



Shahid Bahonar  
University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

p-ISSN 2228-6705

e-ISSN 2228-6500



Iranian Biotechnology  
Society

## **The Production Optimization of Recombinant Cryptochrome DASH1 of Green Algae *Volvox carteri* in *Escherichia coli*: Investigation of Solubility and Binding to DNA**

### **Saeed Mahdavi**

PhD student, Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: [smahdavi007@gmail.com](mailto:smahdavi007@gmail.com)

### **Jafar Razeghi**

\*Assistant Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Tel: +989144033450, Email: [Jafar\\_Razeghi@Tabrizu.ac.ir](mailto:Jafar_Razeghi@Tabrizu.ac.ir)

### **Maghsoud Pazhouhandeh**

Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Tabriz, Iran. Email: [pazhohandeh@yahoo.com](mailto:pazhohandeh@yahoo.com)

### **Arash Kianianmomeni**

Associate Professor, Department of Cellular and Developmental Biology of Plants, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany. Email: [kianiana@googlemail.com](mailto:kianiana@googlemail.com)

### **Ali Movafeghi**

Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: [amovafe@hotmail.com](mailto:amovafe@hotmail.com)

### **Abstract**

#### **Objective**

Optogenetics, as a new scientific branch, uses the photoreceptors to conduct basic and applied research. Identification of the novel photoreceptors and their characteristics is a way to develop the optogenetics. Cryptochrome/Photolyase protein family DASH cryptochromes have DNA repair ability and play role in signaling pathways. Current

research goal was the adequate production of the *Volvox* predicted DASH1 cryptochrome protein (VcCryDASH1) to use in spectroscopy studies as well as DNA repair assay.

### Materials and methods

First, the coding sequence of VcCryDASH1 was isolated from *Volvox carteri* cDNA library using the specific primers and cloned into pGEX-2TK expression vector. The recombinant protein production was analyzed using two different strains of *E. coli* under different incubation times, using IPTG to induce the protein expression and then its solubility was investigated by SDS-PAGE. DNA binding ability of the protein was studied by alignment method.

### Results

The appropriate production of the protein obtained in Rosetta strain at 32°C under more than 3 hours incubation. Approximately, 50 percent of the protein was insoluble under 1 and 3 hours incubations. VcCryDASH1 alignment analysis showed that there is high percentage of amino acids in this protein with DNA binding ability.

### Conclusion

These results revealed that under optimum conditions, VcCryDASH1 has dual solubility but our approach can produce the adequate quantity of the protein in the Rosetta. Also, because of having conserved amino acids, the protein can bind to DNA, nominating it as a possible resource to design the DNA- light mediator molecules in optogenetics.

**Keywords:** DASH1 cryptochrome, Expression vector, Rosetta strain, *Volvox carteri*.

**Citation:** Mahdavi S, Razeghi J, Pazhouhandeh M, Kianianmomeni A (2019) The Production Optimization of Recombinant Cryptochrome DASH1 of Green Algae *Volvox carteri* in *Escherichia coli*: Investigation of Solubility and Binding to DNA. Agricultural Biotechnology Journal 10 (4), 147-170.

DOI: 10.22103/jab.2019.2254

Received: September 16, 2018; Accepted: December 7, 2018

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

## بهینه‌سازی تولید پروتئین نو ترکیب کریپتوکروم DASH1 جلبک سبز *Volvox carteri* در

### باکتری *Escherichia coli*: بررسی حالیت و اتصال به DNA

سعید مهدوی

دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. ایمیل:

[smahdavi007@gmail.com](mailto:smahdavi007@gmail.com)

جعفر رازقی

\*نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۰۹۱۴۴۰۳۳۴۵۰، ایمیل:

[Jafar\\_Razeghi@Tabrizu.ac.ir](mailto:Jafar_Razeghi@Tabrizu.ac.ir)

مقصود پژوهنده

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، کیلومتر ۳۵ جاده تبریز- آذر شهر، ایران. ایمیل:

[pazhohandeh@yahoo.com](mailto:pazhohandeh@yahoo.com)

آرئن کیانیان مومنی

دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و تکوینی گیاهی، دانشگاه بیله فلد، بیله فلد، آلمان. ایمیل: [kianiana@googlemail.com](mailto:kianiana@googlemail.com)

علی موافقی

استاد، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. ایمیل: [amovafe@hotmail.com](mailto:amovafe@hotmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۶

### چکیده

**هدف:** اپتوژنتیک به عنوان یک شاخه علمی جدید، از فتورسپتورها به منظور اجرای تحقیقات پایه‌ای و کاربردی استفاده می‌کند. یکی از راه‌های توسعه اپتوژنتیک، شناسایی فتورسپتورهای جدید و تعیین خصوصیات آن‌هاست. کریپتوکروم‌های DASH متعلق به خانواده پروتئینی کریپتوکروم/فتولیا، فتورسپتورهای دارای قابلیت ترمیم DNA بوده و در مسیرهای پیام‌رسانی علامت نقش دارند. هدف این تحقیق، تولید کافی پروتئین پیش‌گویی‌شده کریپتوکروم DASH1 ولوکس (VcCryDASH1)، برای استفاده در مطالعات طیف جذبی و نیز بررسی قابلیت ترمیم DNA می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا توالی کدکننده پروتئین VcCryDASH1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، از کتابخانه cdNA جلبک *Volvox carteri* جداسازی و در پلاسמיד بیانی pGEX-2TK همسانه‌سازی شد. تولید پروتئین نو ترکیب در دو سویه متفاوت

باکتری *E. coli* و همچنین تحت تاثیر زمان‌های مختلف القاء با IPTG و همچنین میزان انحلال‌پذیری آن توسط روش SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی قابلیت اتصال به DNA در این پروتئین، با روش هم‌ردیف‌سازی انجام شد.

**نتایج:** تولید کافی پروتئین، در سویه Rosetta، در  $37^{\circ}\text{C}$ ، و زمان القاء بیش از ۳ ساعت بدست آمد. در زمان القاء ۱ و ۳ ساعت، نیمی از پروتئین به صورت نامحلول بود. هم‌ردیف‌سازی پروتئین VcCryDASH1 مشخص نمود که درصد بالایی از آمینواسیدهای متصل‌شونده به DNA، در این پروتئین حضور دارند.

**نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان می‌دهند که پروتئین VcCryDASH1 تحت شرایط بهینه، دارای قابلیت انحلال‌پذیری دوگانه بوده اما روش ما می‌تواند مقدار کافی آن را در باکتری *E. coli* سویه Rosetta تولید کند. همچنین بدلیل داشتن آمینواسیدهای حفاظت‌شده، این پروتئین دارای قابلیت اتصال به DNA می‌باشد که آن را به‌عنوان یک منبع احتمالی جهت طراحی مولکول‌های میانجی نور-DNA در اپتوژنتیک معرفی می‌نماید.

**کلمات کلیدی:** سویه Rosetta، کریپتوکروم DASH1، وکتوریایی، *Volvox carteri*.

## مقدمه

اپتوژنتیک یک شاخه علمی جدید برای استفاده از فتورسپتورها به‌منظور اجرای تحقیقات پایه‌ای و کاربردی است که در ابتدا به‌عنوان روش بکارگیری نور برای کنترل فعالیت نورون‌ها و کنترل عملکرد ارگانیسم، در علم عصب‌شناسی<sup>۱</sup> مورد استفاده قرار گرفته‌است (Crick 1979; Crick 1999; Deisseroth et al. 2006). استفاده موفقیت‌آمیز اپتوژنتیک در علوم اعصاب، توجه بیوتکنولوژیست‌ها را به خود جلب نمود. بدین ترتیب زمینه‌ای از زیست‌فناوری بوجود آمد که برای ایجاد ابزارهای جدید (مانند ابزارهای انجام آزمایشات ژنتیکی قابل کنترل توسط نور) مهندسی ژنتیک را با علم اپتیک ترکیب کرد (Miesenbock 2009; Deisseroth 2011). شناسایی کانال‌رودوپسین‌ها باعث شروع استفاده از فتورسپتورهای جلبکی در زیست‌شناسی سنتزی<sup>۲</sup> شد. این کانال‌های کنترل‌شونده توسط نور، به‌منظور کنترل غیرتهاجمی پتانسیل الکتریکی غشاءسلولی، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. امروزه از  $\text{CrChR2}^3$  به‌عنوان ابزار مولکولی در اپتوژنتیک استفاده می‌شود. کیانیان‌مومنی و همکاران (2009) پروتئینی به‌نام  $\text{VChR1}^4$  (همولوگ  $\text{CrChR2}$  می‌باشد) را در جلبک *ولوکس* شناسایی کردند. از آن‌جایی که برای تحریک  $\text{CrChR2}$  در

1. Neurobiology
2. Synthetic biology
3. *Chlamydomonas reinhardtii* Channelrhodopsin-2
4. *Volvox* Channelrhodopsin-1

Nagel et al. 2002; Nagel et al. 2003; ) مقایسه با VChR1، به طول موج کوتاهتری از نور نیاز است ( Kianianmomeni et al. 2009) و این طول موج دارای اثرات مضر بر حیوانات و انسان می‌باشند، استفاده آن در پزشکی خطرناک بوده، بنابراین با بکارگیری VChR1 می‌توان جلوی آسیب‌های احتمالی تابش مضر را گرفت. بدین ترتیب، توصیف یک فتورسپتور جدید دارای ویژگی مشترک با فتورسپتورهایی که قبلاً استفاده شده‌اند، می‌تواند به محققان کمک کند تا ابزارهای مولکولی خود را به‌روز نمایند. LITEs<sup>۵</sup> و سویچ‌های نوری<sup>۶</sup> پاسخگو به تابش UV، از دیگر ابزارهای اپتوژنتیکی می‌باشند که با استفاده از فتورسپتورهای گیاهی ایجاد شده‌اند. LITEs با استفاده از الحاق پروتئین‌های AtCry2<sup>۷</sup>، AtCIB1<sup>۸</sup> و XaTALES<sup>۹</sup>، ایجاد شده و برای فعال‌سازی برگشت‌پذیر رونویسی از ژن‌ها، بکار می‌روند. این سیستم مولکولی محققان را قادر می‌سازد تا نقش تنظیمات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی را در بروز بیماری‌ها به‌خوبی مطالعه نمایند (Koner mann et al. 2013). سوئیچ‌های نوری پاسخگو به تابش UV از فتورسپتور AtUVR8<sup>۱۰</sup> و پروتئین AtCOP1<sup>۱۱</sup> تولید و به‌منظور کنترل دقیق برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین برای بررسی مسیر ترشحی در سلول‌های عصبی، ورود پروتئین به هسته، انجام Chromatin targeting و کنترل بیان ژن مورد استفاده قرار گرفته است (Kianianmomeni 2015). با شناسایی و توصیف یک فتورسپتور (از نظر ویژگی‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی مانند طیف جذب، فعالیت آنزیمی و عملکرد بیولوژیکی) و پروتئین برهمکنش‌دهنده با آن، می‌توان به طراحی ابزارهای اپتوژنتیک جدید برای تنظیم فرایندهای سلولی پرداخت. یکی دیگر از گروه‌های فتورسپتوری که می‌توانند در اپتوژنتیک مورد استفاده قرار گیرند، کریپتوکروم‌های DASH هستند. اصطلاح کریپتوکروم DASH برای نامیدن زیرشاخه جدیدی از خانواده‌ی CPF<sup>۱۲</sup>، پیشنهاد شده‌است (Brudler et al. 2003). این گروه پروتئینی، در طیف وسیعی از موجودات تک‌سلولی و پرسلولی، شناسایی شده‌اند (Lin & Todo 2005) که از نظر ساختاری، همانند دیگر گروه‌های خانواده CPF دارای دمین<sup>۱۳</sup> PHR بوده و قادرند نور را در محدوده UV-B تا آبی (290-495 nm) جذب نمایند. وجود این ویژگی، ناشی از حضور کروموفورهای فلاوین آدنین دی‌نوکلئوتید<sup>۱۴</sup> به‌عنوان کروموفور کاتالیتیک و به احتمال فراوان متیل‌تتراهیدروفولات<sup>۱۵</sup>، به‌عنوان کروموفور ثانویه است. طی مطالعات انجام شده، فعالیت‌های مختلفی برای کریپتوکروم‌های

5. Light-Inducible Transcriptional Effectors
6. Photoswitches
7. *Arabidopsis thaliana* Cryptochrome-2
8. *Arabidopsis thaliana* Calcium binding Integrin binding protein 1
9. *Xanthomonas* sp. Transcription Activator-Like Effectors
10. *Arabidopsis thaliana* UV-B resistance 8
11. *Arabidopsis thaliana* Constitutive Photomorphogenesis 1
12. Cryptochrome/Photolyase Family
13. Photolyase-Homologous Region
14. Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)
15. Methyltetrahydrofolate (MTHF)

