

Solubilization and Refolding of Inclusion Body of *Grapevine fanleaf virus*-coat Protein Produced in *E. coli*

Razieh Yazdani

Former Ph.D. student, Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: r.yazdani1366@yahoo.com

Seyed Shahriar Arab

Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Fax: 02182884747, Email: sh.arab@modares.ac.ir

Afshin Hassani-Mehraban

Former Ph.D. student, Laboratory of Virology, Wageningen University, Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB, Wageningen, The Netherlands. Email: amehraban1966@yahoo.com

Masoud Shams-Bakhsh

* Professor, Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Fax: 02148292200, Email: shamsbakhsh@modares.ac.ir

Abstract

Objective

High level expression of recombinant protein in *Escherichia coli* often results in aggregation of the expressed protein molecules into inclusion bodies. Cysteines in the protein contribute to this process. Intermolecular and intramolecular disulfide bonds formation in Grapevine fanleaf virus (GFLV)-coat protein (CP), a cysteine-rich protein, and lead to aggregation when the recombinant protein was overexpressed in *E. coli*. Hence, aggregated proteins should be solubilized and allowed to refold to obtain native- or correctly- folded recombinant proteins.

Materials and methods

In this paper, SDS/MPD method used as a unique approach to refold the structure some protein in the presence of the denaturing agent, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). This was made possible by addition of the amphipathic solvent 2,4-Methyl-2-PentaneDiol (MPD),

used as protecting but also as refolding agent for these proteins. For this purpose, the inclusion bodies containing insoluble proteins of GFLV CP were solubilized by denaturing with SDS, then the soluble proteins were purified by the size exclusion chromatography, and finally, the purified proteins were refolded using SDS/MPD method.

Results

Transmission electron microscopy images confirmed the reassembly GFLV VLPs using SDS/MPD method.

Conclusions

MPD modulate the denaturing properties of SDS, therefore, for the first time, a simple and effective method to refolded GFLV VLP from the SDS-denatured state.

Keywords: cysteine-rich protein, size exclusion chromatography, transmission electron microscopy

Citation: Yazdani R, Arab SS, Hassani-Mehraban A, Shams-Bakhsh M (2019) Solubilization and refolding of inclusion body of *Grapevine fanleaf virus-coat* protein produced in *E. coli*. Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 151-167.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 151-167.

DOI: 10.22103/jab.2019.13125.1090

Received: January 24, 2019; Accepted: April 28, 2019

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

محلوسازی و تاخوردگی مجدد اجسام اینکلوزن پروتئین نوترکیب پوششی ویروس برگ

بادبزی مو تولید شده در *Escherichia coli*

راضیه یزدانی

دانش آموخته دوره دکترا ویروس شناسی گیاهی، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران،

ایران. دورنگار: 02182884717. ایمیل: r.yazdani1366@yahoo.com

شهریار عرب

استادیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. ایمیل: sh.arab@modares.ac.ir

افشین حسنی مهربان

دانش آموخته ویروس شناسی، دانشگاه واخنینگن، واخنینگن، هلند. ایمیل: amehraban1966@yahoo.com

مسعود شمسی بخش

* نویسنده مسئول، استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران. دورنگار:

02148292200، ایمیل: shamsbakhsh@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: 1397/11/04، تاریخ پذیرش: 1398/02/08

چکیده

هدف: سطوح بالای بیان ژن های خارجی در سلول های میزبان به ویژه در باکتری ها اغلب منجر به تشکیل اجسام اینکلوزن¹ می شود. وجود اسید آمینه سیستمین در ساختار پروتئین ها به تشکیل این اندامک نیز کمک می کند. پیوندهای دی سولفیدی درون و بین-مولکول های پروتئین غنی از سیستمین پوششی ویروس برگ بادبزی مو باعث تشکیل اجسام اینکلوزن پس از بیان در *Escherichia coli* می شود. از این رو به منظور به دست آوردن پروتئین نوترکیب با ساختار طبیعی، ضروری است پروتئین های تولید شده در سلول باکتری به شکل محلول درآیند.

¹- inclusion body

مواد و روش: در مطالعه حاضر برای تاخوردگی مجدد ساختار پروتئین‌ها از حلال آمفی‌پاتیک 2 متیل 2,4 پنتان دیول (MPD) در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS) استفاده شد. به این منظور ابتدا اجسام اینکلوزن حاوی پروتئین پوششی نامحلول ویروس برگ بادبزی مو با استفاده از عامل دناتوره کننده سدیم دودسیل سولفات محلول شد. سپس پروتئین پوششی محلول با استفاده از روش کروماتوگرافی اندازه² خالص‌سازی شد و در نهایت پروتئین‌های پوششی خالص با استفاده از روش MPD/SDS تاخوردگی شدند.

نتایج: تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری تاخوردگی مجدد ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو را تایید کرد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد حلال MPD سبب تعدیل خواص دناتوره کننده سدیم دودسیل سولفات شده و به این ترتیب روشی ساده، کارآمد و موثر برای تاخوردگی مجدد پروتئین پوششی غنی از سیستمین ویروس برگ بادبزی مو معرفی شد.

