند [4]. این عوارض، نتیجه تجمع یک دسته از مواد پروتئینی درون نورون‌ها است که به اجسام لوی معروف‌اند [5]. قسمت عمده اجسام لوی از فیبریل‌های آمیلوئیدی پروتئین آلفا-سینوکلئین تشکیل شده است [6,7].

با وجود این که در اغلب موارد وقوع این بیماری غیرارثی یا تک‌گیر است، مطالعات حاکی از آن بوده‌اند که حدود ۵ الی ۱۰٪ این موارد اساس ژنتیکی داشته و در زمره نوع خانوادگی پارکینسونیسم قرار می‌گیرند [8]. اولین بار شخصی به‌نام ویلیام ریچاردگورز در سال ۱۹۰۲ با مشاهده وقوع مکرر بیماری در برخی خانواده‌ها به احتمال دخالت ژن‌ها در بیماری‌زایی پارکینسون اشاره نموده است، ولی تنها در سال ۱۹۹۷ بود که اولین ژن مرتبط با این بیماری (ژن SNCA) شناسایی شد. ژن SNCA روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۴ (جایگاه PARK1) واقع شده است که پروتئینی به همین نام با ۱۴۰ اسید آمینه و pH ایزوالکتریک ۴/۶۷ را رمزگذاری می‌نماید [9]. تاکنون ۶ ژن از جمله ژن رمزکننده آلفا-سینوکلئین شناسایی شده‌اند که جهش در آنها به نوع خانوادگی پارکینسونیسم منجر می‌شود [10]. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان ژن آلفا-سینوکلئین، خواه به دلیل دو یا سه برابر شدنش در ژنوم طی نوترکیبی و خواه در نتیجه جهش‌هایی که بیان آن را بیشتر می‌نمایند، از دلایل اصلی بروز نوع خانوادگی بیماری پارکینسون است [9]. این در حالی است که برخی جهش‌های نقطه‌ای نظیر A53T و E46K، سرعت تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی توسط پروتئین را افزایش می‌دهند، در حالی که بعضی دیگر (نظیر A30P) بر نرخ تشکیل تجمعات اولیگومری می‌افزایند [11].

پروتئین آلفا-سینوکلئین در سامانه عصبی مرکزی به وفور بیان می‌شود و جزء خانواده کوچکی از پروتئین‌های محلول است که تحت عنوان خانواده سینوکلئین‌ها شناخته می‌شود و چهار عضو از قبیل آلفا-سینوکلئین، بتا-سینوکلئین، گاما-سینوکلئین و سینورتین دارد. توالی این خانواده از پروتئین‌ها بین گونه‌های مختلف جانوری حفظ‌شدگی بالایی از خود نشان می‌دهد [12-15]. عملکرد دقیق پروتئین آلفا-سینوکلئین تاکنون ناشناخته باقی مانده است، ولی چنین به نظر می‌رسد که در فرآیندهایی چون تمایز نورون‌ها، نقل و انتقالات آکسونی و جابه‌جایی وزیکول‌های سیناپسی نقش داشته باشد [16]. داخل مغز، آلفا-سینوکلئین هم به شکل محلول و آزاد و هم به‌صورت متصل به اجزای غشادار سلولی دیده شده است [17]. مطالعات اسپکتروسکوپی و نتایج بررسی‌های رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) نشان داده‌اند که آلفا-سینوکلئین اساساً پروتئینی فاقد تاشدگی است، وضعیتی که حاصل بار منفی کل بالای این پروتئین در pH خنثی و هیدروفوبیسیتهی کم آن است [18]. ساختار این پروتئین را می‌توان به سه ناحیه تقسیم نمود که ناحیه اول شامل اسید آمینه‌های ۱ تا ۶۰ که واجد چهار تکرار از ۱۱ زیرواحدی نه چندان حفظ‌شده است که همراه با تکرارهای بخش میانی دو ماریچ دوگانه‌دوست را در انتهای N پروتئین ایجاد می‌نمایند. ناحیه میانی که از اسید آمینه ۶۱ تا ۹۵ امتداد داشته و علاوه بر ۳ تکرار ۱۱ زیرواحدی دیگر شامل قسمتی موسوم به جزء غیر آمیلوئید بتای (NAC) پروتئین است. همین قسمت NAC است که موجب تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی توسط آلفا-سینوکلئین می‌شود. ناحیه سوم هم از زیرواحد‌های ۹۶ تا ۱۴۰ گسترده شده و انتهای C به‌شدت باردار پروتئین را می‌سازد (شکل ۱).

برخی شواهد حاکی از آن بوده‌اند که تجمع پروتئین‌های آلفا-سینوکلئین در مغز بیماران مبتلا به پارکینسون، عامل اولیه



### مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، پلازمید pRK172 حاوی DNA آلفا-سینوکلئین (اهدایی پروفیسور رونالد رییک از دانشگاه ETH؛ سوئیس) به عنوان الگو در PCR مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای پیشرو و پسروی به کاررفته در این مطالعه به ترتیب دارای ۵۵ و ۴۱ نوکلئوتید بود (شکل ۲) که با توجه به تمایل کدونی ویژه باکتری/شیریشیاکلی طراحی شدند.

پرایمر پیشرو از انتهای 5' خود به ترتیب شامل قسمت‌هایی از قبیل یک توالی الحاقی چهار نوکلئوتیدی برای فراهم نمودن بستر مناسب برای اتصال DNAهای سنتز شده به آیزیم محدودکننده، مکان شناسایی و برش آنزیم محدودکننده *SalI*، مکان شناسایی و برش پروتئاز TEV به منظور جداسازی پروتئین آلفا-سینوکلئین از برچسب هیستیدینی فرادست خود در مرحله تخلیص پروتئین و بخش رمزکننده انتهای آمین پروتئین آلفا-سینوکلئین که به انتهای 5' توالی کدکننده آلفا-سینوکلئین روی پلازمید pRK172 متصل می‌شود، بود. مکان شناسایی و برش پروتئاز TEV از ۲۱ نوکلئوتید تشکیل شده است که در نهایت قطعه‌ای به طول هفت اسید آمینه را (شامل انتهای C-گلیسین-گلوتامین-فنیل آلانین-تیروزین-لوسین-آسپارتیک اسید-گلوتامینیک اسید-انتهای N) به انتهای N آلفا-سینوکلئین اضافه می‌نماید. توالی پرایمر پسرو نیز از انتهای 5' به ترتیب از بخش‌های یک مکان الحاقی چهار نوکلئوتیدی، بخش مکمل جایگاه شناسایی و برش آنزیم محدودکننده *HindIII*، توالی مکمل دو رمزکننده کدون پایان (برای اطمینان از پایان ترجمه در صورت عدم شناسایی کدون پایان اول توسط ریبوزوم) و بخش مکمل رمزکننده انتهای کربوکسیل پروتئین آلفا-سینوکلئین که به انتهای 3' توالی کدکننده آلفا-سینوکلئین روی پلازمید pRK172 متصل می‌شود، تشکیل شده است. دمای ذوب (Tm) پرایمرهای پیشرو و پسرو به ترتیب ۷۱ و ۶۷°C بود (شکل ۲).