DASH پیشنهاد شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به ترمیم آسیب‌های CPD<sup>۱۶</sup> موجود در DNA تکرشته‌ای<sup>۱۷</sup> و CPD درون لوپ‌های DNA دورشته‌ای<sup>۱۸</sup>، داشتن نقش احتمالی در ترمیم CPD موجود در RNA، تنظیم بیان ژن‌ها در مرحله پس از رونویسی، نقش احتمالی در مسیرهای پیام‌رسانی نور آبی و تنظیم ساعت شبانه‌روزی (سیرکادینی) اشاره کرد (Chaves et al. 2011). کریپتوکروم‌های DASH بدلیل جذب نور، اتصال به DNA و ترمیم آن، در آینده می‌توانند برای ایجاد ابزارهای ترمیم‌کننده‌ی DNA القاشونده با نور<sup>۱۹</sup> مورد استفاده قرار گیرند (Kianianmomeni & Hallmann 2016). پیش‌نیاز ضروری برای مطالعه و یا استفاده‌ی کاربردی از هر نوع پروتئینی، شناسایی و یافتن منبع مناسب تولیدکننده پروتئین است. استخراج پروتئین از منابع طبیعی و استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب، دو روش رایج برای تهیه پروتئین می‌باشد (Walsh 2014). بدین ترتیب هدف از این پژوهش بررسی شرایط مناسب پروتئین نوترکیب GST-VcCryDASH1 به‌صورت محلول، در باکتری *E. coli* بوده تا بتوان از پروتئین تخلیص‌شده به‌منظور تعیین ویژگی‌های بیوفیزیکی، ساختاری و عملکردی فتورسپتور VcCryDASH1 استفاده نمود.

## مواد و روش

### انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۲۰</sup> و ایجاد پلاسمید نوترکیب

استخراج RNA با روش ترايزول از جلبک *Volvox carteri f. nagariensis* مطابق دستورالعمل شرکت سیگما (USA) با کمی تغییرات انجام شد. سپس توسط کیت RevertAid First Strand cDNA synthesis (Thermo scientific, USA) سنتز cDNA انجام و به‌عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای تکثیر توالی نوکلوتیدی مربوط به پروتئین پیش‌گویی‌شده VcCryDASH1، از آغازگر رفت (d1FpBamHI) و آغازگر برگشت (d1RpEcoRI) (جدول ۱) در واکنش PCR به حجم ۲۵ μl دارای ViBufferA با غلظت ۱X، MgCl<sub>2</sub> با غلظت ۱/۵ mM، dNTP Mix با غلظت ۰/۳ mM، DMSO با غلظت ۳٪ و *Pfu* DNA Polymerase به مقدار ۱/۵ U (Vivantis, Malaysia) استفاده شد. برنامه دمایی PCR به‌صورت دمای واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵°C به مدت ۲ min که به دنبال آن چرخه دمایی ۴۵ تایی دارای دمای واسرشت‌سازی ۹۴°C به مدت ۲۰ s، دمای اتصال ۵۸°C به مدت ۳۰ s و دمای سنتز ۷۲°C

- 
16. Cyclobutane Pyrimidine Dimer
  17. Single-stranded DNA
  18. Double-stranded DNA
  19. Light-Inducible DNA-Repairs (LIDRs)
  20. PCR

به مدت ۴ min و پس از پایان چرخه‌ها دمای سنتز نهایی  $73^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷ min اعمال شد. تخلیص محصول PCR مورد نظر از ژل آگارز با استفاده از کیت PureLink™ Quick (Thermo Scientific) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای ایجاد پلاسمید نوترکیب بیانی (تحت نام pGCD1) از وکتور pGEX2TK و قطعه تخلیص شده فوق استفاده شد. بدین منظور از آنزیم‌های برشی *EcoRI*, *BamHI* و آنزیم *T4* لیگاز (شرکت Thermo Scientific، USA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات استفاده گردید. پلاسمید pGCD1 توسط روش TSS (Chung et al. 1989) به باکتری *E. coli* سویه Top10 تراریزش شد و باکتری تراریخت شده در محیط کشت انتخابگر LB-Agar (Luria-Bertani) حاوی  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  آمپی‌سیلین کشت داده شد. کلون‌های مثبت با استفاده از Colony PCR و همچنین برش پلاسمید استخراج شده (Birnboim 1983) از کلون‌ها، مشخص شدند. تعیین توالی پلاسمید مربوط به ۳ کلون مثبت توسط شرکت توپاز ژن کاوش (ایران، کرج) برای تایید نهایی توالی انجام شد. از پلاسمید نوترکیب pGCD1 مربوط به کلون شماره ۱۶ (pGCD1co16) در مراحل بعدی پژوهش استفاده گردید.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مخصوص تکثیر توالی کدکننده پروتئین VcCryDASH1. نواحی خط کشیده شده، جایگاه برش آنزیمه *BamHI* و *EcoRI* را نشان می‌دهد.

**Table 1. The specific primers to amplify VcCryDASH1 coding sequence. The underlined sequences show the *BamHI* and *EcoRI* digestion sites.**

ردیف Line	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	نام ژن تکثیرشونده (نوع آغازگر) Amplicon name (Primer type)
1	VcCryd1 FP- <i>Bam</i> HI	AAGGATCCATGGCCGCGCCGGCTG	<i>DASH1</i> (Forward primer)
2	Vc Cryd1 RP- <i>Eco</i> RI	AAGAATTCTCACTTGTAACGCTCGAACTC	<i>DASH1</i> (Reverse primer)

#### تراریزش باکتری‌های *E. coli* سویه Top10 و Rosetta با پلاسمید pGCD1co16

پلاسمید pGEX-2TK به‌عنوان کنترل منفی و pGCD1co16 برای تراریخت نمودن باکتری‌های *E. coli* سویه Top10 و Rosetta با استفاده از روش TSS مورد استفاده قرار گرفتند. برای انتخاب باکتری‌های تراریخت شده Top10 و

Rosetta از محیط LB Agar به ترتیب حاوی  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  آمپی سیلین؛ و حاوی  $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$  آمپی سیلین و  $30 \mu\text{g.ml}^{-1}$  کلرامفنیکل و نگهداری در دمای  $37^\circ\text{C}$  استفاده شد.

