

## Optimizing purification and refolding conditions for the recombinant EcoRI restriction endonuclease protein in *E. coli*

Camellia Katalani 

\*Corresponding author. Assistant Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail address: C.Katalani@sanru.ac.ir

Elham Soleimani 

Ph.D. Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail address: solimanielham@yahoo.com

Ghorbanali Nematzadeh 

Professor, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran. E-mail address: gh.nematzadeh@gmail.com

---

### Abstract

#### Objective

Type II restriction endonucleases are the most common type of restriction enzymes, widely used in genetic engineering, particularly in gene cloning. Among these enzymes, the EcoRI enzyme is one of the most frequently utilized in the molecular field. The conventional method for producing these enzymes involves using genetically modified strains of *Escherichia coli*, which have been mutated to overproduce the EcoRI enzyme. However, the purification process for these enzymes is both costly and time-consuming, as it requires multiple chromatography columns. Given that the EcoRI enzyme has a simple structure without disulfide bridges and exists as a monomer, this study investigates the recombinant production, optimized purification, and refolding of this enzyme.

#### Materials and methods

The EcoRI gene was isolated from the bacterium *Escherichia coli* (E. coli RY13) and cloned into the expression vector pET28 for recombinant expression in *E. coli* BL21 (DE3). The optimal conditions for protein expression were investigated, including the type of inducer, its

concentration, and the temperature after induction. Protein expression was evaluated in terms of soluble protein or inclusion bodies using SDS-PAGE gel analysis. The recombinant protein was then purified and refolded using affinity chromatography and dialysis methods. Finally, the enzyme activity was compared to that of the commercial EcoRI enzyme from Thermo.

### Results

The optimal conditions for the expression of the EcoRI were determined to be 0.8 mM IPTG concentration and a temperature of 28°C. The results of the analysis of the recombinant protein expressed on SDS-PAGE gel indicated that the EcoRI was expressed as inclusion bodies. The solubilization of these inclusion bodies under mild conditions and refolding with 3 M urea demonstrated that the inclusion bodies were of a non-classical type. Furthermore, results from the refolding process, using both dialysis and Ni-NTA column, showed that the yield of refolding on the resin was higher than that obtained through dialysis. Enzymatic digestion reactions using the produced enzyme and a commercial enzyme indicated that the purified recombinant enzyme was capable of cutting plasmid DNA, similar to the commercial enzyme.

### Conclusions

Refolding of inclusion bodies on the column resulted in significant time and cost savings, demonstrating greater efficiency compared to the dialysis method.

**Keywords:** EcoRI enzyme, inclusion body, protein refolding, protein purification.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Katalani, C., Soleimani, E., & Nematzadeh, Gh. (2025). Optimizing purification and refolding conditions for the recombinant EcoRI restriction endonuclease protein in *E. coli*. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17 (2), 107-132.

---

*Agricultural Biotechnology Journal*, 17 (2), 107-132. DOI: 10.22103/jab.2025.24329.1626

Received: March 05, 2025.

Received in revised form: May 07, 2025.

Accepted: May 08, 2025.

Published online: June 30, 2025.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## Introduction

Restriction enzymes, also known as restriction endonucleases, are enzymes that cuts at specific sites in DNA sequences. The primary function of restriction endonucleases is to degrade the genomic DNA of invading viral agents in bacteria, leading to bacterial resistance. Type II restriction endonucleases are the most common type of restriction enzymes. They recognize short palindromic sequences of 4 to 8 base pairs and cleave the DNA. These enzymes are widely used in genetic engineering, specifically in gene cloning. One of the most frequently utilized enzymes in molecular biology is EcoRI. EcoRI is a monomeric protein that functions as a homodimer. The EcoRI endonuclease recognizes the palindromic DNA sequence GAATTC and cleaves both strands of DNA at G/AATTTC in the presence of Mg<sup>2+</sup> as a cofactor, producing sticky ends. The conventional method for producing these enzymes involves the use of genetically modified strains of Escherichia coli, which have been mutated to overproduce EcoRI. However, the purification process for these enzymes is both costly and time-consuming, as it involves the use of multiple chromatography columns. Escherichia coli is one of the most widely used hosts for recombinant protein production, with over 120 recombinant proteins being produced by *E. coli*. However, in more than 80% of cases, the expression of recombinant proteins in *E. coli* often results in the formation of inclusion bodies. Although the formation of inclusion bodies offers several advantages, such as high accumulation of target proteins, resistance to proteolytic attack, and easy isolation, solubilization and proper protein refolding is a challenging problem. Common refolding methods include dialysis, column refolding, and the addition of additives like sucrose or glycerol to reduce protein aggregation. Given that the EcoRI enzyme has a simple structure without disulfide bridges and exists as a monomer, this study investigates the recombinant production, optimized purification, and refolding of this enzyme.

## Materials and methods

In this study, the EcoRI gene sequence was isolated from *E. coli* RY13 and transferred into *E. coli* DH5 $\alpha$  cells using the pET28b (+) plasmid. Colony PCR and double digestion of plasmid DNA confirmed the correct assembly of the construct. The recombinant plasmid was then transferred into the expression host *E. coli* BL21 (DE3). After confirming the recombinant plasmid construct, the plasmids were transferred into the expression host *E. coli* BL21 (DE3). The optimal conditions for protein expression were investigated, including the type of inducer, its concentration, and the temperature after induction. Protein expression was evaluated in terms of soluble protein or inclusion bodies using SDS-PAGE analysis. Refolding and purification of recombinant proteins were carried out using affinity chromatography and dialysis. In the first method, dialysis and refolding buffers were used to refold the recombinant protein. The refolded

protein was then purified using an affinity column. In the second method, and both refolding and purification were performed on the column using 3 M urea. The yield of the enzyme from both methods was determined, and the efficiency of the two methods was compared. Purified enzyme activity was evaluated. Enzymatic digestion was performed using the purified EcoRI and a commercial EcoRI from Thermo on the pET28a plasmid, which contains the EcoRI recognition sequence. The enzyme's activity was compared to that of the commercial EcoRI enzyme from Thermo. Protein concentration was determined using ImageJ software, and data analysis was performed using Prism 8 software and the Tukey test.

## Results

Plasmid was extracted from positive colony PCR bacteria, and the accuracy of the recombinant construct confirmed by enzymatic digestion with NcoI and XhoI. The lac operon, one of the most commonly used to regulate the expression of recombinant protein, was used in this study. The lac operon was activated in the presence of lactose and IPTG as inducers. Our results revealed that the mean expression level induced by 0.8 mM IPTG ( $2.38 \pm 0.07$  mg/mL) had a highly significant difference compared to other treatments. The expression level of EcoRI was evaluated in all treatments, and the optimal conditions for the expression of the EcoRI were determined to be 0.8 mM IPTG concentration and a temperature of 28°C. The results of the analysis of the recombinant protein expressed on SDS-PAGE gel revealed that the EcoRI was expressed as inclusion bodies. We also found no significant difference in soluble protein level at different types and concentrations of inducers. Additionally, based on the mean comparison test, no significant difference in recombinant protein expression was observed between different temperature levels. The solubilization of these inclusion bodies under mild conditions and refolding with 3 M urea demonstrated that the inclusion bodies were of a non-classical type. Refolding of the inclusion bodies was performed using two methods: dialysis and chromatography with Ni-NTA resin. Both methods can be used to refold enzyme. The chromatography method, with higher yield (0.86 mg/mL) and lower cost, was selected as the optimal method. In this method, the denatured protein binds to Ni-NTA resin and refolds during the washing process. Not only does this approach save time and cost but it also prevents protein re-aggregation. Although one of the conventional protein refolding methods involves diluting the solubilized protein and dialyzing it in the presence of a refolding buffer, the large volume of buffer required for large-scale production is a limitation compared to the chromatography method. Enzymatic digestion using the produced enzyme and a commercial enzyme demonstrated that the purified recombinant enzyme was capable of cutting plasmid DNA, similar to the commercial enzyme.

## Conclusions

In this study, we aimed to express recombinant EcoRI. The ease of purification of recombinant protein compared to the native protein is a crucial factor. The determination of optimal conditions for expression and purification of recombinant enzyme depends on various factors. Applying a single method for all proteins is not practical. While producing recombinant proteins in soluble form eliminates the need for subsequent refolding processes, expressing them as inclusion bodies has a number of benefits, including 1) very high protein yield, 2) protection of protein from protease digestion, and 3) preserving protein structure. Therefore, producing proteins as inclusion bodies can increase production efficiency, making the investigation of high-efficiency refolding methods for inclusion bodies highly significant. Based on the results of this study, the purification and refolding of recombinant EcoRI enzyme on a column is more effective than using the dialysis method.

## Author Contributions

Conceptualization, C.K. and E.S.; methodology, C.K. and E.S.; software, C.K.; validation, C.K., E.S. and Gh. N.; formal analysis, C.K.; investigation, C.K. and E.S.; resources, Gh.N.; data curation, C.K. and E.S.; writing—original draft preparation, C.K.; writing—review and editing, C.K. and E.S.; visualization, C.K. and E.S.; supervision, Gh.N.; project administration, Gh.N.; funding acquisition, Gh.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

## Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU) for functional support of this research under contract number GABIT-93/D/PI186.