به منظور تکثیر ژن آلفا-سینوکلئین، پرایمرهای پیشرو و پسرو هر یک به مقدار ۱۰ میکرومول بر میکرولیتر، پلازمید pRK172 به عنوان الگو (به مقدار ۱۰ نانوگرم)، منیزیم کلرید (۱/۵ میلی‌مولار)، دئوکسی‌نوکلئوتیدتری فسفات (۲/۵ میلی‌مولار)، بافر PCR و یک واحد آنزیم پلیمرز Taq در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با هم مخلوط شده و واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون طبق برنامه واکنش واسرشتی ابتدایی در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل سه مرحله‌ای شامل فازهای واسرشتی (۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C)، اتصال پرایمرها (۴۵ ثانیه در دمای ۶۹°C)، طولی‌شدگی (۳۰ ثانیه در دمای

راه‌اندازی واکنش‌هایی است که در نهایت به مرگ سلول‌های عصبی می‌انجامد [19, 20]. از این رو، شناخت جزئیات ساختاری فیبریل‌های آلفا-سینوکلئین در سطح مولکولی، گام اول در راه دستیابی به شیوه‌های درمانی مناسب برای این بیماری است. بیان، استخراج و خالص‌سازی آلفا-سینوکلئین نوترکیب از باکتری/شیریشیاکلی (*Escherichia coli*) برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ و توسط بودا و همکاران صورت پذیرفته است [21]. این محققان در ابتدا با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، فاز متضاد (RP-HPLC) پروتئین آلفا-سینوکلئین را از نمونه‌های هموزن مغز افراد مرده مبتلا به آلزایمر جدا نموده‌اند. در ادامه نیز به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و اولیگونوکلئوتیدهای طراحی شده از روی توالی پروتئین خالص‌شده، توالی کدکننده مربوط به آلفا-سینوکلئین را از روی کتابخانه cDNA جنین انسانی (موسوم به کتابخانه *AgT11*) [22] ساخته و در پلازمید pSENACP کلون نمودند. یک سال بعد (۱۹۹۴) در روشی مشابه، یک تیم تحقیقاتی از دانشگاه کمبریج، پروتئین‌های آلفا و بتا-سینوکلئین را از نمونه‌های کالبدشکافی مغز افراد مبتلا به پارکینسون، به روش HPLC فاز متضاد استخراج نموده و با طراحی پرایمرهای دژنره براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی جزیی پروتئین‌ها، توالی کدکننده هر دو پروتئین آلفا و بتا-سینوکلئین را به کمک PCR از روی کتابخانه cDNA کورتکس انسانی ساختند [23]. DNAهای حاصل، درون پلازمید pRK172، کلون و با استفاده از سویه BL21 بیان شدند. در نهایت نیز، پروتئین‌های آلفا و بتا-سینوکلئین نوترکیب به روش کروماتوگرافی تعویض یونی استخراج شدند. در سال ۱۹۹۹، نارهی و همکاران [24] به کمک PCR و با طراحی پرایمرهای مناسب از روی کتابخانه cDNA تهیه شده از مغز انسان [21]، موفق به ساخت DNA آلفا-سینوکلئین وحشی و سه فرم جهش‌یافته آن (A53T, A30P, A53T+A30P) شدند. DNAهای ساخته شده در ادامه، درون وکتور پروکاریوتی pAMG21 کلون و پس از بیان به روش کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص شدند. در سال ۲۰۰۲، چوی و همکاران به کمک روش رونوشت‌برداری معکوس موفق شدند cDNA آلفا-سینوکلئین را با استفاده از توتال RNA لئوسیت‌های انسانی ساخته و آن را درون پلازمید pGEX-4T-1 و در فرودست ژن کدکننده پروتئین الحاقی گلوپتایون-اس-ترانسفراز (GST) کلون نمایند [25]. آلفا-سینوکلئین متصل به GST در ادامه به کمک کروماتوگرافی میل ترکیبی تخلیص شدند. در پژوهشی دیگر، بیساقلیا و همکاران [26] موفق شده‌اند تا با استفاده از روش PCR و دو پرایمر هم‌پوشان، DNA مربوط به قطعه میانی پروتئین آلفا-سینوکلئین انسان را (از اسید آمینه ۵۷ تا ۱۰۳) ساخته و در پلازمید pET28b کلون نمایند. قطعه مورد نظر پس از بیان در سویه BL21 توسط رزین کبالت-سفاروز (TALON) تخلیص شد.

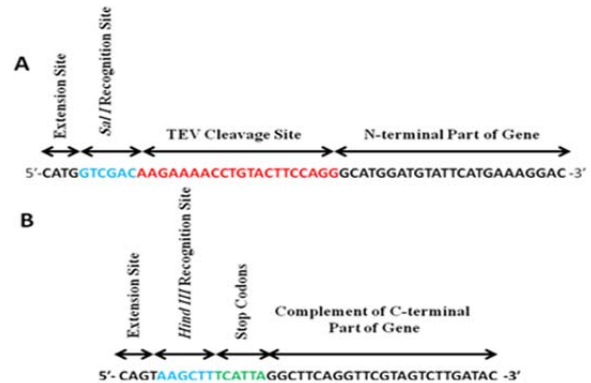
هدف از انجام پژوهش حاضر، بومی‌سازی سنتز نوترکیب پروتئین آلفا-سینوکلئین بود. از آنجا که پروتئین آلفا-سینوکلئین در روند بیماری‌زایی پارکینسون نقش بسیار مهمی ایفا می‌نماید، تهیه مقادیر مناسب از این پروتئین گامی ضروری برای انجام انواع مطالعات ساختاری، شناسایی مکانیزم، سینتیک تجمع آلفا-سینوکلئین و نیز یافتن استراتژی‌های مولکولی مهارکننده تشکیل اجسام لوی به شمار می‌آید. بنابراین پژوهش حاضر با هدف کلون کردن DNA و بیان پروتئین آلفا-سینوکلئین در باکتری/شیریشیاکلی انجام شد.