### بررسی بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E. coli* سویه Rosetta و Top10

جهت بررسی بیان ژن تولیدکننده پروتئین VcCryDASH1co16 متعلق به ولوکس در میزبان باکتریایی، پارامترهای pH (۵/۵)، دما ( $32^\circ\text{C}$ ) و غلظت IPTG (۳ mM) ثابت در نظر گرفته شد و بررسی بیان در دو سویه مختلف (سویه های Top10 و Rosetta) و در زمان های القاء متفاوت (۱، ۳ و ۹ ساعت) مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ابتدا از کلنی های باکتری *E. coli* سویه Top10 یا Rosetta که دارای پلاسمیدهای pGEX-2TK یا pGCD1co16 بودند، به حجم ۵ ml پیش کشت تهیه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای  $32^\circ\text{C}$  با دور ۱۰۰ rpm در انکوباتور قرار داده شد. ۱ ml از پیش کشت به ۶ ml از مایع حاوی آنتی بیوتیک مناسب تلقیح شد و در  $32^\circ\text{C}$  تا رسیدن به جذب نوری (OD ۰.۶) حدود ۰/۶ rpm در ۱۵۰ rpm در انکوباتور قرار گرفت. پس از رسیدن به غلظت مورد نظر، نمونه برداری (به حجم ۱ ml) انجام شد. به باقیمانده ی کشت باکتری مقداری IPTG اضافه شد تا غلظت نهایی آن ۳ mM شود و همانند بالا در دمای  $32^\circ\text{C}$  با دور ۱۵۰ rpm انکوبه شد. بر روی نمونه ای که قبل از اعمال القاء بیان (نمونه ی قبل از اعمال القاء بیان) برداشته شد، به منظور آماده سازی برای انجام SDS-PAGE مراحل زیر انجام گردید:

ابتدا نمونه به مدت ۱ min در ۱۳۳۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. روشناور دور ریخته شد و رسوب باکتری در  $100 \mu\text{l}$  از بافر بارگذاری (۵X) ژل SDS-PAGE معلق شد. سپس در  $100^\circ\text{C}$  به مدت ۵ min حرارت داده شد. در نهایت به مدت ۱ min در ۱۳۳۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و تا آماده شدن بقیه نمونه ها، درون یخ قرار داده شد. سپس در زمان های ۱، ۳ و ۹ ساعت بعد از القاء بیان پروتئین نمونه برداری همانند آنچه در بالا گفته شد، انجام گردید. پس از آماده سازی نمونه ها ژل SDS-PAGE ۱۰٪ مطابق روش Laemmli (1970) انجام شد. میزان بارگذاری در هر چاهک برابر ۱۵٪ از جذب نوری در ۵۵۰ nm برای هر نمونه بود. الکتروفورز در  $4^\circ\text{C}$  و با ولتاژ ۱۸۰-۱۰۰ ولت به مدت ۵ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل مطابق روش کوماسی بلو انجام شد (Ahmed 2004).

### بررسی حالیت و تخلیص پروتئین نوترکیب GST-VcCryDASH1co16 در باکتری *E. coli* سویه

#### Rosetta

ابتدا حالیت پروتئین VcCryDASH1 متصل به GST توسط سرور PROSOII پیش گویی شد. به منظور بررسی میزان انحلال پذیری و خالص سازی این پروتئین، باکتری *E. coli* سویه Rosetta به ترتیب دارای پلاسمید pGCD1co16، با ۳ mM IPTG به مدت ۱ و ۳ ساعت (در آزمایش مربوط به انحلال پذیری) و دارای پلاسمید pGEX- یا pGCD1co16 با 2TK ۳ mM از IPTG به مدت ۱۲ (در آزمایش مربوط به تخلیص پروتئین) ساعت در دمای  $32^\circ\text{C}$  تحت القاء قرار گرفتند.



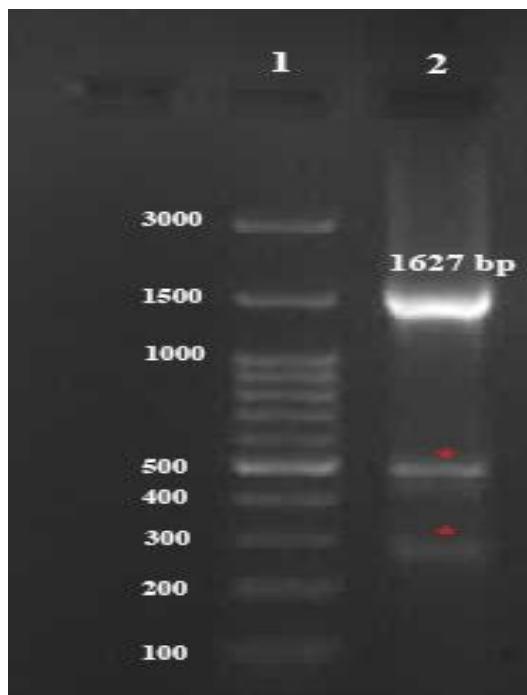
پس از پایان زمان القاء بیان، سانتریفیوژ در ۵۰۰۰g در دمای ۴°C به مدت ۱۵ min انجام و محلول رویی دور ریخته شد. به رسوب باکتری بدست آمده از ۱ ml کشت باکتری، ۳۰ μl از محلول PBS سرد (حاوی ۱۴۰ mM NaCl، ۲/۷ mM KCl، ۱۰ mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>، ۱/۸ mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>؛ با pH برابر با ۷/۳) اضافه و معلق سازی رسوب باکتری انجام شد. تخریب دیواره باکتری توسط امواج فراصوت و در روی یخ انجام گردید. سپس سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰g به مدت ۵۰ min در ۴°C انجام شد. محلول رویی به تیوب جدید انتقال داده شد. بخشی از روشناور برای بررسی حلالیت مورد استفاده قرار گرفت و بقیه به منظور تخلیص پروتئین در دمای ۸۰°C- قرار داده شد. جهت تخلیص پروتئین GST-VcCryDASH1 از روشناور، کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از سوسپانسیون گلوکوتائین سفاروزبید (GE Healthcare, USA) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. همچنین به رسوب حاصل از تخریب دیواره سلولی به ازای ۱ ml از کشت، ۲۰ μl از محلول PBS سرد اضافه و معلق سازی انجام شد. سپس به منظور بررسی میزان انحلال پذیری پروتئین GST-VcCryDASH1co16 و تایید خالص شدن آن توسط کروماتوگرافی تمایلی، الکتروفورز SDS-PAGE انجام شد. برای رنگ آمیزی ژل از روش کوماسی بلو استفاده شد.