## Ethical Considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

## Funding

The study was funded by Genetics and Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), by research project numbered GABIT-93/D/PI186.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## بهینه‌سازی شرایط تخلیص و بازآرایی پروتئین نوترکیب اندونوکلئاز محدودکننده EcoRI در *E. coli*

کاملیا کتالانی

\*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. ریانامه: C.Katalani@sanru.ac.ir

الهام سلیمانی

دکتری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. ریانامه: solimanielham@yahoo.com

قربانعلی نعمت زاده

استاد، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. ریانامه: gh.nematzadeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۱۵      تاریخ اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۲/۱۷      تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۸

### چکیده

**هدف:** اندونوکلئازهای محدودکننده<sup>۱</sup> نوع دوم، متداول‌ترین نوع آنزیم‌های محدودکننده هستند که کاربرد وسیعی در مهندسی ژنتیک به ویژه همسانه‌سازی ژن‌ها دارند. آنزیم EcoRI از پرمصرف‌ترین آنزیم‌های محدودکننده نوع دو در حوزه مولکولی است. روش مرسوم تولید این آنزیم‌ها استفاده از سویه‌های تغییریافته باکتری *Escherichia coli* است که بهمنظور بیش تولید آنزیم EcoRI یافته‌اند. خالص‌سازی آنزیم‌های تولید شده با این روش به ستون‌های متعدد کروماتوگرافی نیاز دارد که هزینه بر و وقت‌گیر است. با توجه به اینکه آنزیم EcoRI دارای ساختاری ساده و بدون پل‌های دی‌سولفید و به صورت مونومر است در این مطالعه تولید آنزیم به روش نوترکیب، روش بهینه خالص‌سازی و بازآرایی این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** ژن EcoRI از باکتری اشرشیا کولای (*E. coli* RY13) جداسازی گردید و بهمنظور بیان ژن به صورت نوترکیب، در حامل بیانی pET28 همسانه‌سازی و در باکتری *E. coli* BL21 (DE3) بیان شد. شرایط بهینه بیان پروتئین

باتوجه به نوع القاگر، غلظت و دما پس از القا مورد بررسی قرار گرفت. بیان پروتئین به صورت محلول یا اجسام انکلوژیونی<sup>۳</sup> با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد. خالص سازی و بازآرایی پروتئین نوترکیب با دو روش کروماتوگرافی تمایلی و دیالیز انجام شد. فعالیت آنزیم در مقایسه با آنزیم تجاری EcoRI شرکت ترمو<sup>۳</sup> بررسی شد.

**نتایج:** شرایط بهینه بیان EcoRI در غلظت ۸٪ میلی مولار IPTG، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تعیین شد. نتایج حاصل از بررسی پروتئین نوترکیب بیان شده روی ژل SDS-PAGE نشان داده است که پروتئین نوترکیب به شکل اجسام انکلوژیونی بیان گردید همچنین حل شدن اجسام انکلوژیونی تحت شرایط ملایم و اسرشته سازی اوره ۳ مولار نشان داد که اجسام انکلوژیونی از نوع غیر کلاسیک است. نتایج حاصل از بازآرایی اجسام انکلوژیونی با استفاده از دیالیز و بر روی رزین Ni-NTA مشخص کرد که بازدهی بازآرایی بر روی رزین بیشتر از بازآرایی با استفاده از دیالیز است. واکنش هضم آنزیمی با آنزیم تولید شده و آنزیم تجاری نشان داد که آنزیم نوترکیب خالص شده مشابه آنزیم تجاری قادر به برش DNA پلاسمیدی است.

**نتیجه گیری:** بازآرایی اجسام انکلوژیونی بر روی ستون منجر به صرفه جویی در وقت و هزینه شده و کارایی بیشتری نسبت به روش دیالیز دارد.

**کلیدواژه‌ها:** آنزیم EcoRI، اجسام انکلوژیونی، بازآرایی پروتئین، خالص سازی پروتئین.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** کتابانی کاملیا، سلیمانی الهام، نعمت زاده قربانعلی (۱۴۰۴) بهینه سازی شرایط تخلیص و بازآرایی پروتئین نوترکیب اندونوکلئاز محدود کننده EcoRI در *E. coli*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۷(۲)، ۱۰۷-۱۳۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## مقدمه

آنزیم‌های محدود کننده که با نام آنزیم‌های محدود کننده اندونوکلئاز نیز شناخته می‌شوند، آنزیم‌هایی هستند که در نواحی خاصی از توالی DNA برش ایجاد می‌کنند. کارکرد اصلی این آنزیم‌ها تخریب DNA زنومی عوامل ویروسی مهاجم به باکتری است که منجر به ایجاد مقاومت در باکتری می‌شود (Goppelt et al., 1980). امروزه اندونوکلئازهای محدود کننده ابزاری ضروری برای بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی مولکولی هستند آنزیم‌های محدود کننده نوع دوم از متدائل ترین نوع آنزیم‌های محدود کننده

2 Inclusion body

3 Thermo Fisher Scientific

هستند که کاربرد وسیعی در مهندسی ژنتیک، همسانه‌سازی ژن‌ها، برش DNA به قطعات کوچک‌تر، نقشه‌برداری فیزیکی ژنوم، ایجاد مولکول‌های DNA نوترکیب و غیره دارند. بیان ژن‌هایی از میزبان‌های مختلف یک روش معمول است که در زمینه بیوتکنولوژیکی مانند مهندسی متابولیک، پروتئین‌های نوترکیب یا سایر متابولیت‌های بالارزش استفاده می‌شود (McCarty et al., 2019; Lozano Terol et al., 2021)؛ این آنزیم‌ها توالی‌های ویژه‌ای را که به صورت پالیندروم است، روی دو رشته DNA به طول ۴ تا ۸ جفت باز شناسایی و پیوند فسفودی‌استر را در مولکول‌های دو رشته‌ای DNA هیدرولیز کرده و برش می‌دهند. این برش می‌تواند به صورت متناوب باشد و یک انتهای تک‌رشته‌ای باقی بگذارد (انتهای چسبان<sup>۳</sup>) و یا در نقطه مشابهی در هر رشته برش ایجاد شود که منجر به ایجاد انتهای کور<sup>۵</sup> می‌شود (Pingoud et al., 2014; Loenen et al., 2014).

در دهه ۱۹۶۰ میلادی از عصارة سلولی باکتریایی برای شناسایی اندونوکلئاز‌های برشی استفاده می‌شد و تأثیر فعالیت آن‌ها را بر مولکول‌های کوچکی از DNA مورد بررسی قرار می‌گرفت، سپس با بررسی توالی قطعات تولید شده حاصل از فعالیت آنزیم‌ها، اندونوکلئاز‌های برشی و جایگاه برش آن‌ها شناسایی می‌شد (Schildkraut, 1984). در صنعت آنزیم EcoRI از سویه‌های جهش‌یافته باکتری *Escherichia coli* که به‌منظور بیش تولید آن توسعه داده شده‌اند، تولید می‌شود که از جمله معایب آن مراحل متعدد کروماتوگرافی برای خالص‌سازی آنزیم است (Liu et al., 1998).

به طور کلی آنزیم‌های برشی بر اساس ترکیب زیرواحدها و نیاز به کوفاکتور به انواع I, II, III و IV طبقه‌بندی می‌شوند. بزرگترین کلاس از آنزیم‌های برشی، نوع II آنها می‌باشند و آنزیم EcoRI از جمله پرکاربردترین آنها می‌باشد. آنزیم EcoRI پروتئینی مونومر است که به صورت هومودایمر توالی هدف پالیندرومیک G↓AATTC را شناسایی می‌کند و در حضور کوفاکتور DNA, Mg<sup>2+</sup>, Sen et al., 2016) را پس از نوکلئوتید G در هر رشته برش می‌زند تا انتهای چسبنده ۵ نوکلئوتیدی تولید کند (E. coli 1999). باکتری *E. coli* هنوز به عنوان پرکاربردترین میکروارگانیسم در بیوتکنولوژی است. بیش از ۱۲۰ پروتئین درمانی در *E. coli* به عنوان میزبان، بیان شده‌اند که بیانگر نقش حیاتی این سیستم در تولید پروتئین نوترکیب است (Sanchez-Garcia et al., 2012). از جمله مزایای استفاده از باکتری *E. coli* در تولید پروتئین‌های نوترکیب، سرعت رشد بالا، قابلیت رشد در محیط کشت‌های متنوع و همچنین توسعه ابزارهای بیولوژی متعدد برای ایجاد تغییرات ژنتیکی در آن است (Huang et al., 2015; Vargas-Maya and Franco, 2017; Blount, 2015). میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب تحت تأثیر شرایطی مانند دما، قدرت پرومотор یا تعداد نسخه‌های ناقل بیانی، قرار می‌گیرد. با وجود این مزایا، تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E. coli* با برخی مشکلات نیز همراه است.

4 sticky end

5 blunt end

بیشتر پروتئین‌های بیان شده در *E. coli* در فضای سیتوپلاسمی در محیط کاہنده‌ای عقرار دارند. تحت چنین شرایطی و به دلیل تعاملات غیرطبیعی بین اسیدآمینه‌ها منجر به تا شدن نادرست یا تجمع پروتئین‌ها به صورت اجسام انکلوزیونی می‌شود (Hannig et al., 1998). برآوردها نشان می‌دهد بیش از ۸۰ درصد از پروتئین‌های نوترکیب بیان شده در *E. coli* به صورت اجسام انکلوزیونی وجود دارند که نشان دهنده اجتناب‌ناپذیر بودن تشکیل اجسام انکلوزیونی در سیستم‌های بیانی *E. coli* است (Singhvi et al., 2020). تا کنون تلاش‌های بسیاری برای کاهش تشکیل اجسام انکلوزیونی هنگام بیان پروتئین در *E. coli* انجام شده است. با این حال، مشخص شده است که تشکیل اجسام انکلوزیونی مزایای متعددی برای بیان پروتئین در مقیاس بزرگ به همراه دارد. از جمله: بیان بسیار زیاد پروتئین (بیش از ۳۰ درصد از پروتئین‌های سلولی)، جداسازی آسان اجسام انکلوزیونی به دلیل تفاوت در اندازه و چگالی آنها نسبت به بقایای سلولی، کاهش تخریب پروتئین بیان شده، مقاومت در برابر حمله پروتئازهای سلولی و همگنی پروتئین موردنظر در اجسام انکلوزیونی که به کاهش تعداد مراحل خالص‌سازی بهمنظور تولید پروتئین خالص، کمک می‌کند (Huang et al., 2012; Ventura et al., 2006; Singhvi et al., 2020). اگرچه تشکیل اجسام انکلوزیونی چالش‌هایی را نیز به همراه دارد. از جله اینکه ممکن است در برخی از موارد نیاز به مراحل متعدد بازارایی و خالص‌سازی وجود داشته باشد و این امر خود مستلزم صرف وقت و هزینه بیشتری می‌باشد، در عین حال در طی فرآیند بازارایی و استفاده از حلال‌های مختلف، ممکن است پروتئین فعالیت بیولوژیک خود را از دست دهد (Singhvi et al., 2019; Burnett et al., 2019).