کلمات کلیدی: پروتئین غنی از سیستمین، کروماتوگرافی اندازه، میکروسکوپ الکترونی

مقدمه

سیستم بیانی باکتری *Escherichia coli* مزایای فراوانی دارد که سبب می‌شود به مثابه میکروارگانیسمی ارزشمند بتواند مقادیر زیادی پروتئین نو ترکیب تولید کند (Hodgson 1993). ویژگی‌های ژنتیکی و فیزیولوژیکی، زمان تکثیر کوتاه، سهولت دست‌ورزی، دانش ایجاد شده در تخمیر، توانایی رشد سریع و تراکم بالا در محیط‌های ساده و ارزان قیمت، در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های همسانه‌سازی و بیانی، سویه‌های جهش یافته میزبانی و سرانجام ظرفیت بالای تجمع پروتئین‌های خارجی (بیش از 20 درصد کل محتوای پروتئین سلولی)، باکتری *E. coli* را پر استفاده‌ترین میزبان برای تولید پروتئین‌های نو ترکیب ساخته است (Brown et al. 2008; Peleg & Unger 2008). به‌رغم همه این مزایا، هر ژنی در این میکروارگانیسم با کارایی بالا بیان نمی‌شوند (Frommer & Ninnemann 1995). ویژگی‌های ساختاری دقیق و منحصر به فرد توالی ژن، پایداری و بازده ترجمه mRNA، سهولت تاخوردن پروتئین، تجزیه پروتئین توسط پروتئازهای سلول میزبان، تفاوت‌های عمده در کدون‌های مورد استفاده ژن خارجی و *E. coli* و سمیت بالقوه پروتئین‌های نو ترکیب برای میزبان می‌توانند توانایی میکروارگانیسم را برای بیان ژن تحت تاثیر قرار دهد (Jana & Deb 2005; Peleg & Unger 2008). مهمترین اشکالات *E. coli* به عنوان یک سیستم بیانی، عدم توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه مورد نیاز پروتئین‌های یوکاریوتی، فقدان مکانیسم ترشح برای آزادسازی کارآمد پروتئین به محیط کشت، عدم توانایی تولید مقادیر بالای پروتئین محلول و توانایی محدود در تسهیل تشکیل پیوندهای دی-سولفیدی گسترده می‌باشد که به‌خصوص در پروتئین‌های غنی از سیستمین منجر به تشکیل اجسام اینکلوزن می‌شود (Sorensen & Mortensen 2005). به‌رحال برخی پیشرفت‌ها از جمله بیان پری‌پلاسمیک و یا تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها در شرایط

²- size exclusion chromatography

آزمایشگاهی برای افزایش مقدار پروتئین به شکل محلول و تولید پروتئین‌ها از جمله ذرات شبه‌ویروسی با بسته‌بندی صحیح در باکتری‌ها ایجاد شده است (Zhao & Zhang 1998; Mansell et al. 2008).

به طور کلی، اجسام اینکلوژن در غلظت‌های بالای عوامل کاتروپیک مانند اوره، گوانیدین هیدروکلراید و نمک‌های تیوسانات، مواد شوینده‌ای شبیه سدیم دودسیل سولفات³، و عوامل احیاء کننده مانند دی‌تیوتریتول⁴ (DTT) حل می‌شوند. تلاش برای تاخوردگی مجدد پروتئین اغلب با کاهش غلظت عامل دناتورده کننده با استفاده از روش‌های رقیق‌سازی، دیالیز و کروماتوگرافی انجام می‌شود. اما این روش‌ها با توجه به تمایل پروتئین‌ها به خصوص پروتئین‌های غنی از سیستئین به تشکیل اجسام اینکلوژن اغلب با شکست مواجه می‌شوند (Yamaguchi & Miyazaki 2014).

شوینده سدیم دودسیل سولفات به طور کارآمد و گسترده برای دناتورده کردن پروتئین‌ها استفاده می‌شود (Gimel & Brown 1996; Otzen 2002). حلال‌های آمفی‌پاتیک MPD، که به طور معمول برای مطالعات کریستالوگرافی استفاده می‌شوند (Anand et al. 2002)، پروتئین‌ها را می‌توانند از دناتورده شدن به وسیله‌ی سدیم دودسیل سولفات محافظت کنند و در چندین مورد توانستند پروتئین را از حالت دناتورده شده به واسطه سدیم دودسیل سولفات به حالت تاخوردگی تبدیل نمایند (Michaud et al. 2008). اثر حفاظتی MPD برای طیف گسترده‌ای از پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های غشایی و آنزیم‌های محلول گزارش شده و برای پروتئین‌های دناتورده شده در گوانیدین یا اوره قابل استفاده نیست. در مورد لیزوزیم سفیده تخم مرغ، غلظت بالای یک میلی‌مولار سدیم دودسیل سولفات مانع فعالیت آنزیم در غیاب MPD می‌شود. با این حال در غلظت دو مولار MPD، فعالیت آنزیم در حضور سدیم دودسیل سولفات حفظ شد. علاوه بر این، هنگامی که آنزیم برای اولین بار 24 ساعت قبل از اضافه کردن MPD با سدیم دودسیل سولفات دناتورده شده بود، فعالیت آنزیمی کامل در MPD دو مولار بعد از یک دوره انکوباسیون 24 ساعته بهبود یافت. این نتایج نشان داد استفاده از این روش علاوه بر پایداری ساختار پروتئین باعث حفظ فعالیت پروتئین نیز می‌شود (Michaux et al. 2008).

ویروس برگ بادبزنی مو متعلق به جنس نیپوویروس⁵ از خانواده سکویریدا⁶ است. ژنوم ویروس از دو قطعه RNA تک‌لا با قطبیت مثبت تشکیل شده است. هر RNA دارای یک ORF⁷ منفرد است که یک پلی‌پروتئین را رمز می‌کند. پلی‌پروتئین بزرگتر (تولید شده از RNA1) به پنج پروتئین عملکردی از جمله RNA پلی‌مراز شکسته می‌شود و پلی‌پروتئین کوچکتر (تولید شده از RNA2) به سه پروتئین $2A^{HP}$ ، $2B^{MP}$ و $2C^{CP}$ شکسته می‌شود (Vigne et al. 2004). ویروس برگ بادبزنی مو دارای ذرات پلی‌هدرال با قطر 28 نانومتر است که از 60 زیرواحد پروتئینی مشابه تشکیل شده است (Andret-Link et al. 2004). مدل ساختار سه بعدی ویروئین‌های ویروس برگ بادبزنی مو در پایگاه اطلاعات داده پروتئینی (PDB) با شماره دسترسی

³ Sodium dodecyl sulfate

⁴ dithiothreitol

⁵- *Nepovirus*

⁶- *Secoviridae*

⁷- Open reading frame

4V5T موجود است که براساس این مدل ساختاری مشخص شده که شبکه پلی‌هدرال ویریون تقارن $T=3$ دروغی دارد و هر زیرواحد پروتئین پوششی شامل سه دامنه موزی دوزنقه‌ای شکل (Jelly-roll) A, B و C است. پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو یک پروتئین غنی از سیستئین است و هر زیرواحد پروتئین پوششی شامل 12 سیستئین می‌باشد (Schellenberger et al. 2011)