#### مطالعه قابلیت اتصال پروتئین VcCryDASH1co16 به DNA با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک

از خانواده پروتئینی DNA فتولیز، پروتئین های Deoxyribodipyrimidine photo-lyase (که قابلیت اتصال به DNA آسیب دیده در آن ها اثبات شده است) متعلق به *E. coli*، *Thermus thermophilus*، *Synechocystis sp.* و همچنین پروتئین *Synechococcus sp.* به ترتیب با اعداد دسترسی P00914، P61497، Q55081 و P05327 و همچنین پروتئین کریبتوکروم ۱ متعلق به *Arabidopsis thaliana* (پروتئینی که عدم اتصال آن به DNA اثبات شده است) با عدد دسترسی Q43125 از پایگاه داده ای Uniprot بازیابی شدند. همردیف سازی این پروتئین ها با توالی آمینواسیدی VcCryDASH1 توسط سرور Clustal omega انجام شد (Sievers & Higgins 2018). سپس مکان آمینواسیدهای شاخص دارای قابلیت اتصال به DNA در خروجی همردیف سازی مشخص و میزان شباهت با این آمینواسیدها در پروتئین VcCryDASH1co16 محاسبه گردید.

#### بحث

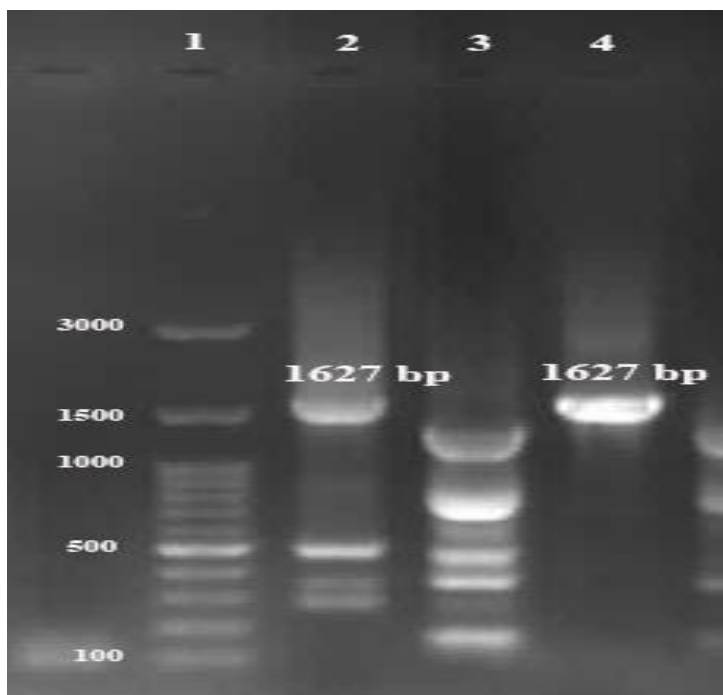
با استفاده از واکنش PCR که توسط آنزیم *Pfu* DNA polymerase (دارای قابلیت تصحیح کنندگی) و آغازگرهای *d1RpEcoRI* و *d1FpBamHI* انجام شد، سه محصول PCR ایجاد گردید. طول صحیح محصول PCR مربوط به قطعه کدکننده کریبتوکروم DASH1 برابر با ۱۶۲۷ bp می باشد. به همین دلیل محصول فوق از ژل استخراج شد (شکل ۱).



شکل ۱. تکثیر توالی کدکننده VcCryDASH1 با استفاده از واکنش PCR و مشاهده آن بر روی ژل آگارز ۱٪. چاهک ۱: اندازه‌نمای (مارکر) DNA (اعداد سمت چپ، طول باندهای مارکر را نشان می‌دهند. برخی از اندازه‌ها نشان داده نشده‌اند)؛ چاهک ۲: محصول PCR توالی کدکننده VcCryDASH1. ستاره‌های قرمز رنگ محصول غیراختصاصی را نشان می‌دهند.

**Figure 1. Amplification of VcCryDASH1 coding sequence, by PCR reaction and its checking on 1% (w/v) agarose gel. Lane 1: DNA Ladder (The left numbers show the length of Ladder bonds. Some sizes haven't been shown.); Lane 2: the PCR product of VcCryDASH1 coding sequence. Red stars show non-specific products.**

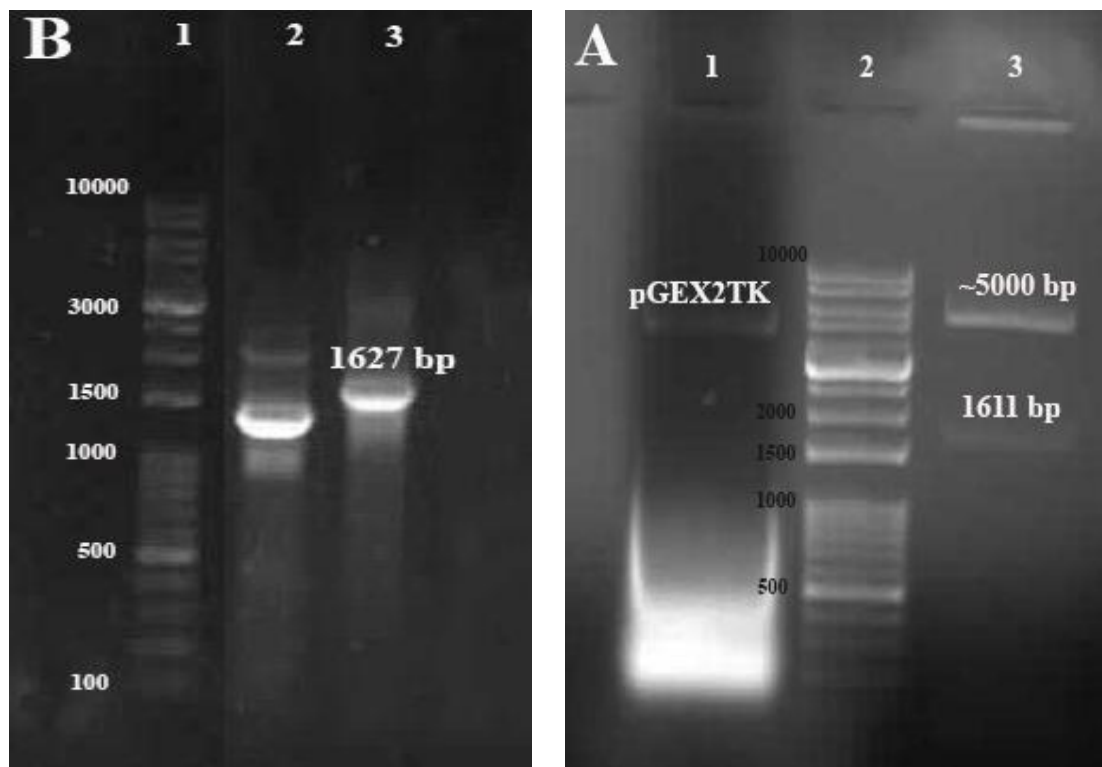
واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *BamHI* بر روی قطعه تخلیص شده از ژل و همچنین پلاسمید بیانی pGEX-2TK انجام شد. به منظور پاکسازی محصول برش مجدداً الکتروفورز انجام و تخلیص باندها از ژل صورت گرفت. با استفاده از آنزیم *T4* لیگاز، پلاسمید و محصول PCR برش خورده، به یکدیگر متصل شدند (پلاسمید نوترکیب به نام pGCD1 ایجاد شد). پس از تراریزش آن به باکتری *E. coli* سویه Top10، باکتری تراریخت شده در محیط کشت انتخابی گسترده شد. پس از رشد کلنی‌ها در محیط کشت انتخابی، برای تعیین کلنی‌های دارای پلاسمید نوترکیب، کلنی PCR انجام شد (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی اولیه نتیجه همسانه‌سازی ژن *VcCryDASH1*، با استفاده از انجام غربالگری کلنی - PCR بر روی سویه Top10 تراریخت شده. چاهک ۱: اندازه‌نمای (مارکر) DNA (اعداد سمت چپ، طول باندهای مارکر را نشان می‌دهند. برخی از اندازه‌ها نشان داده نشده‌اند)؛ چاهک‌های ۲ و ۴: محصول PCR دو کلنی دارای پلاسمید pGCD1 (کلون‌های مثبت)؛ چاهک ۳: محصول PCR یک کلنی دارای پلاسمید pGEX-2TK (کلون منفی).