از آنجایی که در اجسام انکلوزیونی، مولکول‌های پروتئین در یک حالت انبالشته قرار دارند، حل کردن اجسام انکلوزیونی و تاخوردگی صحیح پروتئین‌های حل شده به شکل فعال زیستی چالش‌برانگیز است. روش مرسوم برای خالص‌سازی پروتئین‌ها از اجسام انکلوزیونی در چهار مرحله اصلی انجام می‌شود که شامل خالص‌سازی اجسام انکلوزیونی، حل شدن اجسام انکلوزیونی، تاخوردگی مجدد پروتئین‌های محلول شده و خالص‌سازی پروتئین‌های تاخورده با تکنیک‌های مختلف کروماتوگرافی است (Kachhwaha et al., 2022).

حل شدن اجسام انکلوزیونی و تاخوردگی مجدد مولکول‌های پروتئین محلول در ترکیب، اصلی‌ترین مراحل در بازیابی پروتئین فعال زیستی از اجسام انکلوزیونی است. دمای بیان پایین می‌تواند به تشکیل اجسام انکلوزیونی non-classical متعادل کمک کند. این نوع از اجسام انکلوزیونی با استفاده از حلال‌های غیر واسرشته کننده حل می‌شوند. اجسام انکلوزیونی در طبیعت به صورت دینامیک هستند و در تعادل به فرم‌های تجمع‌یافته و پروتئین‌های تاخورده وجود دارند. این اصل می‌تواند به منظور حل کردن اجسام انکلوزیونی در بافرهای بدون ترکیبات واسرشته کننده به کار گرفته شود (Belkova et al., 2022; Peternel et al., 2012).

روش‌های متعددی برای بازارایی پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی وجود دارد که هدف تمامی آنها کاهش غلظت واسرشته

کننده‌ها<sup>۷</sup> و فراهم کردن شرایط بازآرایی پروتئین به فرم طبیعی آن است. بازآرایی پروتئین محلول بدون ساختار به پروتئین با فرم طبیعی، با تجمع پروتئین و تاخوردگی ناصحیح پروتئین همراه است که از مهم‌ترین چالش‌ها در بازآرایی پروتئین است (Schramm et al., 2020). روش‌هایی شامل رقیق‌سازی پروتئین، افزودن مواد مهارکننده تجمع پروتئین یا تقویت کننده بازآرایی مانند سوکروز، آلرینات و گلیسرول، تعییر pH، روش‌های مبتنی بر دیالیز و بازآرایی روی ستون از جمله روش‌های مورد استفاده در بازآرایی هستند (Al-Ayoubi et al., 2017; Akiba et al., 2016; Yamaguchi et al., 2014; Kato et al., 2021; Katalani et al., 2020). در این بررسی پروتئین EcoRI به صورت نوترکیب در سیستم بیانی باکتری *E. coli* بیان گردید. پس از تأیید بیان پروتئین به صورت اجسام انکلوژیونی، خالص‌سازی و بازآرایی به دو روش دیالیز و بازآرایی بر روی ستون انجام شد و فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**باکتری، پلاسمید و ژن هدف:** باکتری *E.coli* سویه α (DE3) و DH5 α (BL21) (کمپانی promega، آمریکا) به منظور کلونینگ و بیان آنزیم نوترکیب EcoRI مورد استفاده قرار گرفتند. جهت بیان و خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی NiNTA از پلاسمید (+) pET28b(+) Novagen کمپانی دارای برچسب هیستیدینی در انتهای کربوکسی (C-ترمینال) استفاده شد. توالی ژن کدکننده آنزیم برشی EcoRI از پایگاهداده NCBI با شماره دسترسی بانک ژنی J01675.1 دریافت شد. آغازگرهای مورد نظر با توجه به توالی ژنی با استفاده از نرمافزار Oligo7 طراحی شد.

**آنالیزهای بیوانفورماتیک-تعیین برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی:** برخی از خواص آنزیم EcoRI مانند نقطه ایزوالکتروویک<sup>۸</sup> (pI)، وزن مولکولی، شاخص ناپایداری، نیمه عمر در پایگاه ProtParam (<https://web.expasy.org/cgi-bin/ProtParam>) محسابه شد. همچنین پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین در پایگاه Porter (<http://distilldeep.ucd.ie/porter/>) مورد بررسی قرار گرفت.

**همسانه‌سازی ژن و ایجاد پلاسمید نوترکیب:** استخراج DNA از باکتری *E.coli* RY13 به روش CTAB (sambrook, 1989) انجام شد. ژن کدکننده آنزیم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی دارای جایگاه برش آنزیم‌های XhoI و ERER-XhoI: CATGCCATGGGCTCCAACAAGAACATCC EREF-NcoI و با توالی: NcoI CCGCTCGAGTCACTTGGAGGTGAGTTGC و با استفاده از واکنش زنجیره‌های پلیمراز (PCR) تکثیر شد. اجزای واکنش با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم DNA الگو، ۶٪ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (۱۰ پیکومول)،

7 Denaturant

8 Isoelectric point

۰/۲ میکرومولار ۲ میلیمولار dNTP، ۱X MgCl<sub>2</sub>، ۰/۲ PCR باfer و با شرایط دمایی TaqDNA polymerase واسرسته سازی اولیه در ۹۶°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه در ۹۴°C به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۶°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد. جهت همسانه سازی و بیان از پلاسمید pET28 که تحت پرموتر T7 است، استفاده شد (شکل A). ایجاد انتهای‌های چسبنده در محصول PCR و پلاسمید pET28، هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی NcoI و XhoI انجام شد. محصولات واکنش هضم بر روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز شدند. پس از اتمام واکنش هضم برای جداسازی DNA از سایر ترکیبات، از کیت تخلیص DNA شرکت Thermo Scientific(GeneJet PCR purification kit-K0702) استفاده شد. جهت اطمینان از صحت فعالیت آنزیم‌های برشی برای ایجاد انتهای‌های چسبنده، هضم آنزیمی با هریک از آنزیم‌های NcoI و XhoI به طور جداگانه انجام شد. درصورتی که آنزیم فعالیت خود را به درستی انجام دهد پلاسمید پس از هضم به صورت تک باند روی ژل آگارز قابل مشاهده خواهد بود. غلظت تقریبی قطعه DNA برای الحق در پلاسمید هضم شده، با استفاده از الکتروفورز آن‌ها در ژل آگارز تعیین گردید. مخلوط واکنش اتصال شامل ۱۲ میکرولیتر (۳۰۰ نانوگرم) از محصول PCR با انتهای‌های چسبنده، سه میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم، حد مجاز بین ۲۰-۱۰۰ نانوگرم) پلاسمید pET28 خطی با انتهای‌های چسبنده، دو میکرولیتر بافر آنزیم T4 لیگاز ترموم (EL0011) یک میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز بود. این مخلوط به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کشت شد. سپس، مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد کشت گردید. برای انتقال محصول اتصال به سلول‌های مستعد E. coli DH5α از روش شوک حرارتی استفاده شد کشت داده شدند. جهت تأیید مولکولی نوترکیبی، کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلاناکسین با غلظت ۵۰-۱۰۰ میکروگرم بر لیتر کشت داده شدند. جهت تأیید مولکولی نوترکیبی، کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک با روش‌های کلونی PCR و از واکنش هضم آنزیمی استفاده شد.

**بیان ژن هدف:** به منظور بیان پروتئین نوترکیب، کشت شبانه یک تک کلونی از E. coli DE3 سویه BL21 حاوی pET28-EcoRI (pET28-EcoRI) در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی کانامایسین (۷۰ µg/ml) انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۶۰ rpm به مدت ۱۸-۱۶ ساعت کشت شد. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت شبانه به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع (نسبت حجمی ۱ در ۱۰۰) تازه حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۷۰ µg/ml) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ rpm منتقل شده و زمانی که میزان تراکم نوری باکتری در OD 600 nm به ۸/۰ رسید، القای بیان با افزودن D-β-IPTG (D-تیوگالاكتوتیوپیرانوزید) با غلظت یک میلی‌مولار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت انجام شد. پس از سانتریفیوژ محلول کشت با دور ۵۰۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه رسوب باکتری برداشت شد و در ۲۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت انجام آنالیزهای بعدی نگهداری شد (Hannig and Makrides., 1998). به رسوب حاصل از ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت باکتری حداقل ۱۰ میلی‌لیتر بافر لیزکننده افزوده و با پائیتینگ حل شد. سلول‌ها بر روی یخ و طی فرایند سونیکاسانیون تخریب شدند (۶ بار هر بار تکانه ۳۰ ثانیه و با استراحت ۳۰ ثانیه‌ای، ۰/۰ amplitude%). سپس ۲۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm

سانتریفیوژ شده و مایع رویی که شامل پروتئین‌های محلول است جهت انجام آنالیزهای بعدی به ۲۰ - درجه سانتی‌گراد منتقل شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ را که دارای پروتئین‌های غیر محلول است به عنوان اجسام انکلوزیونی در بافر لیزکننده حاوی اوره (بافر دینیچر- جدول ۱) حل و پس از سانتریفیوژ به عنوان پروتئین‌های واسرشته در مراحل بعدی از آن‌ها استفاده شد. بررسی بیان و کیفیت پروتئین تخلیص شده با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) به روش لاملی و با استفاده از سیستم بایورد (Biorad-mini protein Tetra Gel) انجام شد. با توجه به اندازه مورد انتظار پروتئین نوترکیب که ۳۵ کیلو دالتون است، از ژل جداکننده ۱۲ درصد ( $pH = ۸/۸$ ) و ژل متراکم کننده ۴ درصد ( $pH = ۶/۸$ ) استفاده شد. حدود ۳۰ میکرولیتر نمونه با ۱۵ میکرولیتر بافر لاملی (تریس (Tris)،  $pH = ۶/۸$  mM، ۶۲.۵ mM، DTT، ۱۰ درصد، SDS ۱ درصد و برموفنول بلو مقدار کمی) (Laemmli, 1970) مخلوط شد. نمونه‌ها قبل از تزریق ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه جوشانده شدند. برای الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی در ابتدا از ولتاژ ۳۰ ولت استفاده شد تا پروتئین‌ها به آرامی و به طور یکدست در مرز بین دو ژل قرار بگیرند، اما پس از ورود رنگ برموفنول بلو به ژل جداکننده ولتاژ به ۱۰۰ ولت افزایش یافت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل پایین در محلول رنگ آمیزی (Coomassie Brilliant blue R 250, Sigma) به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. در ادامه ژل کاملاً با آب شسته شد سپس در معرض محلول رنگ بر قرار گرفت. رنگ بری تا شفاف شدن زمینه ژل و وضوح باندهای پروتئینی ادامه یافت.

**بیان پروتئین EcoRI:** بیان پروتئین نوترکیب EcoRI در سطوح مختلفی از فاکتورهای دما (۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد)، نوع و غلظت القاگر (لاکتوز ۵ و ۳ گرم بر لیتر IPTG ۰/۰ و ۰/۶ میلی‌مولار) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار اجرا شد.

**خالص‌سازی پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی:** به واسطه وجود دنباله هیستیدینی (6X His) در پروتئین نوترکیب، تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی (رزین NiNTA) به دو روش ترکیبی<sup>۹</sup> و طبیعی<sup>۱۰</sup> انجام شد. به منظور تعیین روش خالص‌سازی پروتئین نوترکیب و تعیین میزان بیان در حالت طبیعی و واسرشته پروتئین، ابتدا به رسوب به دست آمده از شش میلی‌لیتر محیط کشت القاشده ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیزکننده نیتیو (جدول ۱) به همراه لیزوزیم ۴ mg/mL اضافه و ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شد. سپس محلول طی چهار سیکل تحت امواج فراصوت (۲۰ ثانیه سونیکاسیون و ۲۰ ثانیه استراحت روی بیخ) (۰ وات، ۲۰ کیلوهرتز) قرار گرفت. پس از سونیکاسیون، مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. به رسوب باقیمانده بافر لیزکننده حاوی اوره (جدول ۱) افروده و جهت تعیین نحوه بیان به صورت طبیعی و واسرشته بر روی ژل SDS-PAGE مشاهده شد. به منظور خالص‌سازی پروتئین نوترکیب حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از کشت باکتری با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شد. سپس رسوب باکتری در ۱۰

9 combinational

10 native

میلی لیتر بافر لیزکننده بدون اوره (جدول ۱) حل شد. نمونه‌ها روی یخ سونیکه شده و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰ rpm ۱۰ به مدت ۲۰ دقیقه، مایع رویی که حاوی پروتئین‌های محلول است به ۵۰۰ میکرولیتر از رزین Ni-NTA اضافه شد و در روش ترکیبی به رسوب حاصل از سانتریفیوژ مرحله قبلی بافر لیزکننده حاوی اوره اضافه و به رزین اضافه شد. بعد از اضافه کردن ۱۰ میلی لیتر پروتئین محلول (اجسام انکلوزیونی حل شده و یا پروتئین بازآرایی شده توسط دیالیز) به رزین، ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد (می‌توان فالکون را در بین دو ژل یخی ساندویچ کرد و بر روی شیکر قرار داد) با دور ۷۰-۸۰ rpm قرار داده شدند. پس از سانتریفیوژ ۱۵۰۰ rpm به مدت یک الی دو دقیقه، مقداری از مایع رویی به عنوان نمونه قبل از شستشو برای بررسی بر روی ژل آکریل، جدا شد و بقیه محلول (تحت عنوان flow-through) تا مشخص شدن نتایج الکتروفورز ژل، و اطمینان از اینکه تمام پروتئین محلول نوترکیب به رزین متصل شده‌اند، در ۰-۲۰°C نگهداری شد. رزین حاصل از مرحله قبل که حالا متصل به پروتئین است به ترتیب با بافر شستشوی ۱، ۲، ۳ و ۴ (جدول ۱) شستشو داده شد. در مرحله آخر به منظور جدا کردن پروتئین‌های متصل به رزین نیکل، حدود ۵۰۰-۲۵۰۰ میکرولیتر بافر الوشن (جدول ۱) اضافه کرده و نمونه‌ها به مدت حدود ۴۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار گرفت و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی که حاوی پروتئین EcoRI خالص شده است به منظور بررسی‌های بعدی در فریزر -۲۰°C نگهداری شد.

### جدول ۱. اجزای بافرهای خالص‌سازی به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب

Table 1. Components of the buffers for purification the recombinant protein

Chemical material	Native lysis buffer	denature lysis buffer (Equilibration)	Wash 1 بافر	Wash 2 بافر	Wash 3 بافر	Wash 4 بافر	Elusion الوشن
مواد شستشو	شستشو	شستشو	باfr لیزکننده	باfr لیزکننده نیتیو	باfr لیزکننده نیتیو	باfr لیزکننده نیتیو	باfr لیزکننده نیتیو
شیمیایی	دینیچر						
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	1M	1M	2M	2M	1M	1M	1M
Imidazole	20mM	-	30mM	20mM	20mM	20mM	300mM
Tween 20	0.1%	0.1%	0.1	0.05	-	-	-
PMSF	1mM	1mM	-	-	-	-	-
Triton X100	-	-	1%	-	-	-	-
Urea	-	3M					

\* تمامی بافرهای فوق بعد از تنظیم pH=۸ با استفاده از فیلتر ۲۲+ میکرومتر استریل می‌شوند.

بازآرایی پروتئین نوترکیب با استفاده از دیالیز: بیان پروتئین نوترکیب بر اساس فاکتورهای انتخابی (IPTG=۰.۸mM, Tm=37°C NaCl: 300mM, KPO<sub>4</sub> pH=7.۵: 10mM, EDTA: 1mM, Triton x100: 0.15%, DTT: 1mM, glycerol: 25%) انجام شد. تعویض بافر پروتئین نوترکیب با روش دیالیز به مدت ۱۲ ساعت در بافر بازآرایی (

استفاده از کیسه دیالیز (Sigma) با کات آف<sup>۱۱</sup> ۱۴ کیلوالتون در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. پروتئین محلول (بازآرایی شده) به منظور خالص سازی با استفاده از رزین نیکل بر روی ستون قرار گرفت.

**بررسی فعالیت آنزیم EcoRI نوترکیب:** برای بررسی فعالیت آنزیم خالص شده، از بافر تجاری شرکت ترمو که مناسب آنزیم EcoRI است استفاده شد. پلاسمید pET28a که دارای یک جایگاه شناسایی برای آنزیم EcoRI است در واکنش هضم به عنوان نمونه مورد استفاده قرار گرفت. آنزیم تجاری EcoRI (ترمو) نیز به عنوان شاهد استفاده شد. واکنش هضم در زمان های ۱، ۲ و ۴ ساعت انجام شد.

**آنالیز آماری داده ها:** غلظت پروتئین حاصله با استفاده از نرم افزار ImageJ و آنالیز داده های حاصل با استفاده از نرم افزار Prism 8 و آزمون توکی اجرا گردید. مقایسه شدت باند حاصله از نمونه در ژل SDS-PAGE با مقادیر مشخص پروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) و با رسم رگرسیون خطی حاصل از ضخامت باندها محاسبه شد.

## نتایج و بحث

**آنالیز توالی:** بر اساس نتایج حاصل از بررسی بیوانفورماتیک ساختار دوم پروتئین شامل ۳۸/۹۸ درصد پیچ تصادفی<sup>۱۲</sup>، ۴۰/۸۰ درصد آلفا هلیکس و ۲۰/۲۲ درصد به صورت صفحات گستردگی<sup>۱۳</sup> هستند. این پروتئین دارای وزن مولکولی حدود ۳۱ کیلوالتون بوده بر اساس شاخص ناپایداری ۶۴/۸۴، و نیمه عمر پایداری ۱۰ ساعته در باکتری *E. coli* به عنوان پروتئین پایدار در نظر گرفته می شود. بر اساس شاخص میانگین کل هیدرопاتیک (Grand average of hydropathicity) (۰/۳۶۶ - ۰/۳۶۶) به عنوان پروتئین آبدوست دسته بندی می گردد و pI آن معادل ۷/۷۹ است.

**همسانه سازی و تأیید آن:** جداسازی ژن EcoRI با استفاده از آغازگرهای مربوطه دارای جایگاه های برشی آنزیم های XbaI و NcoI انجام شد. پس از هضم آنزیمی محصول PCR و ناقل بیانی pET28، واکنش الحاق انجام شد. صحت پلاسمید نوترکیب EcoRI-pET28 با استفاده از PCR و سپس هضم آنزیمی، با مشاهده باند ۸۳۳ نوکلئوتید در ژل آگارز تأیید شد (شکل ۱).