ذرات شبه‌ویروسی که تاکنون مطالعه شده‌اند تنها بخش کوچکی از تنوع زیستی کل ویروس‌ها بوده‌اند بررسی سایر ویروس‌های گیاهی به عنوان ذرات شبه‌ویروسی با توجه به ویژگی‌های متنوع مورفولوژی کپسید و ساختارهای ویروسی برای کاربرد در نانوپزشکی می‌تواند مفید باشد (Lee & Wang 2006). از آن جایی که پروتئین پوششی ویروس گیاهی برگ بادبزی مو تاکنون برای تولید ناقل جدید مورد بررسی قرار نگرفته و با توجه به محدودیت‌هایی که برای تولید ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو در باکتری *E. coli* وجود دارد، معرفی روش کارآمد و سریع برای تولید این ذرات شبه‌ویروسی در شرایط کنترل شده⁸ می‌تواند ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو را به عنوان ناقل جدید معرفی کند و در نتیجه امکان تولید واکسن، ارسال دارو، هدف قرار دادن سلول و تصویربرداری زیستی با استفاده از این ناقل جدید را فراهم کند. در این مطالعه به منظور تولید پروتئین نوترکیب پوشش پروتئین ویروس برگ بادبزی مو ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو در ناقل pET26 همسانه و سپس پروتئین مذکور در سویه‌ی SHuffle@T7 (C3029H) باکتری *E. coli* به صورت اجسام اینکلوژن بیان شدند (Yazdani 2018). ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو با استفاده از روش SDS/MPD در شرایط کنترل شده تاخورد شده‌اند. این گزارش اولین توصیف از بسته‌بندی ذرات شبه‌ویروسی به روش SDS/MPD است.

مواد و روش

سازه pET26 GFLV CP ژن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو در چهارچوب خوانش شامل توالی Pel B
در ناقل pET26 استفاده شد (Yazdani, 2018). بیان پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو در *E. coli* سویه (C3029H) SHuffle@T7: به منظور القاء و بیان پوشش پروتئینی برگ بادبزی مو، ناقل‌های نوترکیب حاوی ژن پروتئین پوششی با استفاده از روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه‌های بیانی SHuffle@T7 (C3029H) منتقل شد (Sambrook & Russell 2001) بیان پروتئین نوترکیب به روش یزدانی و همکاران در 2018 انجام شد (Merck, Darmstadt, Germany). در این تحقیق ژل آکریل‌آمید (12 درصد)، بافر بارگذاری (1×) و محلول‌های رنگ‌آمیزی کوماسی بلو (R-250) از شرکت Biolabs تهیه شد.

⁸ - *in vitro*

وسترن بلات: برای آنالیز وسترن بلات از آنتی بادی اولیه با رقت 1/1000 (3 میکرولیتر آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی تولید شده علیه ذرات ویروسی برگ بادبزنی مو (شرکت DMSZ، آلمان) استفاده شد. در نهایت کاغذ نیتروسولوز به مدت یک دقیقه در معرض معرف‌های ECL طبق دستور شرکت تولید کننده قرار گرفت (Thermo Scientific, Waltham, USA) (Amersham™ Imager).

محلول سازی و مونتاژ ذرات شبه ویروسی برگ بادبزنی مو: جداسازی اجسام اینکلوژن: رسوب حاصل از یک لیتر (کشت باکتری) بیان در 50 میلی لیتر بافر محلول سازی (0/2 Tris/HCl، 0/01 SDS، 0/015 DTT) 0 مولار در pH 8 حل شد. شکستن دیواره‌ی سلولی باکتریایی با استفاده از همگن ساز فراصوت با سه تکرار و روی یخ انجام شد. محلول سپس به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس و 13000 سانتریفیوژ شد و روشنین حذف شد. در ادامه با بافرهای شستشو یک (0/05 Tris/HCl، 0/05 EDTA، 1 مولار، سدیم کلراید 0/05 EDTA، 0/05 مولار و ترتیون ایکس 0/5 درصد تهیه و pH روی 8 تنظیم و قبل از استفاده 0/001 DTT (مولار به بافر اضافه شد)، دو (حاوی 0/05 Tris/HCl، 0/05 EDTA، 0/005 Triton x-100 درصد تهیه و pH روی 8 تنظیم قبل از استفاده 0/001 DTT (مولار به بافر اضافه شد) به ترتیب زیر برای حذف پروتئین‌های اضافه شستشو داده شد. رسوب حل شده در بافر شستشو یک با استفاده از همگن ساز فراصوتی روی یخ یکنواخت شد. محلول به مدت 30 دقیقه در دمای محیط قرار داده شد سپس به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سلسیوس و 8000g سانتریفیوژ شد و روشنین حذف شد. مرحله‌ی شستشو با بافر شستشو دو نیز به همین ترتیب تکرار شد (Merck, Darmstadt, Germany). به منظور حل کردن پروتئین 30 میلی لیتر بافر محلول سازی روی رسوب ریخته شد و به مدت 24 ساعت در دمای 4 درجه سلسیوس نگه داری شد.

خالص سازی پروتئین به روش کروماتوگرافی ژل صافی⁹: زیرواحدهای پوشش پروتئینی با استفاده از ستون SUPERDEX 200 و بافر خالص سازی (0/2 Tris/HCl، 0/1 SDS، 0/015 DTT) 0 مولار و سدیم کلراید 2/5 مولار در pH 8) براساس کروماتوگرافی ژل صافی در سیستم کروماتوگرافی Bio-Rad خالص شدند (Merck, Darmstadt, Germany). برای تعویض بافر نمونه‌های پروتئین خالص شده از ستون HiTrap 5 ml استفاده شد و نمک سدیم کلراید و DTT از نمونه‌ها حذف شد.