**Figure 2.** The rudimentary study of *VcCryDASH1* cloning result, by doing the Colony PCR screening on transgenic Top10 strain. Lane 1: DNA Ladder (The left numbers show the length of Ladder bonds. Some sizes haven't been shown.); Lane 2 and 4: the PCR products for two colonies with pGCD1 (Positive colonies); Lane 3: the PCR product for a colony with pGEX-2TK (Negative colony).

سپس از کلون‌های مثبت، استخراج پلاسمید انجام و توسط واکنش PCR و همچنین هضم دوگانه آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI*، از حضور و استقرار صحیح قطعه درج شده در پلاسمید pGEX-2TK، اطمینان حاصل شد (شکل ۳). برای بررسی نهایی سه کلون تایید شده، تعیین تترادف شدند (شرکت توپاز ژن، کرج). توالی بدست آمده از تعیین تترادف، با توالی کدکننده این ژن که از پایگاه داده‌ای Phytozome بازیابی شده بود (دارای عدد دسترسی 1.Vocar.0004s0450)، توسط الگوریتم ClustalW هم‌ردیف‌سازی شد (شکل ۴).



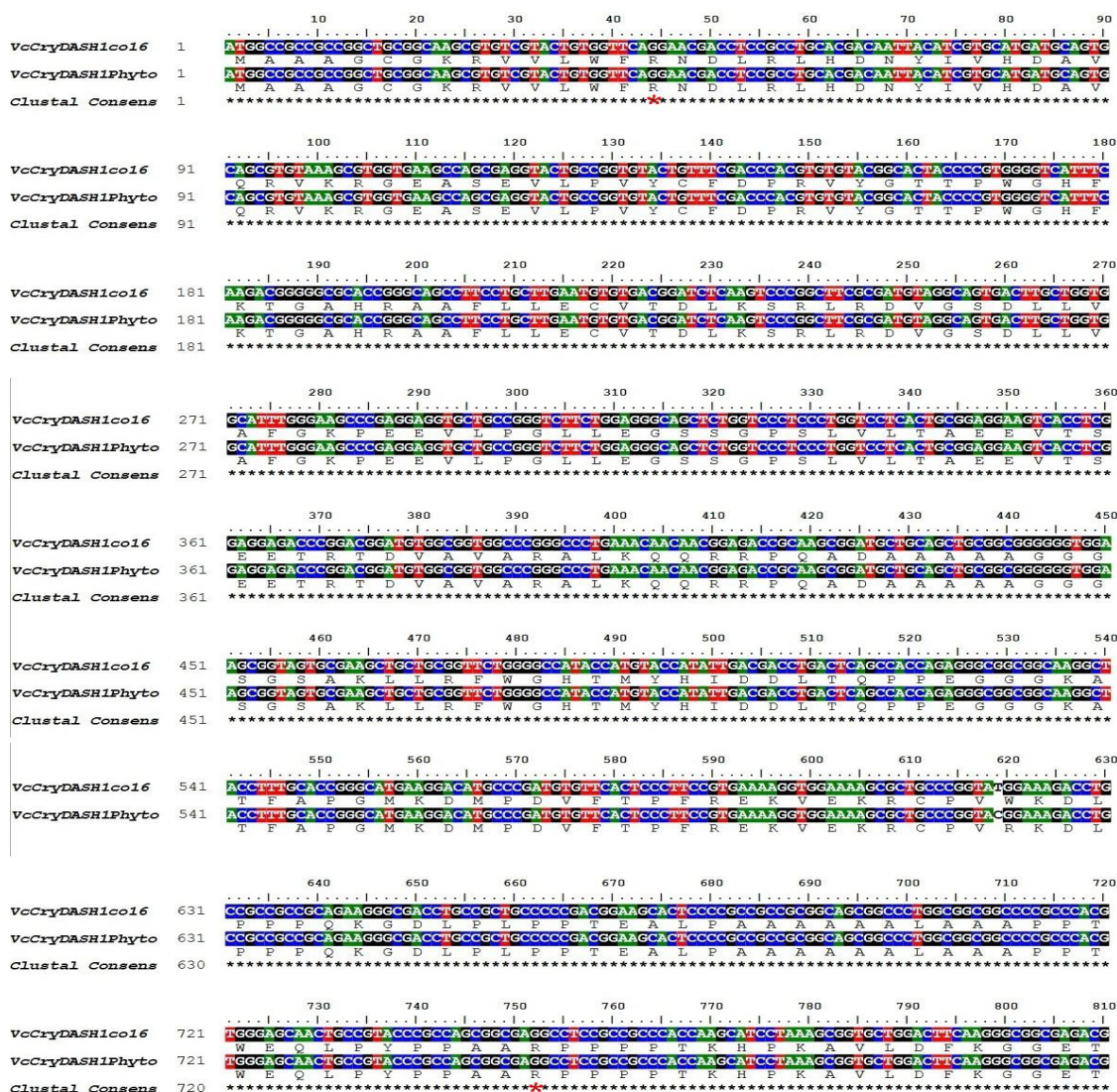
شکل ۳. بررسی نتیجه همسانه‌سازی ژن *VcCryDASH1* توسط انجام برش آنزیمی (A) و PCR (B)، بر روی پلاسمیدهای استخراج شده. A- چاهک ۱: برش آنزیمی pGEX-2TK؛ چاهک ۲: اندازه‌نمای (مارکر) DNA (اعداد سمت چپ، طول باندهای مارکر مربوط به ستون ۲ را نشان می‌دهند. برخی از اندازه‌ها نشان داده نشده‌اند)؛ چاهک ۳: برش آنزیمی pGCD1. B- چاهک ۱: اندازه‌نمای (مارکر) DNA (اعداد سمت چپ، طول باندهای مارکر را نشان می‌دهند. برخی از اندازه‌ها نشان داده نشده‌اند)؛ چاهک ۲: محصول PCR، در حالتی که pGEX-2TK الگوی واکنش باشد؛ چاهک ۳: محصول PCR، در حالتی که pGCD1 الگوی واکنش باشد.