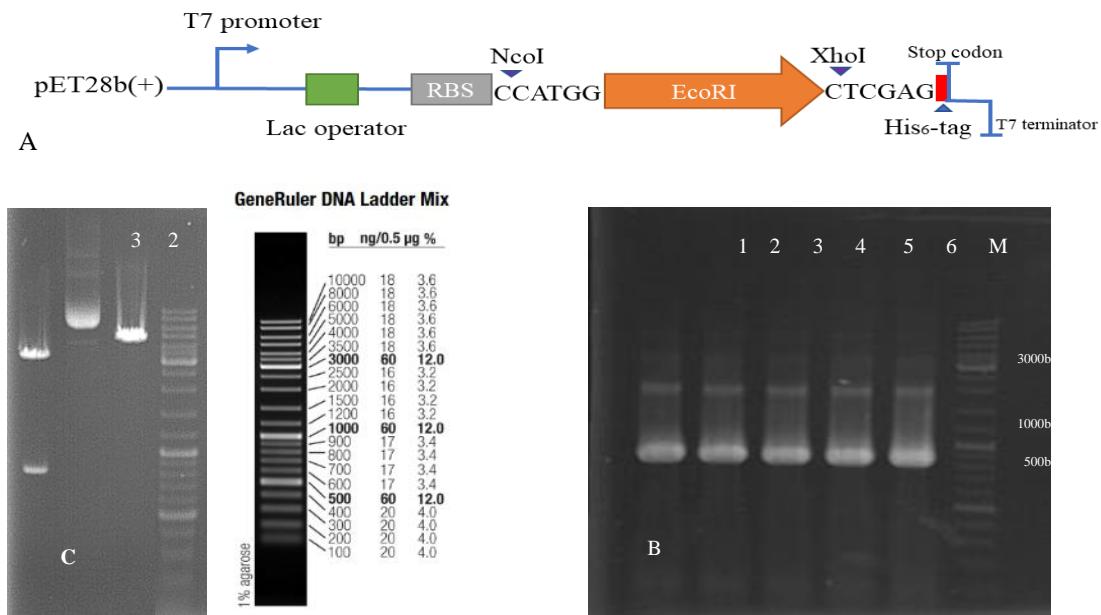
**بهینه سازی بیان پروتئین نوترکیب:** بر اساس پیش بینی بیوانفورماتیکی و همچنین ماهیت آبدوست بودن آنزیم EcoRI ، به نظر می رسید که عمدۀ پروتئین تولید شده به صورت محلول بیان گردد (Qing et al., 2022). در آنالیز اجزای

<sup>11</sup> Cut off

<sup>12</sup> Random coil

<sup>13</sup> extended strand

محلول و غیر محلول حاصل از تخریب سلول باکتریایی<sup>۱۴</sup> با استفاده از آنالیز SDS-PAGE حضور اجسام انکلوزیونی تأیید شد. باند ضخیم پروتئین در وزن مولکولی موردنظر نشان دهنده بیان پروتکل به صورت اجسام انکلوزیونی است (شکل ۲۲).



شکل ۱. A: سازواره ژن نوترکیب EcoRI حاوی: توالی آنزیمهای برشی NcoI و XhoI و سایر اجزای تنظیمی.  
B: الکتروفورز محصول کلنی PCR جهت تأیید پلاسمید نوترکیب EcoRI-pET28. لاین ۱: کنترل منفی، ۲-۶: کلن‌های + دارای ژن نوترکیب EcoRI با وزن ۸۳۳ bp و M: مارکر وزنی (Thermo, SM0333). C: الگوی الکتروفورز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم برشی NcoI و XhoI. لاین M: مارکر وزنی، ۱: پلاسمید EcoRI-pET28 قبل از هضم، ۲: پلاسمید pET28 ، ۳: هضم دوگانه پلاسمید نوترکیب، اندازه ۸۳۳ bp (5.3kb) و اندازه قطعه پلاسمید (5.3kb)

Figure 1. A: Construct of recombinant EcoRI gene contains the sequences of restriction enzymes NcoI and XhoI, along with other regulatory components. B: Electrophoresis of the colony PCR product to confirm the recombinant EcoRI-pET28 plasmid. Lane 1: Negative control, Lanes 2-6: Positive clones, M: Weight marker (Thermo, SM0333). C: Electrophoresis pattern of the enzymatic digestion of the recombinant plasmid with the restriction enzymes NcoI and XhoI. Lane M: Weight marker, 1: EcoRI-pET28 plasmid before digestion, 2: pET28 plasmid, 3: Double digestion of the recombinant plasmid, plasmid size (5.3 kb) and fragment size 833 bp

<sup>14</sup> Cell lysate

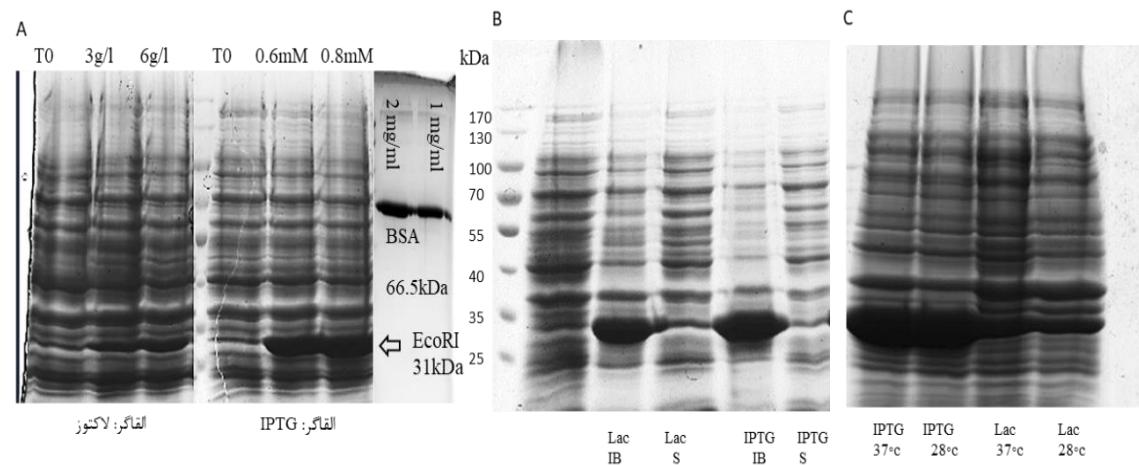
بنابراین، همان طور که در مطالعات قبلی نشان داده شده است آب دوست بودن یک پروتئین لزوماً نشان دهنده بیان پروتئین به فرم محلول نمی باشد (Katalani et al., 2020). تجمع پروتئین به فرم اجسام انکلوزیونی به خصوصیات ساختاری و فیزیکوشیمیایی پروتئین مانند وزن مولکولی، تعداد باقی مانده های<sup>۱۵</sup> هیدروفوبیک و غیره بستگی دارد. پروتئین های تک دومینی با وزن مولکولی کم، معمولاً به صورت محلول و با حفظ ساختار عملکردی تولید می شوند؛ زیرا به واسطه های تاخوردگی کمتری نیاز دارند و بر عکس (Dyson et al., 2004). اگرچه به علت پایداری مکانیکی و شیمیایی اجسام انکلوزیونی، و حضور فرم تجمع یافته یکسان با چگالی بالا خالص سازی آن ها سریع تر از سایر پروتئین های بیان شده است، و به همین دلیل بیان پروتئین به صورت اجسام انکلوزیونی در صنایع دارویی در بسیاری از موارد ایده آل است (Marco et al., 2019). علاوه بر این برخی از تحقیقات ثابت کرده اند که اجسام انکلوزیونی می توانند شامل پروتئین های فعال زیستی باشند (Singh et al., 2020; Singhvi et al., 2020).

### تأثیر نوع القاگر و مقدار آن بر میزان بیان پروتئین نوترکیب EcoRI:

پرومومتر اپران lac از جمله پرومومترهای تنظیمی است که در باکتری *E. coli* استفاده می شوند. این پرومومتر با القاگرهای IPTG و لاکتوز فعال می شود. از جمله مزایای استفاده از القاگرهای شیمیایی وجود دانش کافی، قابلیت القا در دمای پایین و امکان استفاده از غلظت های مختلف القاگر است. القاگر IPTG از القاگرهای شیمیایی بسیار قوی است. القاگر لاکتوز از جمله القاگرهای متوسط در میزان بیان، دسته بندی می شود (Faust et al., 2015). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان بیان القاشه توسط IPTG در غلظت ۸٪ میلی مولار با مقدار ۷٪ ± ۰٪ میلی گرم در میلی لیتر اختلاف بسیار معنی داری نسبت به سایر تیمارها دارد (شکل ۳).

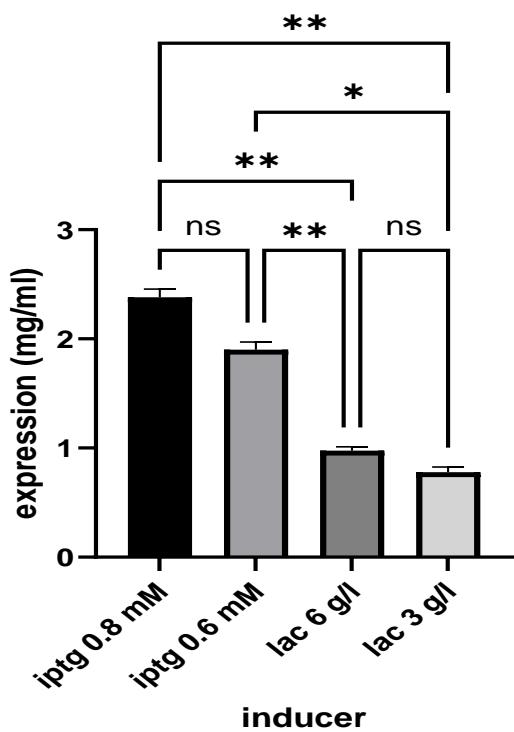
ثبت شده است که افزایش غلظت های IPTG در محیط کشت می تواند بدون اینکه بار متابولیکی بر روی سلول های *E. coli* وارد کند، میزان بیان پروتئین را افزایش دهد که در نهایت برای تاخوردگی صحیح پروتئین های نوترکیب مطلوب است (Gholami et al., 2017; Katalani et al., 2020). اگرچه در برخی از مطالعات نیز نشان داده شده است که تغییر مقادیر IPTG تأثیر معنی داری بر افزایش میزان پروتئین محلول ندارد (Papaneophytou et al., 2012; Larentis et al., 2011) در این مطالعه نشان داده است که میزان بیان پروتئین محلول در هر دو القاگر تغییر چندانی نداشت (شکل ۲B) اما به طور کلی میزان بیان پروتئین القا شده توسط IPTG بیشتر از لاکتوز می باشد (شکل ۳). بنابراین نوع و غلظت القاگر و تأثیر آن بر میزان پروتئین محلول بستگی به نوع پروتئین نوترکیب بیان شده در سلول میزبان دارد. اگرچه به منظور کاهش هزینه های تولید می توان لاکتوز را به عنوان جایگزینی ارزان به جای IPTG استفاده نمود.