مونتاژ پروتئین پوششی برگ بادبزنی مو با استفاده از MPD: در این روش در pH اسیدی (pH 6) و قلیایی (pH 8) و دماهای 25 و 4 درجه سلسیوس برای مونتاژ مورد آزمایش قرار گرفت. برای مونتاژ پروتئین پوششی، مقدار 150 میکرو-لیتر پروتئین پوششی خالص شده، 60 میکرولیتر بافر 5x (مقدار 50 میکرولیتر تریس 1 مولار (pH 8)، 0/01567 فرم احیا گلوتاتیون (GSH) و 0/03283 فرم اکسید شده گلوتاتیون (GSSG) با آب مقطر به حجم نهایی 5 میلی لیتر رسانده شد. این محلول در

⁹ - gel filtration chromatography

یخچال به مدت 4 ماه قابل نگهداری است)، مقدار 57/5 میکرولیتر MPD (7/83 مولار) و 22/5 میکرولیتر SDS (60 میلی-مولار) را به 32/5 میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه و حداقل به مدت سه شبانه روز در دمای اتاق نگهداری شد. مقدار 1/5 میلی-مولار MPD و 5 میلی-مولار SDS به ازای هر 10 میلی-گرم پروتئین استفاده شد. مواد مورد نیاز برای بسته‌بندی پروتئین مخلوط شد و حداقل به مدت سه شبانه روز در دمای اتاق نگهداری شد.

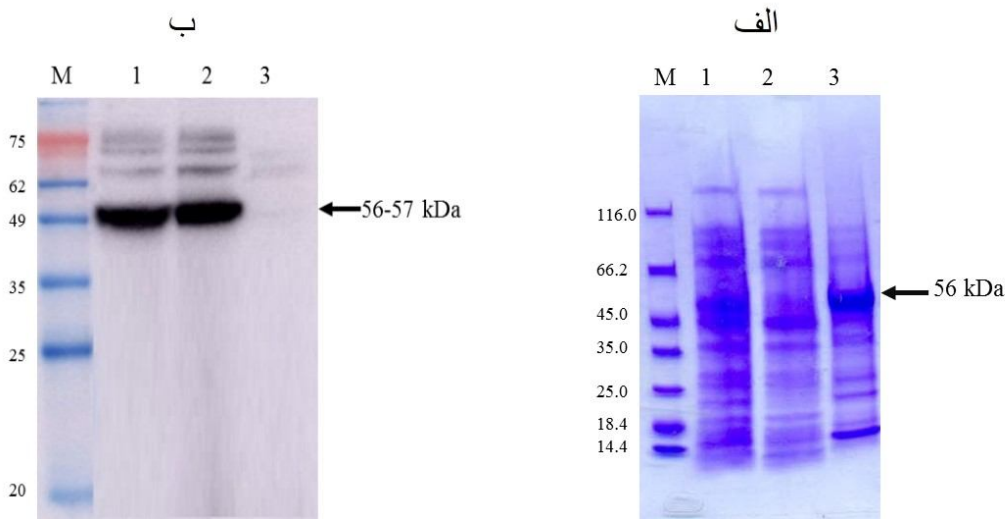
آنالیز ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری: برای به‌دست آوردن شواهد مستقیم از تشکیل ذرات شبه‌ویروسی از میکروسکوپ الکترونی عبوری به روش رنگ‌آمیزی منفی استفاده شد (Jeol JEM-1400, Jeol, Zaventem, Belgium). مقدار 10 میکرولیتر از پروتئین خالص شده برای 2 دقیقه روی پولک‌های میکروسکوپ الکترونی قرار داده شد. قطعه نمونه به وسیله کاغذ خشک کن جذب شده تا سطح پولک خشک شد. سپس پولک‌ها روی استات اورانیل 2 درصد برای رنگ‌آمیزی قرار داده شد و بعد از دو دقیقه این رنگ از روی پولک حذف شد و در مرحله‌ی آخر زیر دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری مشاهده شد (Hassani-Mehraban et al. 2015).

نتایج

بیان پروتئین نوترکیب پوشش پروتئینی برگ بادبزی مو: حضور باند پروتئینی به اندازه 56 کیلو دالتون در سویه‌ی SHuffle@T7 (C3029H) باکتری *E. coli* تراریخت القاء شده با 0/25 میلی-مولار IPTG بعد از 4 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس نشان دهنده بیان پروتئین پوششی برگ بادبزی مو در سلول‌های باکتری *E. coli* بود (شکل 1-الف). بیشتر-ین میزان پروتئین بیان شده نامحلول و به صورت اجسام اینکلوزن بود (چاهک 3 شکل 1-الف).

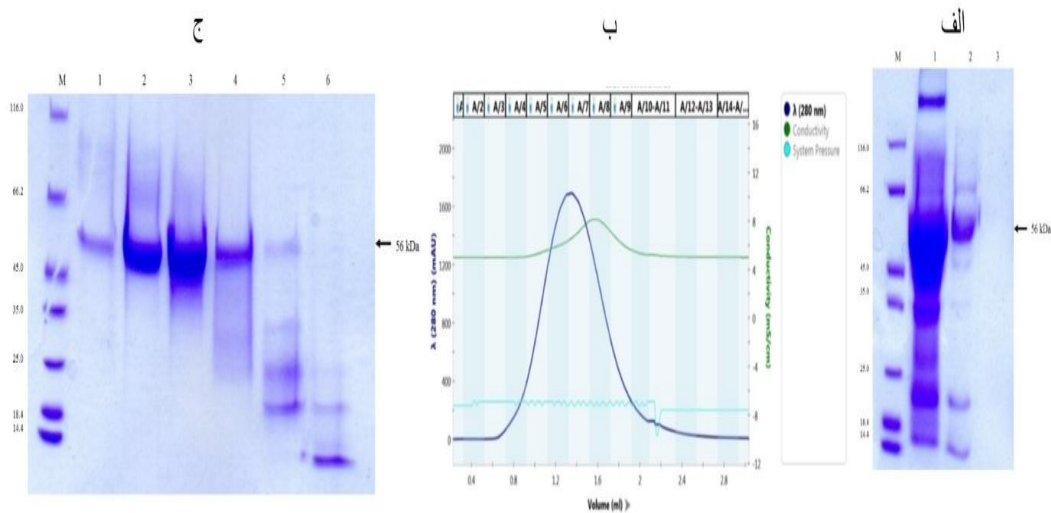
پس از انجام SDS-PAGE نمونه‌های پروتئینی و انجام مراحل وسترن بلات، آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه پروتئین پوششی برگ بادبزی مو با پروتئین نوترکیب بیان شده در سلول باکتری متصل شدند و این نتیجه ارتباط سرولوژیکی آنتی‌بادی با پروتئین نوترکیب و صحت ماهیت پروتئین پوششی برگ بادبزی مو را تایید کرد (شکل 1-ب).