**Figure 3. The study of *VcCryDASH1* cloning results by doing enzymatic digestion (A) and PCR (B), on extracted plasmids. A- Lane 1: the enzymatic digestion of pGEX-2TK; Lane 2: DNA Ladder (The left numbers show the length of Ladder bonds in lane 2. Some sizes haven't been shown.); Lane 3: the enzymatic digestion of pGCD1. B- Lane 1: DNA Ladder (The left numbers show the length of Ladder bonds. Some sizes haven't been shown.); Lane 2: The PCR product, while using pGEX-2TK as the reaction template; Lane 3: The PCR product, while using pGCD1 as the reaction template.**

این بررسی عدم حضور جهش در توالی کدکننده کریپتوکروم DASH1 را تایید کرد. در ادامه پلاسمید pGCD1co16

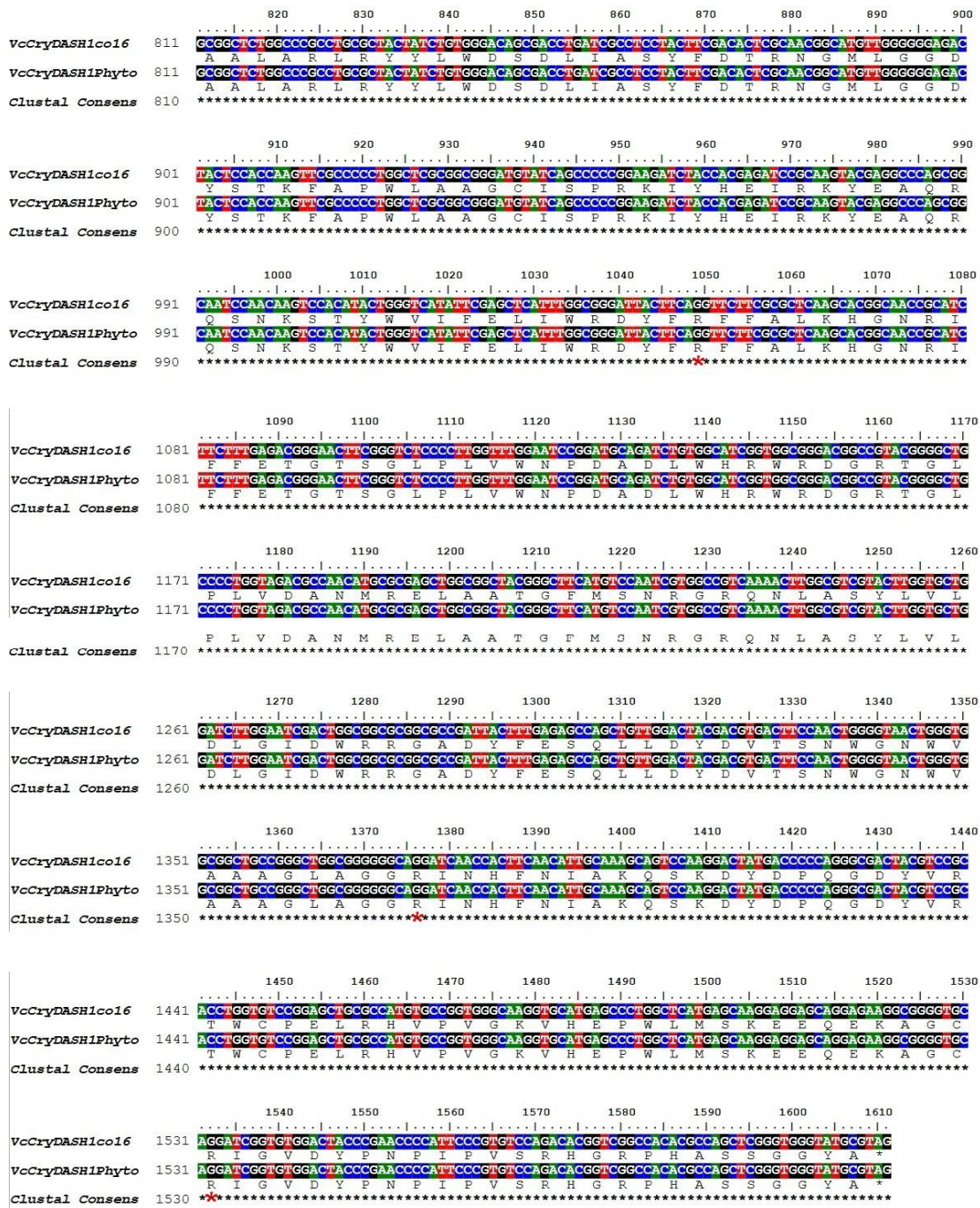
که مربوط به کلون شماره ۱۶ بود، برای انجام بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از پلاسمیدهای pGEX-2TK و

pGCD1co16 دو سویه Top10 و Rosetta تراریخت شدند.