<sup>۱۵</sup> Residue



شکل ۲. تأثیر نوع و غلظت القاهر و دما بر میزان بیان پروتئین نوترکیب. A: T0، نمونه پروتئین سلولی قبل از القا، القاهر لاکتوز در دو غلظت ۳ و ۶ گرم در لیتر و القاهر IPTG با غلظت‌های ۰/۰ و ۰/۸ میلی‌مولار. سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد در دو غلظت ۲ mg/ml و ۱ mg/ml: ۱: مارکر پروتئینی رنگی استاندارد (Thermo 26616)، ۲: نمونه قبل از القا، ۳: القاهر لاکتوز و پروتئین اجسام انکلوژیونی، ۴: القاهر لاکتوز و پروتئین محلول، ۵: القاهر IPTG و پروتئین اجسام انکلوژیونی، ۶: القاهر IPTG و پروتئین محلول. C: ۱: القای بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۳۷ درجه و القاهر IPTG، ۲: القای بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۲۸ درجه و القاهر IPTG. ۳: القای بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۳۷ درجه و القاهر لاکتوز. ۴: القای بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۲۸ درجه و القاهر لاکتوز

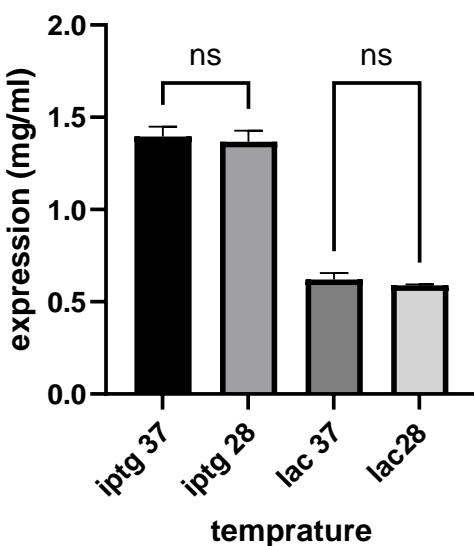
**Figure 2. The effect of factors such as type of inducer, concentration, and temperature on the level of recombinant protein expression.** A: T0 represents the cell protein sample before induction, with lactose inducer at concentrations of 3 and 6 grams per liter, and IPTG inducer at concentrations of 0.6 and 0.8 mM. Bovine Serum Albumin (BSA) was used as a standard at two concentrations. B: 1: Standard colored protein marker (Thermo 26616), 2: Sample before induction, 3: Lactose inducer and inclusion body protein, 4: Lactose inducer and soluble protein, 5: IPTG inducer and inclusion body protein, 6: IPTG inducer and soluble protein. C: 1: Induction of recombinant protein expression at 37°C with IPTG inducer, 2: Induction of recombinant protein expression at 28°C with IPTG inducer, 3: Induction of recombinant protein expression at 37°C with lactose inducer, 4: Induction of recombinant protein expression at 28°C with lactose inducer



شکل ۳. تأثیر نوع و غلظت القاگر بر میزان بیان پروتئین نوترکیب. دو القاگر لاکتوز و IPTG در دو غلظت مختلف نمایش داده شده است. میزان بیان بر اساس میلی گرم در میلی لیتر است. ۱ و ۲ ستاره، به ترتیب نمایانگر اختلاف بسیار معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ درصد و ns نشان دهنده اختلاف غیر معنی دار است

**Figure 3. The effect of inducer type and concentration on the level of recombinant protein expression. Two inducers, lactose and IPTG, are shown at two different concentrations. The expression level is measured in milligrams per milliliter. Asterisks 1 and 2 indicate highly significant differences at the levels of 0.05% and 0.01%, respectively and, ns: indicates non-significant difference**

**تأثیر دما:** به منظور بررسی تأثیر دما بر میزان بیان پروتئین، ابتدا باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به بهینه رشد و بیشترین مقدار توده سلولی رسیده و سپس در فاز بعدی با کاهش دما ۲۸ درجه سانتی گراد موجب القای آهسته بیان می شود. همچنین میزان بیان در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نیز به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون مقایسه میانگین اختلاف معنی داری در بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۳۷ و ۲۸ درجه سانتی گراد در دو القاگر مشاهده نشد. میزان بیان با القاگر IPTG در دو دمای ۳۷ و ۲۸ درجه سانتی گراد به ترتیب ۱/۴۵ و ۱/۴۰ میلی گرم در میلی لیتر، و میزان بیان با القاگر لاکتوز در دو دمای ۳۷ و ۲۸ درجه سانتی گراد به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۰۵۸ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد (شکل ۴). در برخی از موارد گزارش شده است که سطوح دمایی ۳۷ تا ۲۸ درجه سانتی گراد تأثیر بسزایی در میزان بیان پروتئین ندارد (Larentis et al., 2014).



شکل ۴. میزان بیان پروتئین نوترکیب تحت شرایط دمایی ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد، و دو القاگر IPTG و لакتوز. ns: اختلاف غیرمعنی دار

**Figure 4. The level of recombinant protein expression under temperature conditions of 28°C and 37°C, using two inducers, IPTG and lactose. ns: Indicates non-significant difference**

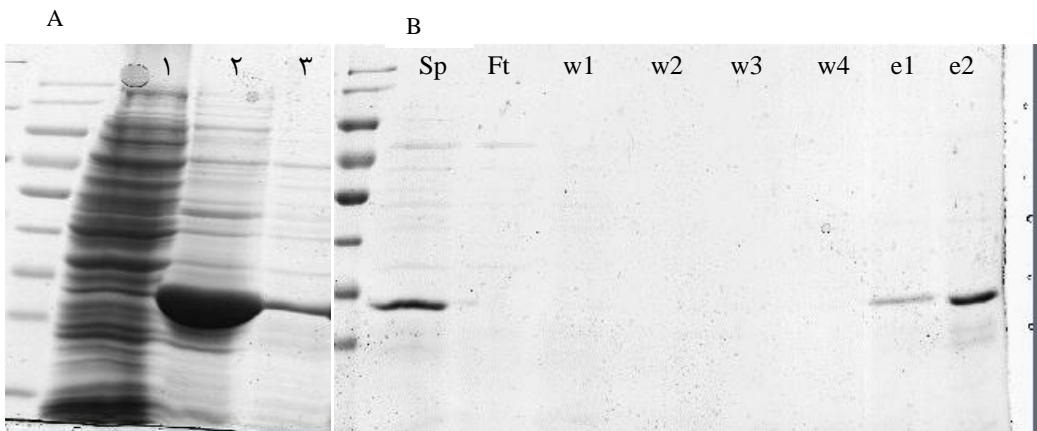
**تخليص پروتئين EcoRI و بازآرایي:** در اين بررسى پس از تأييد پروتئين نوترکیب بیان شده به شكل اجسام انکلوزيوني دو راهكار برای بازآرایي مجدد اجسام انکلوزيوني در نظر گرفته شد. اولين راهكار پس از جadasازی اجسام انکلوزيوني، استفاده از دialisiz و بافر بازآرایي به منظور تاخوردگي پروتئين نوترکیب است. سپس پروتئين بازآرایي شده با استفاده از ستون تمایلي خالص سازی گردید. با استفاده از اين روش در حدود ۱/۷ درصد پروتئين ها به شكل اجسام انکلوزيوني، بازآرایي شدند و بر روی ستون بارگذاري شدند (شکل ۵A و ۵B). در مجموع مقادير پروتئين خالص سازی شده در اين روش در حدود ۰/۷۹ ميلى گرم در ميلى ليتر بود. در روش دوم مرحله دialisiz حذف و هر دو مرحله بازآرایي و خالص سازی بر روی ستون و با استفاده از اوره ۳ مولار انجام شد و میزان پروتئين الوت شده از ستون در اين روش حدود ۰/۸۶ ميلى گرم در ميلى ليتر بدست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده، با توجه به صرف وقت و هزینه کمتر، بازدهی استفاده از ستون هاي نیکل به منظور بازآرایي و خالص سازی پروتئين بيشتر از روش دialisiz بوده است. بدینمنظور روش خالص سازی و بازآرایي همزمان پروتئين با استفاده از ستون بمنظور استفاده در آزمایشات بعدی انتخاب شد (شکل ۶). در اين روش با اتصال پروتئين نوترکیب و اسربسته (دارای برچسب هیستیدینی) به رزین، فرایند خالص سازی و بازآرایي در شستشوهاي متواли انجام می شود. بدین صورت كه پروتئين در حالت رقيق شده و متصل به ستون، امكان ايجاد تاخوردگي صحيح را خواهد داشت. Katalani et al. (2020) نشان داده اند كه پروتئين خالص سازی شده با استفاده از اين روش، ساختار عملکردي خود را حفظ می کند و از نظر ساختاري تفاوتی با پروتئینی كه به صورت محلول خالص سازی شده است ندارد (Katalani et al., 2020).