محلول‌سازی و مونتاژ ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو: در این روش ابتدا اجسام اینکلوزن حاوی پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو در 10 میلی-مولار حل شدند (چاهک 1 و 2 شکل 2-الف). پس از محلول‌سازی پروتئین‌ها به منظور خالص‌سازی پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو از ستون کروماتوگرافی اندازه SUPERDEX 200 استفاده شد. فاز استخراج شامل یک پیک اصلی بود (شکل 3-ب) که آنالیز SDS-PAGE نشان داد که پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی مو در بخش‌های A6 و A7 از این پیک خالص شدند (چاهک‌های 2 و 3 شکل 2-ج).



شکل 1. بیان پروتئین نو ترکیب پوششی ویروس برگ بادبزنی مو در ناقل بیانی pET26. الف) آنالیز بیان پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از SDS-PAGE. چاهک 1: پروتئین عصاره باکتری نو-ترکیب القاء شده. چاهک 2: پروتئین های روشن شده باکتری نو ترکیب القاء شده. چاهک 3: رسوب باکتری نو-ترکیب القاء شده. M: نشانگر اندازه پروتئین unstained (116-14,4 کیلو دالتون). ب) آنالیز وسترن بلات بیان پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از آنتی بادی آنتی GFLV CP. چاهک 1 و 2: بیان پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو پس از القاء. چاهک 3: کنترل منفی (ناقل pET26b فاقد ژن پروتئین پوششی برگ بادبزنی مو). M: نشانگر اندازه پروتئین prestained (10-180 کیلو دالتون)

Figure 1. Expression of recombinant protein in GFLV CP pET26 vector. A. analysis of GFLV CP expression by SDS-PAGE. Lane 1: total protein of induced bacteria. Lane 2: supernatant proteins of induced bacteria. Lane 3: pellet proteins of induced bacteria. Lane M: unstained protein ladder 14.4-116 KDa. B) Western blot analysis of GFLV CP expression of GFLV CP using anti-GFLV CP antibody. Lane 1 and 2: GFLV CP expression after induction. Lane 3: negative control (empty pET26). Lane M: stained protein ladder 10-180 kDa

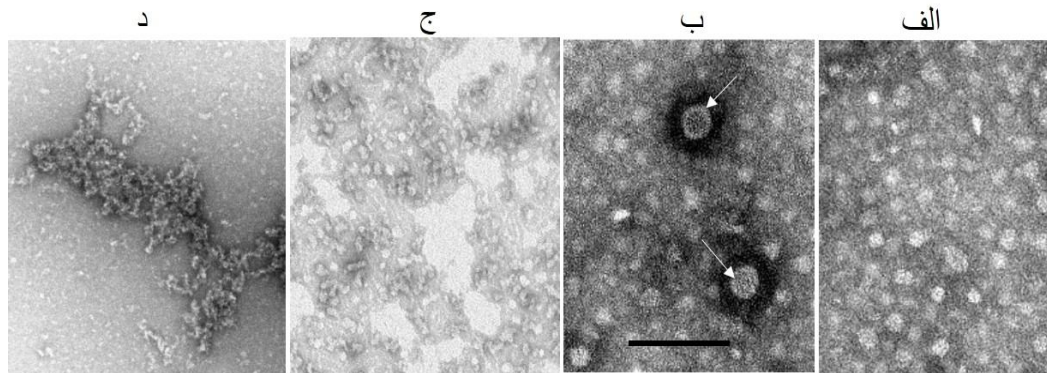


شکل 2. محلول‌سازی و خالص‌سازی پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو. الف) تایید محلول شدن پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از آنالیز SDS-PAGE. چاهک M: نشانگر وزن پروتئین. چاهک 1: پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو محلول شده 16 ساعت بعد از محلول‌سازی. چاهک 2: پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو 4 ساعت بعد از محلول‌سازی. چاهک 3: رسوب محلول 16 ساعت بعد از محلول‌سازی. ب) منحنی خالص‌سازی پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از ستون کروماتوگرافی اندازه (SUPERDEX 200). ج) آنالیز SDS-PAGE نمونه‌های خروجی کروماتوگرافی اندازه. چاهک M: نشانگر اندازه پروتئین unstained (4-116/14 کیلو دالتون). چاهک 1-6: نمونه‌های خروجی A5- A10

Figure 2. Solubilization and purification of GFLV CP. A) SDS-PAGE analysis of GFLV CP solubilization. Lane M: unstained protein ladder. Lane 1: solubilized GFLV CP after 16 hours. Lane 2: solubilized GFLV CP after 4 hours. Lane 3: solution pellet after 16 hours. B) Purification curve of GFLV CP by size exclusion chromatography (SUPERDEX 200). C) SDS-PAGE analysis of size exclusion chromatography. Lane M: unstained protein ladder 14.4-116 kDa. Lane 1-6: fractions A5-A10

آنالیز ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزنی مو با استفاده از میکروسکوپ الکترونی: حضور ذرات به اندازه حدود 30 نانومتر در نمونه‌های حاوی ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزنی مو (شکل 3-ب) و عدم وجود این ذرات در نمونه‌های حاوی زیر واحدهای پروتئین پوششی برگ بادبزنی مو (شکل 3-الف) تایید کننده مونتاژ ذرات شبه‌ویروسی در شرایط کنترل شده بود. همچنین

عدم وجود ذرات در شرایط مونتاژ اسیدی (pH 6) (شکل 4-ج) و دمای 4 درجه‌ی سلسیوس (شکل 4-د) نشان داد که بهترین شرایط برای مونتاژ ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو در شرایط قلیایی (pH 8) و دردمای اتاق (25 درجه سلسیوس) بود.