کروماتوگرافی میل ترکیبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با تیمار محتوای پروتئینی شسته شده از ستون کروماتوگرافی با پروتئاز TEV، تمامی قسمت‌های اضافی (به جز تنها یک اسید آمینه گلیسین) از انتهای N آلفا-سینوکلئین جدا می‌شوند.

**تراریختی سویه غیربیانی باکتری اشریشیاکلی، غربالگری و توالی‌یابی:** محصول واکنش اتصال با استفاده از روش کلسیم کلراید به داخل سویه DH5 $\alpha$  باکتری اشریشیاکلی منتقل شد تا در آنجا تکثیر و ازدیاد یابد. DH5 $\alpha$  سویه‌ای غیربیانی و فاقد پروتئین رکای (recA) بوده و لذا قادر به انجام نو ترکیبی ژنتیکی بین پلازمیدهای ترانسفورم شده نیست. باکتری‌های تراریخت ابتدا روی محیط کشت لوریا برتانی (LB) آگار دار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (با غلظت 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مدت 16 ساعت در دمای 37°C گرما گذاری شدند. سپس کلنی‌های ظاهر شده به محیط کشت LB مایع (کانامایسین 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) منتقل شدند تا به مدت 16 ساعت (در دمای 37°C و 200 دور در دقیقه) تکثیر نمایند. در انتها، پلازمیدهای نو ترکیب (حاوی DNA آلفا-سینوکلئین) به کمک کیت استخراج پلازمید (Gene All؛ کره جنوبی) تخلیص شدند. حضور DNA آلفا-سینوکلئین در پلازمید pET28a با استفاده از روش PCR و صحت توالی آن با توالی‌یابی (Macrogen Inc.; کره جنوبی) تایید شد.

**تراریختی و بیان پروتئین نو ترکیب در سویه بیانی باکتری اشریشیاکلی:** به منظور بیان پروتئین لازم است تا پلازمیدهای واجد ژن آلفا-سینوکلئین به درون یک سویه بیانی منتقل شوند. برای این منظور از سویه BL21(DE3) باکتری اشریشیاکلی استفاده شد که دارای ژن RNA پلیمرز T7 بوده و بیان پروتئین در آن به کمک ایزوپروپیل-بتا-دی-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) القا می‌شود. همانند مرحله قبل، برای ورود پلازمید نو ترکیب به باکتری‌های مستعد از روش کلسیم کلراید استفاده شد. باکتری‌های واجد پلازمید ابتدا به محیط کشت LB جامد (کانامایسین 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) منتقل و به مدت 16 ساعت در دمای 37°C گرما گذاری شدند. سپس، کلنی‌های ظاهر شده به محیط کشت LB مایع (کانامایسین 50 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) منتقل و به مدت 16 ساعت در دمای 37°C (200 دور در دقیقه) انکوبه شدند. در انتها، باکتری‌ها در محیط کشت جدید LB مایع تا غلظت نهایی 5% تلقیح شدند (دمای 37°C و 200 دور در دقیقه). بعد از رسیدن دانسیته نوری (OD<sub>600</sub>) محیط به حدود 0.6، بیان پروتئین آلفا-سینوکلئین با محلول یا غلظت نهایی یک میلی‌مولار IPTG القا شد. به منظور تعیین بهینه زمان بیان، از باکتری‌های رشد کرده در محیط در زمان‌های 1، 2، 3، 4، 6 و 20 ساعت پس از القا، نمونه‌گیری به عمل آمد. در گام بعدی، نمونه‌های جمع‌آوری شده در 800 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ و پس از ادغام با بافر مخصوص نمونه‌گذاری پلی‌اکریل‌امید-سدیم‌دودسیل سلفات (SDS-PAGE؛ 62/5 میلی‌مولار تریس با pH برابر با 6/8، 5% بتامرکاپتواتانول، 10% گلیسرول، 2% SDS و 0.5% بروموفنول‌بلو) روی ژل پلی‌اکریل‌امید 15% (وزنی-حجمی) بارگذاری شدند. وزن خیس رسوب باکتریایی به دست آمده با استفاده از این روش، تقریباً 10 گرم به ازای هر لیتر محیط کشت بود. به طور خلاصه به منظور بیان آلفا-سینوکلئین، پلازمید نو ترکیب pET28a- $\alpha$ -synuclein به درون سویه بیانی BL21 (DE3) باکتری اشریشیاکلی منتقل شد. برای بهینه‌سازی شرایط رشد، آزمایشات متعددی با غلظت‌های مختلف IPTG (از 0/1 تا 1 میلی‌مولار)، دماهای مختلف گرما گذاری

(37°C) و طویل شدن نهایی پرایمرها در دمای 72°C به مدت 10 دقیقه انجام شد. محصول PCR به طول 407 نوکلئوتید روی ژل آگارز 1%، الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج DNA (Gene All؛ کره جنوبی) تخلیص شد. از آنجا که طول ژن آلفا-سینوکلئین موجود در پلازمید pRK172 برابر با 420 نوکلئوتید است، با احتساب قسمت‌های پیش‌آویز پرایمرها (نظیر جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های برش‌دهنده، جایگاه برش آنزیم TEV و مکان‌های الحاقی)، انتظار می‌رفت که طول نهایی محصول واکنش PCR، 467 نوکلئوتید باشد.