2020). برای حل کردن اجسام انکلوزیونی، چندین روش حل کردن ملایم<sup>۱۶</sup> وجود دارد که مولکول‌های پروتئین را در حالت اتحال‌پذیر و نیمه تاشده نگه می‌دارد. با این روش‌ها، بازآرایی مجدد مولکول‌های پروتئین محلول شده از یک فرم نیمه تاشده شروع می‌شود و از تجمع مجدد در طی تاخوردگی بعدی جلوگیری می‌کند (Trinh et al., 2021). با توجه به اینکه پروتئین EcoRI به شکل اجسام انکلوزیونی بیان گردید و تحت شرایط ملایم و اسرشت‌سازی اوره ۳ مولار حل شد، نشان‌دهنده این است که اجسام انکلوزیونی از نوع غیرکلاسیک است. با حذف عوامل حل کننده، اجسام انکلوزیونی بازآرایی نسبی خود را به دست می‌آورند. از جمله روش‌های مرسوم برای بازیابی (احیای) فعالیت پروتئین رقیق‌سازی پروتئین حل شده و دیالیز پروتئین حل شده در حضور بافر بازآرایی است. از جمله معایب این روش زیاد بودن حجم بافر موردنیاز در مقیاس انبوه است، از طرفی کارایی بازآرایی پروتئین در این روش کم است. روش‌های جایگزین برای بهبود کیفیت پروتئین بازآرایی شده و امکان افزایش مقیاس در کاربری‌های صنعتی، ابداع شده‌اند. بازآرایی پروتئین بر روی ستون کروماتوگرافی از جمله این روش‌ها است. فرایند بازآرایی پس از تثبیت پروتئین بر روی رزین‌های تمایلی (و یا سایر انواع ستون‌های کروماتوگرافی) روی می‌دهد که منجر به جداسازی پروتئین‌های بازآرایی شده و کاهش برهم‌کنش بین مولکولی می‌گردد (Oganesyan et al., 2005; Singh et al., 2015). فرایند تاخوردگی مجدد پروتئین در بسترها کروماتوگرافی را می‌توان در غلظت‌های بالای پروتئین انجام داد. همچنین، فرایند تاخوردگی مجدد با حذف عوامل و اسرشت‌ه کننده و خالص‌سازی پروتئین هدف همراه است. این کار موجب کاهش مراحل در فرایند خالص‌سازی می‌شود (Jungbauer et al., 2004; katalani et al., 2020) به ترتیب بافر بازآرایی بستگی دارد.

**بررسی فعالیت آنزیم نوترکیب:** نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم نشان داده است که آنزیم بازآرایی شده، پروتئینی فعال است. هر دو روش بازآرایی با استفاده از دیالیز و کروماتوگرافی قادر به بازآرایی پروتئین به شکل عملکردی خود شدند (شکل ۷). بر اساس نتایج حاصل از آزمون هضم بر پلاسمید pET28، پروتئین حاصل از هر دو روش خالص‌سازی، در دو غلظت ۱:۱۰۰ و ۱:۴۰۰، برش یگانه<sup>۱۷</sup> بر روی پلاسمید ایجاد کرد و فعالیت مشابه با آنزیم تجاری داشت (شکل ۷). در این بررسی و با توجه به نوع پروتئین مدنظر بازآرایی بر روی ستون روشی به صرفه و کاراتر است. در برخی از منابع کارایی بازآرایی بر روی ستون را حتی در مورد پروتئین‌های دارای چند باند دی سولفیدی بالا توصیف کردند (Oganesyan et al., 2005).

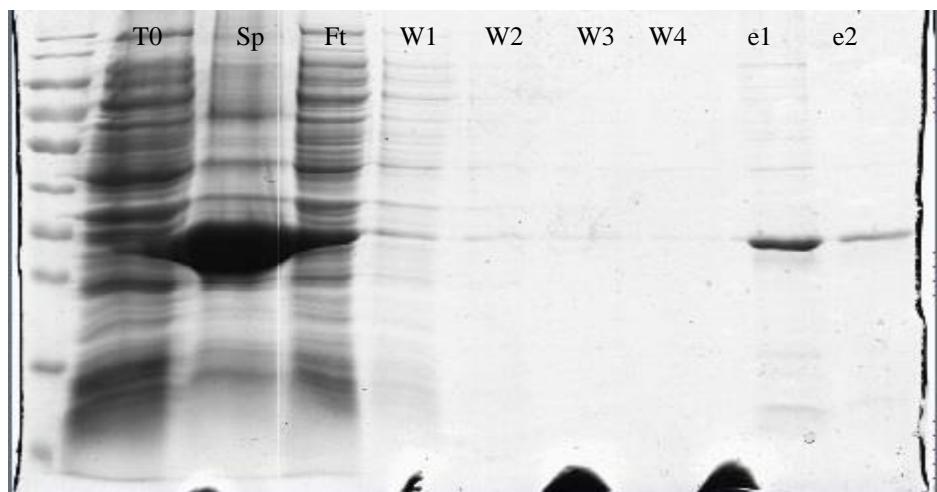
<sup>16</sup> mild solubilization

<sup>17</sup> Single digest



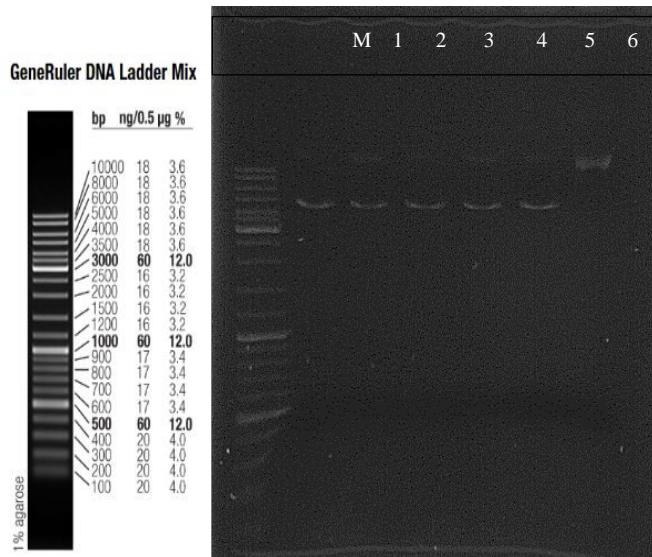
شکل ۵. بازآرایی و تخلیص پروتئین نامحلول (اجسام انکلوژیونی) با استفاده از دیالیز. A: ستون ۱: محتوای کل سلول قبل از القا، شماره ۲: پروتئین غیر محلول (اجسام انکلوژیونی) بعد از القا شماره ۳: پروتئین محلول پس از بازآرایی توسط دیالیز. B: مراحل تخلیص پروتئین بازآرایی شده با استفاده از دیالیز. Sp: محلول شناور رویی، Ft: محلول پس از عبور از رزین، W1 تا W4: شستشو ۱ تا ۴ و e1 و e2: الوشن ۱ و ۲

Figure 5. Refolding and purification of insoluble protein (inclusion bodies). A: Lane 1: Total cell content before induction, Lane 2: Insoluble protein (inclusion bodies), Lane 3: Soluble protein after refolding. B: Steps of purification for the refolded protein. Sp: Supernatant, Ft: Solution after passing through the resin, W1 to W4: Wash steps 1 to 4, e1 and e2: Elution 1 and 2



شکل ۶. تخلیص و بازآرایی پروتئین نوترکیب نامحلول با استفاده از رزین نیکل. ستون: T0 محتوای سلولی باکتری در زمان صفر پس از القا، ستون: sp: محلول شناور رویی حاوی محتوای پروتئین سلولی لیز شده. ستون: Ft : محلول شناور رویی پس از عبور از رزین، ستون: W1 تا W4: بافر شستشوی ۱ تا ۴، ستون: e1 و e2: الوشن ۱ و ۲ که برای جداسازی پروتئین از نیکل مورد استفاده قرار گرفت

Figure 6. Purification and refolding of insoluble recombinant protein on the column. T0 represents the bacterial cell content at time zero after induction, sp: Supernatant containing protein content of lysed cells. Ft: Supernatant after passing through the column, W1 to W4: Wash buffers 1 to 4, e1 and e2: Elution 1 and 2 used for separating the protein from nickel



شکل ۷. بررسی فعالیت آنزیم نوترکیب، نتایج هضم آنزیمی بعد از ۴ ساعت. ستون ۱: پلاسمید pET28 هضم شده (با وزن 5368bp) توسط آنزیم نوترکیب (بازآرایی بر ستون) رقیق شده (۱ به ۱۰۰)، ستون ۲: پلاسمید pET28 هضم شده توسط آنزیم نوترکیب (بازآرایی بر ستون) رقیق شده (۱ به ۴۰۰)، ستون ۳: پلاسمید pET28 هضم شده توسط آنزیم نوترکیب (بازآرایی با استفاده از دیالیز) رقیق شده (۱ به ۱۰۰)، ستون ۴: پلاسمید pET28 هضم شده توسط آنزیم نوترکیب (بازآرایی با استفاده از دیالیز) رقیق شده (۱ به ۴۰۰)، ستون ۵: پلاسمید pET28 هضم شده توسط آنزیم تجاری EcoRI شرکت Thermo، ستون ۶: پلاسمید pET28 هضم نشده به عنوان کنترل

**Figure 7. Evaluation of recombinant enzyme activity, showing results of enzymatic digestion after 4 hours. Lane 1: pET28 plasmid digested by recombinant enzyme (refolded on column), diluted (1 to 100); Lane 2: pET28 plasmid digested by recombinant enzyme (refolded on column), diluted (1 to 400); Lane 3: pET28 plasmid digested by recombinant enzyme (refolded using dialysis), diluted (1 to 100); Lane 4: pET28 plasmid digested by recombinant enzyme (refolded using dialysis), diluted (1 to 400); Lane 5: pET28 plasmid digested by commercial enzyme EcoRI from Thermo; Lane 6: Undigested pET28 plasmid as a control**

**نتیجه‌گیری:** انتخاب روش بهینه برای تولید و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب وابسته به عوامل متعددی است و نمی‌توان روشهای یکسان برای همه پروتئین‌ها پیشنهاد نمود. اگرچه بیان پروتئین به صورت محلول موجب حذف مراحل بعدی بازآرایی و تخلیص اجسام انکلوزیونی می‌شود، اما به دلیل مزایای تولید پروتئین‌ها به صورت اجسام انکلوزیونی که یکی از مهم‌ترین آن‌ها حفاظت در برابر هضم توسط پروتئازهای سلولی و حفظ ساختار عملکردی پروتئین در میان این اجسام است، تولید پروتئین به این روش موردنوجه است؛ بنابراین دستیابی به روش‌های بهینه بازآرایی و تخلیص اجسام انکلوزیونی حائز اهمیت است. نتایج این تحقیق نشان داده است که خالص‌سازی و بازآرایی همزمان آنزیم EcoRI بر روی ستون روشی سریع و کارآمد در مقایسه با روش دیالیز است.