شکل 3. آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری ذرات شبه‌ویروسی. الف) کنترل منفی پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزی قبل از بسته‌بندی. ب) بسته‌بندی ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو در دمای 25 درجه سلسیوس و pH 8. ج) بسته‌بندی ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو در pH 6 و دمای 25 درجه سلسیوس. د) مونتاژ ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو در pH 8 و دمای 4 درجه سلسیوس (Reference bar 100 nm)

Figure 3. Transmission electron microscopy analysis of GFLV VLP. A) GFLV CP before reassembly. B) Reassembly of GFLV VLP at 25 °C and pH=8. C) Reassembly of GFLV CP VLP at 25 °C and pH=6. D). Reassembly of GFLV VLP at 4 °C and pH=8. Reference bar 100 nm

بحث

در این تحقیق، یک روش جدید کارآمد و آسان برای تولید ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو از اجسام اینکلوزن تولید شده در سیستم بیانی *E. coli* معرفی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مونتاژ ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزی مو را تایید کردند. سطوح بیان بالای ژن‌های خارجی در سلول‌های میزبان به خصوص در *E. coli* اغلب منجر به تشکیل اجسام اینکلوزن می‌شود و می‌تواند تا 30 درصد از کل پروتئین تولید شده در سلول میزبان را به خود اختصاص دهد. علاوه بر این تاخوردگی صحیح بسیاری از پروتئین‌ها نیازمند شکل‌گیری باندهای دی‌سولفیدی یا گلیکوزیلاسیون است که در *E. coli* انجام نمی‌شوند. بنابراین بیان بسیاری از پروتئین‌ها در *E. coli* مقدار زیادی از پروتئین‌های تانخورده (Sivashanmugam et al. 2009) یا اشتباه تاخورده (Rosano et al. 2009) را در سیتوپلاسم ایجاد می‌کند، جایی که این پروتئین‌ها تمایل دارند تجمع یابند و اجسام اینکلوزن را ایجاد کنند (Huang et al. 2012). اجسام اینکلوزن غیرمحلول بوده و در بعضی شرایط مانع قابل توجه در به-

دست آوردن پروتئین فعال می‌باشد. با این وجود در برخی از موارد اجسام اینکلوژن مفید می‌باشند چرا که تولید با بازده بالا صورت می‌گیرد، نسبت به تجزیه‌ی پروتئین مقاومند، تغلیظ آن‌ها با سانتریفیوژ آسان‌تر است و حداقل آلودگی را با سایر پروتئین‌ها دارند (Demain & Vaishnav 2009). بسیاری از داروهای تجاری شده مانند اینترفرون‌ها و اینترلوکین‌ها به صورت اجسام اینکلوژن تولید می‌شوند (Huang et al., 2012).

در این مطالعه نیز پروتئین پوششی برگ بادبزنی مو به‌رغم دارا بودن توالی *Pel B* نامحلول و به شکل اجسام اینکلوژن تولید شدند که این مشاهده مطابق نتایج مطالعه هووارد (2005) می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئین پوششی برگ بادبزنی مو یک پروتئین غنی از سیستین است و بر اساس مطالعات قبلی تعاملات داخل مولکولی و بین مولکولی اتصال‌های دی-سولفیدی در پروتئین‌های غنی از سیستین، مانند کیتیناز، به فرآیند تشکیل اجسام اینکلوژن پروتئین‌های نو ترکیب در *E. coli* کمک می‌کند و براساس این اطلاعات حضور تعداد زیاد سیستین در توالی پروتئین پوششی برگ بادبزنی مو سبب تشدید تشکیل اجسام اینکلوژن در *E. coli* است (Moghadam et al. 2015).

مطابق با نتایج بدست‌آمده در این بررسی گزارش‌هایی از نامحلول بودن پروتئین پوششی نو ترکیب برخی ویروس‌ها وجود دارد (Willits et al. 2003; Kumari et al. 2001; Shams-Bakhsh & Symons 2004; Hassani-Mehraban et al. 2015) علاوه بر این در بسیاری از مطالعات دیگر، پروتئین‌های پوششی ویروسی به صورت محلول در باکتری بیان شده‌اند (Saini & Vрати 2003; Bragard et al. 2000; Babin et al. 2013; Kalnciema et al. 2012).

به‌طور کلی، اجسام اینکلوژن به وسیله عوامل کاتوتروپیک حل می‌شوند. این عوامل شیمیایی باعث کاهش برهمکنش غیر-کوالانسی بین پروتئین‌ها و کاهش تشکیل اتصال‌های دی‌سولفیدی نامطلوب بین یا درون مولکول‌ها می‌شوند (Yamaguchi & Miyazaki 2014). در این بررسی از عامل دناتوره کننده سدیم دودسیل سولفات برای محلول‌سازی پروتئین‌ها استفاده شد. عامل دیگر بافر محلول‌سازی DTT است که می‌تواند سیستین را در شکل احیاء شده نگه دارد و مانع تشکیل اتصال‌های دی‌سولفیدی در طول مرحله‌ی محلول‌سازی شود (Lilie et al. 1998).

پس از حل پروتئین‌های نامحلول، آن‌ها باید به شکل محلول در آمده و مجدداً تاخورد شده شوند. اکثر روش‌های تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها بر اساس حذف عامل دناتوره کننده شیمیایی است. در روش ارایه شده در این بررسی، حلال MPD برای تغییر خواص دناتوره کننده در غلظت‌های ثابت عامل دناتوره کننده استفاده شد. این ترکیب قادر به تبدیل سدیم دودسیل سولفات از یک ماده شوینده دناتوره کننده سخت به یک ماده شوینده غیردناتوره کننده ملایم است که تعامل ضعیفی با پروتئین دارد (Privé, 2007). برخلاف مواد شوینده غیردناتوره کننده مانند سیکلودکستران که در گرفتن سایت‌های متصل شونده پروتئین با سدیم دودسیل سولفات رقابت می‌کنند در این روش هم‌حلال MPD خواص دناتوره کننده سدیم دودسیل سولفات را تعدیل می‌کند و منجر به تاخوردگی مجدد پروتئین دناتوره شده در حضور سدیم دودسیل سولفات می‌شود (Lau & Bowie 1997; Rozema & Gellman 1997).

گروهی از حلال‌ها که MPD در آن قرار دارد و در تاخوردگی مجدد پروتئین‌های دناتوره شده با سدیم دودسیل سولفات موثر هستند دارای خواص مشترک از جمله چربی دوستی پایین، حلال در آب و غیردناتوره کننده (یا به مقدار خیلی جزئی دناتوره کننده) هستند (Michaux et al. 2008).