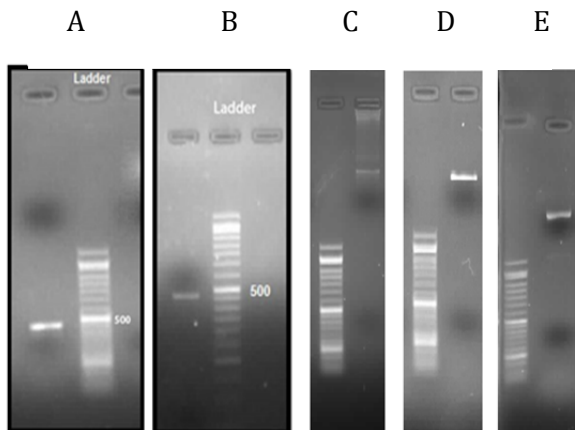


شکل 2) ترادف و مشخصات پرایمرهای پیشرو (A) و پسرو (B)

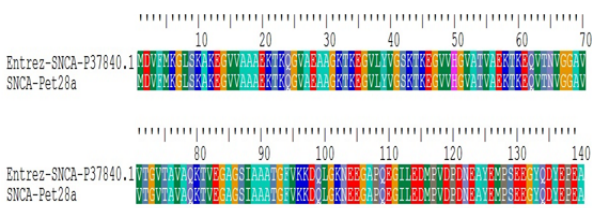
**هضم آنزیمی:** به منظور ورود DNA آلفا-سینوکلئین به درون حامل مورد نظر، پلازمید pET28a و محصول واکنش PCR در معرض برش آنزیم‌های *Sall* و *HindIII* (Fermentas؛ آلمان) قرار گرفتند تا با ازدست‌دادن قطعات اضافی دارای انتهای چسبنده شوند. به این صورت که در گام نخست، پلازمید pET28a و DNA حاصل از PCR در ویال‌های مجزا همراه با آنزیم *Sall* و بافر ویژه‌اش به مدت 3 ساعت در 37°C گرما گذاری شدند. در ادامه، هضم آنزیمی دوم توسط آنزیم *HindIII* (3 ساعت در 37°C) صورت پذیرفت. برای اطمینان از تاثیر آنزیم‌ها بر پلازمید، صحت انجام واکنش آنزیمی پس از هر مرحله توسط بارگذاری قطعات روی ژل آگارز تایید و محصول مربوطه توسط کیت استخراج DNA بازیابی شد. از مارکر 50 جفت‌بازی و 100 جفت‌بازی (سیناکلون؛ ایران) استفاده شد.

**ساب‌کلون کردن DNA آلفا-سینوکلئین به درون پلازمید pET28a:** محصولات واکنش‌های هضم آنزیمی پس از خالص‌سازی، توسط آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas؛ آلمان) به یکدیگر متصل شدند. این واکنش در دمای 4°C و به مدت 18 ساعت در گرمخانه انجام گرفت. پیش از انجام واکنش اتصال، غلظت هر یک از نمونه‌ها (DNA و پلازمید) توسط دستگاه نانودراپ (Thermo؛ ایالات متحده) سنجیده شد. غلظت سنجی نمونه‌ها غلظت DNA را برابر با 0.5 میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت پلازمید را برابر با 0.6 میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین نمود. با توجه به غلظت‌های مربوطه، حجم مناسبی از نمونه‌ها (به نسبت 3 به یک از DNA و پلازمید) برای واکنش اتصال مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب سامانه بیانی pET28a- $\alpha$ -synuclein ساخته شد. لازم به ذکر است که آلفا-سینوکلئین بیان شده از این سامانه در انتهای N خود، علاوه بر جایگاه شناسایی پروتئاز TEV، یک برجسب هیستیدینی شامل شش اسید آمینه هیستیدین متوالی هم دارد. این برجسب در تخلیص پروتئین به کمک

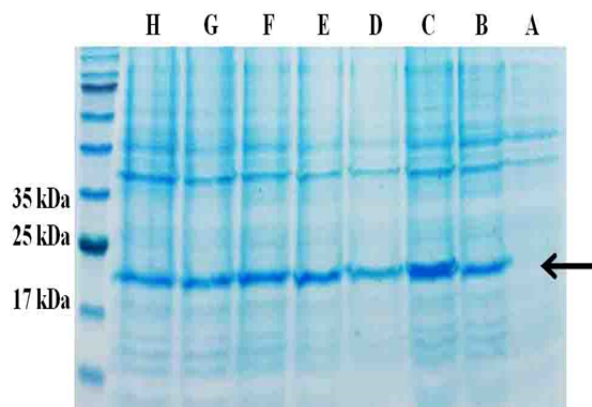
$\alpha$ -synuclein به صورت اجسام گنجانده (inclusion body) در باکتری تجمع یافتند (شکل ۷).



**شکل ۴** تصویر ژل الکتروفورز برش DNA آلفا- سینوکلئین و pET28a با آنزیم‌های محدودکننده  
 محصول برش cDNA با آنزیم *Sall* (A)  
 محصول برش DNA با آنزیم *HindIII* (B)  
 پلازمید حلقوی برش نخورده (C)  
 محصول برش پلازمید با آنزیم *Sall* (D)  
 محصول برش پلازمید با آنزیم *HindIII* (E)  
 در شکل‌های A و B از مارکر ۵۰ جفت‌بازی و در شکل‌های C، D، E از مارکر ۱۰۰ جفت‌بازی استفاده شد



**شکل ۵** نتیجه ردیف‌سازی توالی پروتئین آلفا- سینوکلئین انسانی با ترجمه قطعه کلون شده در پلازمید pET28a



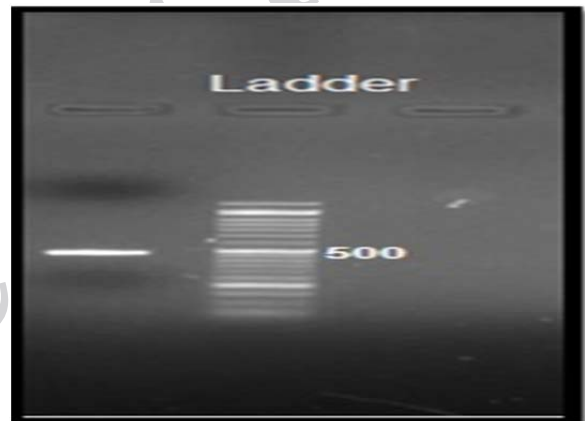
**شکل ۶** ژل SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج شده از کلون حاوی pET28a- $\alpha$ -synuclein در دمای ۳۷°C و IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار (ستون سمت چپ) شاخص وزن مولکولی  
 ستون A) باکتری BL21 (DE3) حاوی پلازمید نوترکیب الفاننده (شاهد)  
 ستون B تا H) به ترتیب معرف رسوب باکتری‌های BL21 (DE3) حاوی پلازمید نوترکیب در زمان‌های مختلف (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۲۰ ساعت) پس از القا توسط IPTG