**سپاسگزاری:** این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد شماره GABIT-93/D/PI186 انجام شده است.

## References

- Akiba, H., Tsumoto, K. (2016). Expression in Bacteria and Refolding. In: Senda, T., Maenaka, K. (eds) Advanced Methods in Structural Biology. Springer Protocols Handbooks. Springer, Tokyo. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56030-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56030-2_1)
- Al-Ayoubi, S. R., Schummel, P. H., Golub, M., Peters, J., & Winter, R. (2017). Influence of cosolvents, self-crowding, temperature and pressure on the sub-nanosecond dynamics and folding stability of lysozyme. *Phys Chem Chem Phys*, 19(22), 14230-14237. <https://doi.org/10.1039/c7cp00705a>
- Belková, M., Koszgova, R., & Nahálka, J. (2022). Active inclusion bodies: The unexpected journey. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 12(1), e5951-e5951. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.5951>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *elife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/elife.05826>
- Buckhout-White, S., Person, C., Medintz, I. L., & Goldman, E. R. (2018). Restriction enzymes as a target for DNA-based sensing and structural rearrangement. *ACS omega*, 3(1), 495-502. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01333>
- Burnett, M. J., & Burnett, A. C. (2020). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2), 121-132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
- de Marco, A., Ferrer-Miralles, N., Garcia-Fruitos, E., Mitraki, A., Peternel, S., Rinas, U., Trujillo-Roldan, M. A., Valdez-Cruz, N. A., Vazquez, E., & Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiol Rev*, 43(1), 53-72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy038>
- Dyson, M. R., Shadbolt, S. P., Vincent, K. J., Perera, R. L., & McCafferty, J. (2004). Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC biotechnology*, 4, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-4-32>
- Faust, G., Stand, A., & Weuster-Botz, D. (2015). IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, 15(8), 824-829. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500011>
- Gholami, S., Goodarzvand Chegini, K., Gheibi, N., Mokhtarian, K., Mohamadi, M., & Falak, R. (2017). Cloning, expression, and spectral analysis of mouse betatrophin. *Med J Islam Repub Iran*, 31, 102. <https://doi.org/10.14196/mjiri.31.102>
- Goppelt, M., Pingoud, A., Maass, G., Mayer, H., Koster, H., & Frank, R. (1980). The interaction of the EcoRI restriction endonuclease with its substrate. A physico-chemical study

employing natural and synthetic oligonucleotides and polynucleotides. *Eur J Biochem*, 104(1), 101-107. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1980.tb04405.x>

Hannig, G., & Makrides, S. C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 16(2), 54-60. [https://doi.org/10.1016/s0167-7799\(97\)01155-4](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(97)01155-4)

Huang, C. J., 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. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1082-9>

Idalia, V.-M. N., & Bernardo, F. (2017). *Escherichia coli* as a model organism and its application in biotechnology. *Recent Adv. Physiol. Pathog. Biotechnol. Appl. Tech Open Rij. Croat*, 13, 253-274. <https://doi.org/10.5772/67306>

Jungbauer, A., Kaar, W., & Schlegl, R. (2004). Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr Opin Biotechnol*, 15(5), 487-494. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.08.009>

Kachhwaha, K., Singh, S., Joshi, K., Nain, P., & Singh, S. K. (2023). Bioprocessing of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies: insights from structure-function relationship for novel applications. *Prep Biochem Biotechnol*, 53(7), 728-752. <https://doi.org/10.1080/10826068.2022.2155835>

Katalani, C., Nematzadeh, G., Ahmadian, G., Amani, J., Kiani, G., & Ehsani, P. (2020). In silico design and in vitro analysis of a recombinant trivalent fusion protein candidate vaccine targeting virulence factor of *Clostridium perfringens*. *Int J Biol Macromol*, 146, 1015-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.227>

Kato, A., & Ohashi, H. (2021). Quick refolding of high-concentration proteins via microchannel dialysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 60(28), 10076-10082. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c00410>

Kaur, J., Singh, A., Panda, A. K., & Lal, R. (2021). Protocol for in-vitro purification and refolding of hexachlorocyclohexane degrading enzyme haloalkane dehalogenase LinB from inclusion bodies. *Enzyme Microb Technol*, 146, 109760. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109760>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Larentis, A. L., Argondizzo, A. P., Esteves Gdos, S., Jessouron, E., Galler, R., & Medeiros, M. A. (2011). Cloning and optimization of induction conditions for mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) expression in *Escherichia coli* and recombinant protein stability during long-term storage. *Protein Expr Purif*, 78(1), 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.02.013>

Larentis, A. L., Nicolau, J. F. M. Q., Esteves, G. d. S., Vareschini, D. T., de Almeida, F. V. R., dos Reis, M. G., Galler, R., & Medeiros, M. A. (2014). Evaluation of pre-induction

- temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. *BMC research notes*, 7, 1-13. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-671>
- Liu, W., Chen, Y., Watrob, H., Bartlett, S. G., Jen-Jacobson, L., & Barkley, M. D. (1998). N-Termini of Eco RI Restriction Endonuclease Dimer Are in Close Proximity on the Protein Surface. *Biochemistry*, 37(44), 15457-15465. <https://doi.org/10.1021/bi980557f>
- Loenen, W. A., Dryden, D. T., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res*, 42(1), 3-19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt990>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martinez, R. A., Martinez Vivancos, A., Canovas Diaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21. *Front Microbiol*, 12, 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- McCarty, N. S., & Ledesma-Amaro, R. (2019). Synthetic Biology Tools to Engineer Microbial Communities for Biotechnology. *Trends Biotechnol*, 37(2), 181-197. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.11.002>
- Oganesyan, N., Kim, S.-H., & Kim, R. (2005). SOn-column protein refolding for crystallization. *Journal of structural and functional genomics*, 6, 177-182. <https://doi.org/10.1007/s10969-005-2827-3>
- Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. A. (2012). Optimization of TNF-alpha overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology: Purification of the protein and oligomerization studies. *Protein Expr Purif*, 86(1), 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.09.002>
- Peternel, S., & Komel, R. (2011). Active protein aggregates produced in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci*, 12(11), 8275-8287. <https://doi.org/10.3390/ijms12118275>
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more. *Nucleic Acids Res*, 42(12), 7489-7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>
- Pollastri, G., & McLysaght, A. (2005). Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, 21(8), 1719-1720. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti203>
- Qing, R., Hao, S., Smorodina, E., Jin, D., Zalevsky, A., & Zhang, S. (2022). Protein Design: From the Aspect of Water Solubility and Stability. *Chem Rev*, 122(18), 14085-14179. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00757>
- Sambrook, J. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Sanchez-Garcia, L., Martin, L., Mangues, R., Ferrer-Miralles, N., Vazquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact*, 15, 33. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0437-3>

- Schildkraut, I. (1984). Screening for and characterizing restriction endonucleases. In *Genetic engineering: principles and methods* (pp. 117-140). Springer.
- Schramm, F. D., Schroeder, K., & Jonas, K. (2020). Protein aggregation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 44(1), 54-72. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz026>
- Sen, S., & Nilsson, L. (1999). Structure, interaction, dynamics and solvent effects on the DNA-EcoRI complex in aqueous solution from molecular dynamics simulation. *Biophys J*, 77(4), 1782-1800. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77024-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77024-4)
- Singh, A., Upadhyay, V., & Panda, A. K. (2015). Solubilization and refolding of inclusion body proteins. *Methods Mol Biol*, 1258, 283-291. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_15)
- Singh, A., Upadhyay, V., Singh, A., & Panda, A. K. (2020). Structure-Function Relationship of Inclusion Bodies of a Multimeric Protein. *Front Microbiol*, 11, 876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00876>
- Singhvi, P., & Panda, A. K. (2022). Solubilization and refolding of inclusion body proteins. In *Insoluble proteins: methods and protocols* (doi:10.1007/978-1-0716-1859-2\_22pp. 371-387). Springer. [https://doi.org/doi:10.1007/978-1-0716-1859-2\\_22](https://doi.org/doi:10.1007/978-1-0716-1859-2_22)
- Singhvi, P., Saneja, A., Srichandan, S., & Panda, A. K. (2020). Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. *Trends Biotechnol*, 38(5), 474-486. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.011>
- Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., & Thao, D. T. P. (2021). Production of PEGylated GCSF from Non-classical Inclusion Bodies Expressed in Escherichia coli. *Avicenna J Med Biotechnol*, 13(4), 192-200. <https://doi.org/10.18502/ajmb.v13i4.7204>
- Ventura, S., & Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol*, 24(4), 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.007>
- Yamaguchi, H., & Miyazaki, M. (2014). Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1), 235-251. <https://doi.org/10.3390/biom4010235>