برهمکش سدیم دودسیل سولفات و ترکیبات دو گانه دوست (آمفی‌فیلیک) به طور گسترده مطالعه شده‌است. بدیهی است که خواص میسل‌های ترکیب شده الکل/سدیم دودسیل سولفات به‌طور قابل توجهی متفاوت از میسل‌های سدیم دودسیل سولفات خالص است. مونو و دی‌الکل‌های چربی دوست غلظت‌های میسلی بحرانی سدیم دودسیل سولفات را کاهش می‌دهند، و در نتیجه مقدار تجمع پروتئین و غلظت بار سطحی میسل‌های سدیم دودسیل سولفات را کاهش می‌دهند. این احتمال وجود دارد که این کاهش در غلظت بار میسلار به کاهش خواص دناتوره کننده پروتئین سخت از میسل‌های/سدیم دودسیل سولفات الکل نسبت به میسل‌های سدیم دودسیل سولفات خالص کمک می‌کند. در این راستا، مسئله‌ای که قابل توجه است این است که زنجیره‌ی پلی-پپتید در پروتئین‌های دناتوره شده با سدیم دودسیل سولفات نشان داده شده به طور عمده در منطقه‌ی headgroup از میسل‌های سدیم دودسیل سولفات تعامل دارند و پیشنهاد شده که اثرات توصیف شده در این روش ناشی از تأثیرات رقابتی بین الکل‌های آمفی‌پاتیک و پپتیدها برای سایت‌های متصل شونده مشابه در منطقه‌ی headgroup میسل‌های سدیم دودسیل سولفات است (Romani et al. 2001; Ibel et al. 1990).

هر دو ماده MPD و سدیم دودسیل سولفات روی ساختار و حلالیت پروتئین‌ها تأثیر می‌گذارند و اثرات ترکیبی آن‌ها دارای خواص غیرمنتظره‌ای است. این خاصیت MPD و سدیم دودسیل سولفات متضاد با اسمولیت‌های متصل شونده ضعیف است که به طور مستقل عمل کرده و اثر هم‌افزایی روی هم ندارند (Holthauzen & Bolen 2007). عملکرد سیستم حلال در این جا وابسته به تعادل غلظت‌های سدیم دودسیل سولفات و MPD است. به طور کلی حلال‌های SDS/MPD می‌توانند ابزاری جدید برای مطالعه تاخوردگی مجدد پروتئین‌ها فراهم کنند. اما توصیف کامل‌تر این سیستم نیاز به درک اثرات متقابل پیچیده بین پروتئین-سدیم دودسیل سولفات، پروتئین-MPD و MPD-SDS دارد (Shweitzer et al. 2004; Michaux et al. 2008).

در روش رقیق‌سازی از فرم احیا گلوتاتیون (GSH) و فرم اکسید شده گلوتاتیون (GSSG) در بافر تاخوردگی استفاده شد. در پروتئین‌های غنی از سیستئین، ساخت پیوندهای دی‌سولفیدی منجر به تشکیل ساختارهای دایمر پروتئین می‌شود. در مرحله‌ی تاخوردگی اکسیداسیون اتصال‌های دی‌سولفیدی می‌تواند به وسیله گروه تیول گلوتاتیون به عنوان سیستم بازسازی، که در دو شکل کاهش یافته و اکسید شده وجود دارند (فرم احیا گلوتاتیون (GSH) و فرم اکسید شده گلوتاتیون (GSSG))، انجام شود. مقدم و همکاران (2015) و سوچی و همکاران (1987) به طور موفقیت‌آمیز گلوتاتیون را برای تاخوردگی مجدد پروتئین‌های غنی از سیستئین اینترلوکین-2 و کیتیناز به کار بردند. قیمت بالا گلوتاتیون‌ها از معایب استفاده از آن‌ها در فرآیند تاخوردگی مجدد پروتئین محسوب می‌شود. از آن جایی که پروتئین‌ها به خصوص پروتئین‌های غنی از سیستئین، در غلظت‌های بالا مستعد تجمع هستند،

روش SDS/MPD می‌تواند یک روش انتخابی برای تاخوردگی پروتئین‌های غنی از سیستمین باشد (Moghadam et al. 1987; Buchner et al. 1992; Tsuji et al. 2015)

مطالعات میکروسکوپ الکترونی عبوری پس از خالص‌سازی و عبور از کروماتوگرافی اندازه و مونتاز ذرات با استفاده از روش MPD/SDS ذراتی با قطر 30 نانومتر در شرایط کنترل شده را نشان داد که تایید کننده‌ی جمعیت همگن ذرات به روش MPD/SDS بود. در این جا سیستم بیانی نو ترکیب برای تعیین سیستمی با عملکرد بالا و تولید آسان ذرات شبه‌ویروسی برگ باد-بزنی مو خالص ارزیابی شد و نشان داده شد که این سیستم بیانی قادر به تولید ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزنی مو بود. طبق آخرین اطلاعات ما، قابلیت تاخوردگی مجدد پروتئین پوششی ویروس برگ بادبزنی مو با استفاده از روش MPD/SDS منحصر به فرد است و در نتیجه ذرات شبه‌ویروسی برگ بادبزنی مو رابه عنوان یک نانوحامل برجسته معرفی می‌کند.

سپاسگزاری

از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس برای انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

منابع

یزدانی راضیه (1397) بررسی امکان نمایش اپی توپ‌های خارجی در سطح ویروس برگ بادبزنی مو. رساله دکتری ویروس شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

References

- Anand K, Pal D, Hilgenfeld R (2002) An overview on 2-methyl-2, 4-pentanediol in crystallization and in crystals of biological macromolecules. Acta Crystallographica Section D 58, 1722-1728.
- Andret-Link P, Laporte C, Valat L et al. (2004) *Grapevine fan leaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. J Plant Pathol 86, 183-195.
- Babin C, Majeau N, Leclerc, D (2013) Engineering of papaya mosaic virus (PapMV) nanoparticles with a CTL epitope derived from influenza NP. J Nanobiotechnology 11, 10.
- Bragard C, Duncan GH, Wesley SV et al. (2000) Virus-like particles assemble in plants and bacteria expressing the coat protein gene of Indian peanut clump virus. J Gen Virol 81, 267-272.
- Brown BL, Hadley M, Page, R (2008) Heterologous high-level *E. coli* expression, purification and biophysical characterization of the spine-associated RapGAP (SPAR) PDZ domain. Protein Expr and Purif 62, 9-14.