(۲۰، ۳۰ و ۳۷°C)، فازهای رشد مختلف انجام القا (از ۰/۴ تا ۰/۸ دانسیته نوری) و نیز زمان‌های مختلف گرماگذاری پس از القا (تا نهایت ۲۰ ساعت پس از اضافه نمودن IPTG) انجام پذیرفت. میزان آلفا- سینوکلئین محلول و نامحلول (به صورت اجسام گنجانده) پس از اضافه نمودن بافر لیزکننده (۲۰ میلی‌مولار فسفات، ۲۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید، ۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۲ میلی‌مولار بتامرکاپتواتانول، ۱٪ تریتون ایکس-۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیزوزیم) به رسوب باکتری، سونیکاسیون (۴ پالس ۱۰ ثانیه‌ای به شدت ۵۰٪ و فواصل ۳۰ ثانیه‌ای) و سانتریفیوژ آن در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ دقیقه نشان داده شد. نتایج بیان پروتئین در ۳۷°C و در زمان‌های مختلف پس از القا با یک میلی‌مولار IPTG (القا در ۰/۶ دانسیته نوری) تعیین شد.

**ردیف‌سازی:** ردیف‌سازی توالی‌ها به کمک الگوریتم ClustalW [27] با برنامه BioEdit 5.0.9 [28] صورت پذیرفت.

### یافته‌ها

در واکنش PCR روی ژل آگاروز ۱٪، اندازه قطعه تکثیرشده مطابق با مقدار قابل انتظار یعنی ۴۶۷ نوکلئوتید بود (شکل ۳).



**شکل ۳** تصویر محصول واکنش PCR مربوط به ساخت DNA آلفا- سینوکلئین از سمت چپ، چاهک اول) محصول PCR (۴۶۷ جفت‌باز) چاهک دوم) مارکر ۵۰ جفت‌بازی چاهک سوم) کنترل منفی

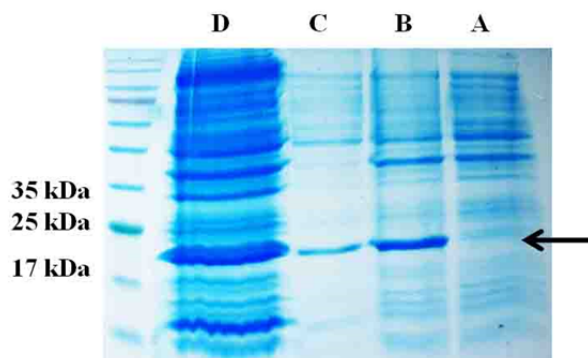
در محصولات واکنش‌های برش آنزیمی DNA و پلازمید pET28a با آنزیم‌های محدودگر *Sall* و *HindIII*، اندازه قطعات، نشان‌دهنده صحت واکنش‌های آنزیمی بود. DNA تکثیرشده و پلازمید pET28a مورد استفاده به ترتیب با طول‌های ۴۰۷ و ۵۳۶۹ نوکلئوتید در تصاویر قابل رویت بودند (شکل ۴).

پس از کلون کردن DNA آلفا- سینوکلئین در پلازمید pET28a، توالی آن به صورت یک‌طرفه تعیین و با استفاده از ردیف‌سازی با شماره دسترسی P37840.1 بانک داده NCBI، مشخص شد که ترجمه حاصل از توالی قطعه کلون شده، مشابه ۱۰۰٪ با پروتئین آلفا- سینوکلئین انسانی را نشان داد (شکل ۵).

در بیان پروتئین نوترکیب در قیاس با نمونه‌های شاهد منفی، افزودن IPTG موجب افزایش بیان پروتئین آلفا- سینوکلئین در تمامی نمونه‌ها به ویژه ۲ ساعت پس از القا شد. نمونه‌های حاوی پلازمید نوترکیب باندی با وزن تقریبی ۲۰ کیلودالتون تشکیل دادند (شکل ۶). بیشتر آلفا- سینوکلئین بیان شده از پلازمید pET28a-

روش درجه خلوص کمی داشته و سایر روش‌های تخلیص مانند کروماتوگرافی اندازه طردی و HPLC نیز برای افزایش خلوص محصول لازم هستند<sup>[30]</sup>. اما همان طور که در شکل ۷ دیده شد، پروتئین‌های آلفا- سینوکلئینی که توسط pET28a- $\alpha$ -synuclein بیان می‌شوند، اکثراً به صورت اجسام گنجانده در /شریشیالکی انباشته می‌شوند. بدین ترتیب پروتئین‌ها تا حد زیادی از دسترس پروتئین‌های باکتریایی مصون می‌مانند و دیگر نیازی به استفاده از این مهارکننده‌ها برای تخلیص آنها نیست. به علاوه، تعبیه توالی شناسایی‌شونده توسط پروتئاز TEV در انتهای N پروتئین بیان‌شده توسط این سامانه (pET28a- $\alpha$ -synuclein) موجب افزایش درصد خلوص آن پس از تنها یک مرحله تخلیص به روش کروماتوگرافی میل ترکیبی با استفاده از برجسب هیستیدینی می‌شود. زیرا پس از آن که باکتری بیانی لیز شد و محتوای پروتئینی آن در معرض یون‌های نیکل‌رزین میل ترکیبی قرار گرفت، تنها پروتئین واجد برجسب هیستیدینی و قسمتی از پروتئین‌های میزبان پروکاریوتی که واجد چند هیستیدین در ساختار خود هستند، به ستون کروماتوگرافی متصل و مابقی پروتئین‌ها شسته می‌شوند. در گام بعد، پس از تیمار پروتئین‌های متصل به ستون با پروتئاز TEV آلفا- سینوکلئین با درجه خلوص بالا به دست می‌آید. گذشته از این، کل فرآیند خالص‌سازی تنها ۳ تا ۴ روز به طول می‌انجامد.

با توجه به اینکه پلازمیدی چون pET28a فاقد ژن بیان‌کننده پروتئین الحاقی در انتهای ۳' یا ۵' محل کلونینگ خود است، پروتئین‌های بیان‌شده توسط این سامانه در صورت هیدروفوب بودن تمایل بالایی به ایجاد تجمعات پروتئینی از خود نشان می‌دهند. چنین پدیده‌ای در پروتئین‌هایی چون آلفا- سینوکلئین که تمایل زیادی به ایجاد اجسام گنجانده دارند، بیش از پیش رخ می‌دهد. این امر می‌تواند خالص‌سازی این دسته از پروتئین‌ها را در مقادیر زیاد تحت شرایط دناتوره‌کننده تسهیل نماید. در پژوهشی که توسط هوانگ و همکاران<sup>[29]</sup> انجام گرفته است، مشخص شد که پروتئین آلفا- سینوکلئین برخلاف گزارش‌های پیشین به جای آن که در سیتوپلاسم تجمع یابد، در پری‌پلاسم باکتری یافت می‌شود. این خود، بازه تخلیص این پروتئین را بهبود می‌بخشد. از آنجا که پروتئین آلفا- سینوکلئین ساختار مشخصی نداشته و به‌کاربردن شرایط دناتوره‌کننده موجب تاخوردگی نامناسب آن نمی‌شود، کلون‌نمودن ژن این پروتئین در وکتور pET28a بیان و خالص‌سازی محصول پروتئینی را در مقادیر بالا تضمین می‌نماید. با توجه به هیدروفوبیسیته پایین و بار منفی بالای آلفا- سینوکلئین، قابل پیش‌بینی است که هر گونه تغییر در محیط پروتئین که به افزایش هیدروفوبیسیته یا کاهش بار کلی آن بینجامد، می‌تواند به تاخوردگی این پروتئین [که ذاتاً فاقد ساختار مشخصی است] کمک نماید. نتایج آزمایشات نیز نشان داده‌اند که آلفا- سینوکلئین در درجه حرارت بالا و pH حدود ۳ از ساختار منظم‌تری برخوردار است. این بدان معنی است که تحت چنین شرایطی احتمال شکل‌گیری ساختارهای بتا افزایش یافته و پروتئین شکل فشرده‌تری به خود می‌گیرد<sup>[31]</sup>. از این رو، واضح است که شرایطی از قبیل pH پایین، دمای بالا و غلظت بالای آلفا- سینوکلئین به هنگام تخلیص در آزمایشگاه، میزان تجمع‌پذیری این پروتئین را افزایش می‌دهند<sup>[32]</sup>. اما نمی‌توان با افزایش دمای بیش از حد یا کاهش شدید pH محیط کشت، نرخ ایجاد تجمعات پروتئینی را بیشتر کرد. زیرا رشد باکتری در دماهای بالاتر از دمای بهینه (۳۷°C) به شدت کاهش یافته و این خود، بیان و در نتیجه



شکل ۷) ژل SDS-PAGE پروتئین‌های استخراج‌شده از کلون حاوی pET28a- $\alpha$ -synuclein پس از اضافه‌نمودن بافر لیزکننده به رسوب باکتری (ستون سمت چپ) شاخص وزن مولکولی باکتری BL21 (DE3) حاوی پلازمید نوترکیب القاننده (شاهد) (ستون B) معرف رسوب باکتری BL21 (DE3) حاوی پلازمید نوترکیب ۲ ساعت پس از القا با IPTG یک میلی‌مولار (ستون C) محلول رویی باکتری‌های لیزشده توسط بافر لیزکننده پس از سونیکاسیون و سانتریفیوژ (ستون D) رسوب باکتری‌های لیزشده توسط بافر لیزکننده پس از سونیکاسیون و سانتریفیوژ

## بحث

هدف پژوهش حاضر، کلون‌کردن DNA و بیان پروتئین آلفا- سینوکلئین در باکتری /شریشیالکی بود که سویه DH5 $\alpha$  و بیان آن در سویه BL21 (DE3) توسط پلازمید pET28a به‌منظور ایجاد روشی ساده و کارآمد برای تولید پروتئین آلفا- سینوکلئین استفاده شد. سامانه‌های بیانی pET از جمله بهترین و کثرت‌ها برای بیان پروتئین‌ها در باکتری /شریشیالکی به شمار می‌آیند، زیرا در درجه اول ژن‌های کلون‌شده در آنها تحت کنترل پروموتور T7 است که جزء قوی‌ترین پروموتورهای شناخته‌شده است و در نتیجه میزان بیان پروتئین کلون‌شده در باکتری را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. در درجه دوم، پروموتور T7 خود توسط اپراتور lac تنظیم می‌شود. بدین سان، زمان بیان ژن کلون‌شده در پلازمید تحت اختیار قرار می‌گیرد و به کمک آن می‌توان مراحل تکثیر پلازمید (به‌عنوان مثال در سویه‌های غیربیانی) و بیان پروتئین را از هم جدا نمود. علاوه بر این، سامانه‌های pET قادر به تولید مهارگر لک هستند. چنین قابلیت‌هایی موجب می‌شود که پلازمیدهای pET در سویه‌هایی که فاقد ژن بیان‌کننده این مهارگر هستند، هم‌کارا بوده و از بیان ناهنگام ژن کلون‌شده ممانعت به عمل آورند. مضاف بر این، تعداد نسخه‌های پلازمیدهای pET درون سلول‌های پروکاریوتی، کم و چیزی بین ۲۰ تا ۲۵ عدد در هر باکتری است. از این رو مشکلاتی که سایر پلازمیدهای دارای نسخه کم یا زیاد در باکتری ایجاد می‌نمایند، به‌عنوان مثال ایجاد مسمومیت در باکتری به‌واسطه بیان بالای پروتئین، بیان کمتر از حد مورد نیاز به‌دلیل کمبود پلازمید در سلول و ایجاد نوترکیبی بین پلازمیدها، در مورد سامانه‌های بیانی pET به‌ندرت بروز می‌کند. وکتور pRK172 پلازمیدی بیانی است، اما استخراج پروتئین از باکتری‌های واجد این پلازمید مستلزم جوشاندن رسوب باکتریایی در بافر لیزکننده، کروماتوگرافی تعویض یونی و استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز برای ممانعت از تخریب پروتئین نوترکیب توسط پروتئازهای میزبان است. کل فرآیند تخلیص نیز ۴ تا ۶ روز طول می‌کشد که خود احتمال تشکیل تجمعات پروتئینی را افزایش می‌دهد<sup>[29]</sup>. علاوه بر این، آلفا- سینوکلئین تخلیص‌شده به این