- Buchner J, Pastan I, Brinkmann U (1992) A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* 205, 263-70.
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27, 297-306.
- Frommer WB, Ninnemann O (1995) Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 46, 419-444.
- Gibson DG, Young L, Chuang RY et al. (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343.
- Gimel JC, Brown W (1996) A light scattering investigation of the sodium dodecyl sulfate-lysozyme system. *J Chem Phys* 104, 8112-8117.
- Hassani-Mehraban A, Creutzburg S, Heereveld L, Kormelink R (2015) Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations. *BMC Biotechnol* 15, 80-96.
- Hodgson J (1993) Expression systems: A user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. *Biotechnol (Nature Publishing Company)* 11, 887-893.
- Holthauzen LM, Bolen DW (2007) Mixed osmolytes: the degree to which one osmolyte affects the protein stabilizing ability of another. *Protein Sci* 16, 293-298.
- Huang CJ, Lin H, Yang X, (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(3), 383-399.
- Howard RL (2005) Cloning and expression of *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase (*cbhI.2*). *Afr J Biotechnol* 4, 1180-1184.
- Ibel K, May RP, Kirschner K et al. (1990) Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate-protein complexes as determined by neutron scattering. *Eur J Biochem* 190, 311-318.
- Jana S, Deb J (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 289-298.
- Kalnciema I, Skrastina D, Ose V, Pumpens P et al (2012) Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol Biotechnol* 52, 129-139.
- Kumari SG, Makkouk KM, Katul L, Vetten HJ (2001) Polyclonal antibodies to the bacterially expressed coat protein of Faba bean necrotic yellows virus. *J Phytopathol* 149, 543-550.
- Lau FW, Bowie JU (1997) A method for assessing the stability of a membrane protein. *Biochemistry* 36, 5884-5892.

- Lee LA, Wang Q (2006) Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine: Nanomedicine* 2, 137-149.
- Lilie H, Schwarz E, Rudolph R (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 9, 497-501.
- Mansell TJ, Fisher AC, Delisa MP (2008) Engineering the protein folding landscape in gram-negative bacteria. *Curr Protein Pept Sci* 9, 138-149.
- Michaud C, Pomroy NC, Privé GG (2008) Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents. *J Mol Biol* 375, 1477-1488.
- Michaux C, Pouyez J, Wouters J, Privé GG (2008) Protecting role of cosolvents in protein denaturation by SDS: a structural study. *BMC Struct Biol* 8, 29.
- Moghadam M, Ganji A, Varasteh A et al. (2015) Refolding process of cysteine-rich proteins: chitinase as a model. *Rep Bioch Mol Biol* 4, 19.
- Otzen DE. (2002) Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. *Biophys J* 83, 2219-2230.
- Peleg Y, Unger T (2008) Application of high-throughput methodologies to the expression of recombinant proteins in *E. coli*. In *Structural Proteomics* 197-208. Humana Press.
- Prive GG (2007) Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* 41, 388-397.
- Romani AP, Gehlen MH, Lima GA, Quina FH (2001) The change in the properties of sodium dodecyl sulfate micelles upon addition of isomeric and unsaturated short-chain alcohols probed by photophysical methods. *J Colloid Interface Sci* 240, 335-339.
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5, 172.
- Rozema D, Gellman SH (1996) Artificial chaperone-assisted refolding of carbonic anhydrase B. *J Biol Chem* 271, 3478-3487.
- Saini M, Vrati S (2003) A Japanese encephalitis virus peptide present on Johnson grass mosaic virus-like particles induces virus-neutralizing antibodies and protects mice against lethal challenge. *J Virol* 77, 3487-3494.
- Sambrook J, Russell D W (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* (3-volume set). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schellenberger P, Sauter C, Lorber B, Bron P et al. (2011) Structural insights into viral determinants of nematode mediated Grapevine fanleaf virus transmission. *PLoS Pathog* 7, e1002034.
- Shams-Bakhsh M, Symons R H (2004) Cloning and expression of the coat protein gene of Barley yellow dwarf virus-PAV in *Escherichia coli*. *Iran J Biotech* 2, 84-89.

- Shweitzer B, Zanette D, Itri R (2004) Bovine serum albumin (BSA) plays a role in the size of SDS micelle-like aggregates at the saturation binding: the ionic strength effect. *J Colloid Interface Sci* 277, 285-291.
- Sivashanmugam A, Murray V, Cui C et al. (2009) Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Sci* 18(5), 936-948.
- Sorensen HP, Mortensen KK (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotech* 115, 113-128.
- Tsuji T, Nakagawa R, Sugimoto N, Fukuhara K (1987) Characterization of disulfide bonds in recombinant proteins: reduced human interleukin 2 in inclusion bodies and its oxidative refolding. *Biochemistry* 26, 3129-3134.
- Vigne E, Bergdoll M, Guyader S, Fuchs M (2004) Population structure and genetic diversity within *Grapevine fanleaf virus* isolates from a naturally infected vineyard: Evidence for mixed infection and recombination. *J Gen Virol* 85, 2435-2445.
- Willits D, Zhao X, Olson N et al. (2003) Effects of the cowpea chlorotic mottle bromovirus beta-hexamer structure on virion assembly. *Virology* 306, 280-288.
- Yamaguchi H, Miyazaki M (2014) Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* 4, 235-251.
- Yazdani R (2018) Study to display foreign epitopes on the surface of *Grapevine Fan Leaf Virus*. Ph.D. Thesis. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (In Persian).
- Zhao M, Zhang N (1998). Recent advances of heterologous gene expression in *E. coli*. *Progress in Physiology* 29, 226-230.
- Zhao Y, Hammond RW (2005) Development of a candidate vaccine for Newcastle disease virus by epitope display in the Cucumber mosaic virus capsid protein. *Biotechnol Lett* 27, 375-382.