بیانگر پروتئین آلفا- سینوکلئین به روش شرح داده شده در این مقاله به بیان پروتئینی می‌انجامد که واجد یک اسیدآمین ه گلیسین اضافی در انتهای N خود است. زیرا پروتئاز TEV موجب برش توالی شناسایی خود در ناحیه بین اسیدآمین‌های گلیسین و گلوتامین می‌شود، هر چند وجود تنها یک گلیسین اضافی، تغییری در خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین ایجاد نمی‌نماید. علاوه بر این، با وجود کاهش چشمگیر نشت اپرون‌لک در نتیجه افزودن گلوکز به محیط کشت باکتری، بیان پیش از القا پروتئین نوترکیب حتی در مقادیر جزئی، از بازده نهایی کاسته و خطر شناسایی پروتئین نوترکیب توسط پروتئازهای باکتریایی را افزایش می‌دهد. پیشنهاد می‌شود که استفاده از برخی سوی‌های ویژه اشریشیا کلی همچون pLysS و pLYSE که واجد آنزیمی به نام لیزوزیم T7 هستند، می‌تواند این مشکل را برطرف نماید. لیزوزیم T7 مانع از عملکرد RNA پلیمراز T7 پیش از القا با IPTG شده و بیان به اصطلاح پایه پروتئین نوترکیب را تقریباً به‌طور کامل متوقف می‌نماید.

### نتیجه‌گیری

پروتئین آلفا- سینوکلئین در پلازمید pET28a کلون و تشکیل اجسام گنجانده توسط آلفا- سینوکلئین به‌هنگام بیان از سامانه pET28a- $\alpha$ -synuclein تایید می‌شود و راه را بر تولید این پروتئین در مقیاس بالا هموار می‌سازد.

**تشکر و قدردانی:** کلیه مراحل این کار در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه تهران انجام شد. بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را نسبت به تمام کسانی که ما را در انجام این مهم یاری رساندند ابراز می‌داریم.

**تاییدیه اخلاقی:** موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

**تعارض منافع:** هیچگونه تعارض منافع در این مقاله وجود نداشته است.

**سهم نویسندگان:** سارا شیخی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روشن‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ مهریار امینی‌نسب (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روشن‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ بابک صفاری (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روشن‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ سپیده عبدی (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

**منابع مالی:** از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تامین شده است.

### منابع

- 1- Goldstein DS, Sewell L, Holmes C. Association of anosmia with autonomic failure in Parkinson disease. *Neurology*. 2010;74(3):245-51.
- 2- Park A, Stacy M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2009;256(Suppl 3):293-8.
- 3- Wullner U, Schmitz-Hubsch T, Antony G, Fimmers R, Spottke A, Oertel WH, et al. Autonomic dysfunction in 3414 Parkinson's disease patients enrolled in the German Network on Parkinson's disease (KNP e.V.): The effect of ageing. *Eur J Neurol*. 2007;14(12):1405-8.
- 4- Reichmann H. Clinical criteria for the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*. 2010;7(5):284-90.
- 5- Braak H, Bohl JR, Muller CM, Rub U, de Vos RA, Del Tredici K. Stanley Fahn Lecture 2005: The staging

غلظت نهایی پروتئین را کم می‌کند. از سوی دیگر، باکتری اشریشیا کلی در pHهای خیلی پایین قابلیت رشد ندارد. از این رو برای افزایش احتمال تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی توسط آلفا- سینوکلئین که در واقع به خروج محصول از محیط عمل و افزایش بیان هر چه بیشتر آن می‌انجامد، تنها می‌توان به تغییر در مواد تشکیل‌دهنده محیط کشت، به‌کارگیری غلظت‌های مختلف IPTG و کم‌وزیاد نمودن مدت زمان انکوباسیون اکتفا نمود. شایان ذکر است که سرعت تشکیل اجسام گنجانده به‌شدت تحت تأثیر عواملی چون زمان، دما<sup>[33]</sup> و غلظت اولیه پروتئین<sup>[34]</sup> در محیط است. براساس داده‌های منتشرنشده همین گروه تحقیقاتی مشخص شده است که استفاده از غلظت‌های بالای IPTG (۱ تا ۲ میلی‌مولار) روی سویه DE3 باکتری اشریشیا کلی واجد پلازمید نوترکیب pET28a- $\alpha$ -synuclein به بیان سریع و انفجاری پروتئین آلفا- سینوکلئین می‌انجامد. این نرخ بالای تولید آلفا- سینوکلئین، احتمال شکل‌گیری اجسام گنجانده را افزایش داده و در زمان‌های کم انکوباسیون (۲ تا ۳ ساعت پس از القا) و دمای بهینه رشد باکتری (۳۷°C) به بیشترین میزان خود می‌رسد. چنین به نظر می‌رسد که باکتری در این مدت کم، اکثر منابع خود را صرف ساخت پروتئین نوترکیب می‌نماید. به همین نسبت نیز احتمال بیان سایر پروتئین‌های میزبان در این محدوده زمانی کاهش یافته و در نتیجه، ناخالصی محصول نهایی به حداقل می‌رسد.

طبق یافته‌های پژوهش حاضر و نیز نتایج حاصل از سایر پژوهش‌ها، رشد باکتری در محیط کشت واجد مقادیر اندک گلوکز موجب افزایش بیان آن دسته از پروتئین‌ها که مستعد تشکیل اجسام گنجانده‌اند می‌شود. محیط‌های LB واجد لاکتوز هستند که درون باکتری به گالاکتوز و گلوکز تجزیه می‌شود. وجود گالاکتوز، درون باکتری پیش از آن که IPTG به محیط اضافه شود، فعالیت تعدادی از مهارکننده‌های اپرون‌لک را مختل کرده و موجب بیان ضعیف یا اصطلاحاً نشستی ژن‌های تحت کنترل این اپرون و در نتیجه، بیان اندک پروتئین نوترکیب قبل از القا توسط IPTG می‌شود<sup>[35]</sup>. به دلیل هیدروفوبیسیته پایین آلفا- سینوکلئین، به‌احتمال فراوان، نرخ تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در چنین غلظت‌هایی، اندکی یا به‌شدت کاهش یافته یا به حد صفر تنزل خواهد یافت. از آن جا که آلفا- سینوکلئین، پروتئینی یوکاریوتی است و برای باکتری، غیربومی محسوب می‌شود، گونه محلول آن درون باکتری می‌تواند بر رشد ارگانیزم منفی گذاشته و در نهایت میزان نهایی پروتئین نوترکیب را نیز کاهش دهد. پژوهش حاضر نشان داد که افزودن مقادیر اندک از گلوکز (۰/۵ تا ۱٪) به محیط کشت LB مانع از نشستی اپرون‌لک و در نتیجه بیان زود هنگام و مضر سینوکلئین می‌شود و بازده نهایی را به طرز چشمگیری بهبود می‌بخشد.

در حال حاضر، اطلاعات زیادی در زمینه نقش دقیق پروتئین آلفا- سینوکلئین در روند بیماری‌زایی پارکینسون در دست نیست. با توجه به نقش کلیدی این پروتئین در پارکینسونیسم، تعیین عملکرد و انجام مطالعات ساختاری روی این پروتئین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. انجام چنین تحقیقاتی، مستلزم وجود پروتئین خالص‌شده آلفا- سینوکلئین است. از این رو، در پژوهش حاضر پروتئین آلفا- سینوکلئین در پلازمید pET28a کلون و شرایط بهینه بیان آن ارزیابی شد تا در آزمایش‌های آتی تخلیص شود و برای انجام تحقیق‌های مرتبط مورد استفاده قرار گیرد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان ذکر کرد که ساخت ژن

- 2007;27(12):3338-46.
- 21- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, et al. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(23):11282-6.
- 22- Neve RL, Selkoe DJ, Kurnit DM, Kosik KS. A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res*. 1986;387(2):193-6.
- 23- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett*. 1994;345(1):27-32.
- 24- Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, et al. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem*. 1999;274(14):9843-6.
- 25- Choi JY, Sung YM, Park HJ, Hur EH, Lee SJ, Hahn C, et al. Rapid purification and analysis of alpha-synuclein proteins: C-terminal truncation promotes the conversion of alpha-synuclein into a protease-sensitive form in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*. 2002;36(Pt 1):33-40.
- 26- Bisaglia M, Trolia A, Tessari I, Bubacco L, Mammi S, Bergantino E. Cloning, expression, purification, and spectroscopic analysis of the fragment 57-102 of human alpha-synuclein. *Protein Expr Purif*. 2005;39(1):90-6.
- 27- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(22):4673-80.
- 28- Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95-8.
- 29- Huang C, Ren G, Zhou H, Wang CC. A new method for purification of recombinant human alpha-synuclein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2005;42(1):173-7.
- 30- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT Jr. NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 1996;35(43):13709-15.
- 31- Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem*. 2001;276(14):10737-44.
- 32- Hashimoto M, Hsu LJ, Sisk A, Xia Y, Takeda A, Sundsmo M, et al. Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: Relevance for Lewy body disease. *Brain Res*. 1998;799(2):301-6.
- 33- De Groot NS, Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett*. 2006;580(27):6471-6.
- 34- Iljina M, Garcia GA, Horrocks MH, Tosatto L, Choi ML, Ganzinger KA, et al. Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(9):E1206-15.
- 35- Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;(17)5:172.
- procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord*. 2006;21:2042-51.
- 6- Shults CW. Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1661-8.
- 7- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6469-73.
- 8- Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:123-44.
- 9- Martin I, Dawson VL, Dawson TM. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2011;12:301-25.
- 10- Ozansoy M, Basak AN. The central theme of Parkinson's disease: Alpha-synuclein. *Mol Neurobiol*. 2013;47(2):460-5.
- 11- Bruinsma IB, Bruggink KA, Kinast K, Versleijen AA, Segers-Nolten IM, Subramaniam V, et al. Inhibition of alpha-synuclein aggregation by small heat shock proteins. *Proteins*. 2011;79(10):2956-67.
- 12- Buchman VL, Hunter HJ, Pinon LG, Thompson J, Privalova EM, Ninkina NN, et al. Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system. *J Neurosci*. 1998;18(22):9335-41.
- 13- Lavedan C, Leroy E, Dehejia A, Buchholtz S, Dutra A, Nussbaum RL, Polymeropoulos MH. Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene. *Hum Genet*. 1998;103(1):106-12.
- 14- Maroteaux L, Scheller RH. The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res*. 1991;11(3):335-43.
- 15- Shibasaki Y, Baillie DA, St Clair D, Brookes AJ. High-resolution mapping of SNCA encoding alpha-synuclein, the non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid precursor, to human chromosome 4q21.3-->q22 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;71(1):54-5.
- 16- Biskup S, Gerlach M, Kupsch A, Reichmann H, Riederer P, Vieregge P, et al. Genes associated with Parkinson syndrome. *J Neurol*. 2008;255(Suppl 5):8-17.
- 17- Loov C, Scherzer CR, Hyman BT, Breakefield XO, Ingelsson M. Alpha-synuclein in extracellular vesicles: Functional implications and diagnostic opportunities. *Cell Mol Neurobiol*. 2016;36(3):437-48.
- 18- Fink AL. The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc Chem Res*. 2006;39(9):628-34.
- 19- Lee MK, Stirling W, Xu Y, Xu X, Qui D, Mandir AS, et al. Human alpha-synuclein-harboring familial Parkinson's disease-linked Ala-53 --> Thr mutation causes neurodegenerative disease with alpha-synuclein aggregation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8968-73.
- 20- Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB. Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J Neurosci*.