شکل ۴. بررسی شباهت توالی کدکننده ژن کریپتوکروم DASH1 ولوکس، حاصل از تعیین ترادف (*VcCryDASH1co16*) و بازیابی شده از پایگاه داده‌های فیتوزوم (*VcCryDASH1Phyto*)، با استفاده از همدریف‌سازی. در پایین هر توالی، اسیدهای آمینه‌ی به‌رمز در آمده، نشان داده شده است. همچنین شباهت نوکلوتیدی در ردیف "Clustal Consens" توسط علامت "\*" تعیین شده است. علامت "\*" قرمز رنگ، محل کدون نادر AGG را در توالی ژن *VcCryDASH1* نشان می‌دهند.

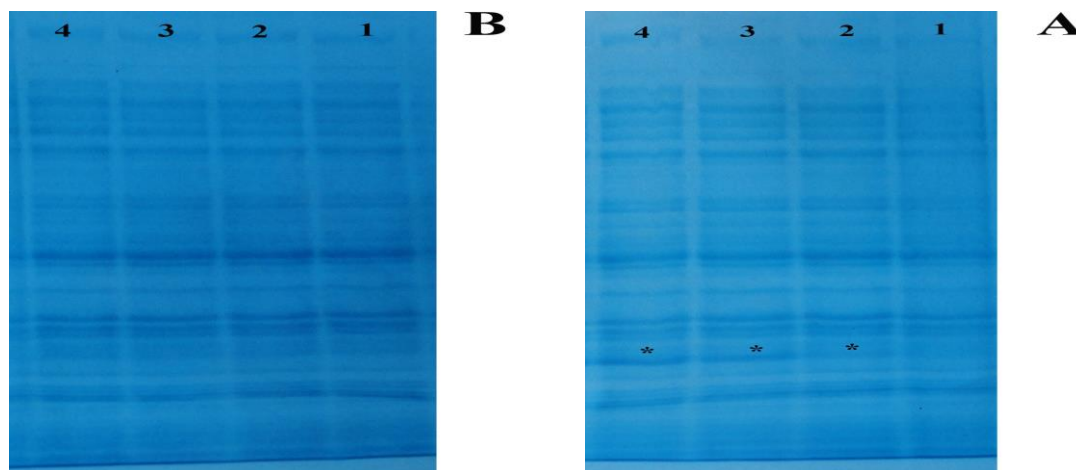
Figure 4. Similarity study of the *Volvox* cryptochrome DASH1 coding sequence by using the sequences obtained by sequencing (*VcCryDASH1co16*) and retrieved from the Phytozome database (*VcCryDASH1Phyto*), through alignment method. The coded amino acids have been shown at the below of each sequence. Also, the nucleotide identity has been determined by "\*" symbol, in the "Clustal Consens" Line. The red stars symbols show the position of "AGG" rare codon in the *VcCryDASH1*.



ادامه شکل ۴.

Figure 4. continued

القاء بیان پروتئین با کشت دادن باکتری در LB مایع دارای pH برابر ۵/۵ که حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین برای باکتری Top10، و آمپی سیلین به همراه کلرامفنیکل برای باکتری Rosetta بود، در دمای ۳۳°C با غلظت ۳ mM از IPTG انجام شد. با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE، وضعیت بیان پذیری پروتئین های GST (Glutathione S-Transferase) (که در باکتری های دارای پلاسمید باکتری های دارای پلاسمید pGEX-2TK بیان می شود) و GST-VcCryDASH1co16 (که در باکتری های دارای پلاسمید pGCD1co16 بیان می شود) در پروتئوم باکتری ها بررسی شد (شکل ۵ و ۶). همان طور که مشخص است سویه Rosetta قادر به تولید هر دو پروتئین GST و GST-VcCryDASH1co16 می باشد در صورتی که سویه Top10 فقط می تواند پروتئین GST را تولید نماید. توالی کدکننده پروتئین GST که در پلاسمید pGEX-2TK وجود دارد، تنها دارای ۲ کدون نادر AGA برای آمینواسید آرژنین (R) در موقعیت ۱۰۳ و ۱۰۸ می باشد، در حالی که توالی کدکننده پروتئین GST-VcCryDASH1co16 علاوه بر دو کدون فوق دارای ۷ کدون دیگر (متشکل از AGA و AGG) مربوطه به آرژنین است. باتوجه به بیان شدن GST سویه Top10 و عدم بیان GST-VcCryDASH1co16 در این سویه، می توان نتیجه گرفت که دلیل عدم بیان پذیری این پروتئین در Top10، وجود کدون نادر AGG می باشد (شکل ۴). این کدون نسبت به کدون های دیگر آمینواسید آرژنین در *E. coli*، دارای کمترین فراوانی tRNA می باشد. در سویه Rosetta پلاسمیدی به نام pRARE قرار داده شده است که با پلاسمید pGEX-2TK (همچنین با پلاسمیدهای نو ترکیب حاصل از آن) سازگار بوده و دارای توالی های کدکننده مربوط به tRNA آمینواسیدهای کمیاب در باکتری *E. coli* (مانند tRNA دارای آنتی کدون مکمل با AGG) می باشد. حضور این پلاسمید سویه Rosetta باعث افزایش این tRNA ها در باکتری شده و آن را قادر به تولید پروتئین های یوکاریوتی می نماید. بدست آوردن مقدار کافی از یک پروتئین محلول، عاملی محدودکننده در مطالعه بر روی آن است. بدین ترتیب پیش گویی دقیق حلالیت پروتئین های ناشناخته قبل از کار در آزمایشگاه، می تواند در طراحی آزمایشات و اتخاذ استراتژی مناسب در تولید پروتئین خالص مفید باشد. یکی از ویژگی های تعیین کننده در حلالیت پروتئین، ساختار اولیه پروتئین می باشد (Mahajan et al. 2014). الگوریتم های زیادی برای پیش گویی انحلال پذیری پروتئین ها در باکتری *E. coli* نوشته شده است که از جمله آن ها می توان به الگوریتم PROSO اشاره کرد. امتیاز داده شده به پروتئین GST-VcCryDASH1co16 در سرور PROSO برابر با ۰/۶۱۱ بود که نشان دهنده حلالیت متوسط این پروتئین می باشد. هرگاه امتیاز پروتئین عددی بین ۰/۵ و ۰/۷۴۵ باشد بدین معنی است که پروتئین مورد نظر جزء پروتئین های دارای حلالیت متوسط (Medium soluble proteins) می باشد. به منظور بررسی این پیش گویی، پروفایل پروتئین موجود در محلول حاصل از تخریب دیواره باکتری (توسط امواج اولتراسونیک) و رسوب مربوط به لاشه باکتری توسط SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷).



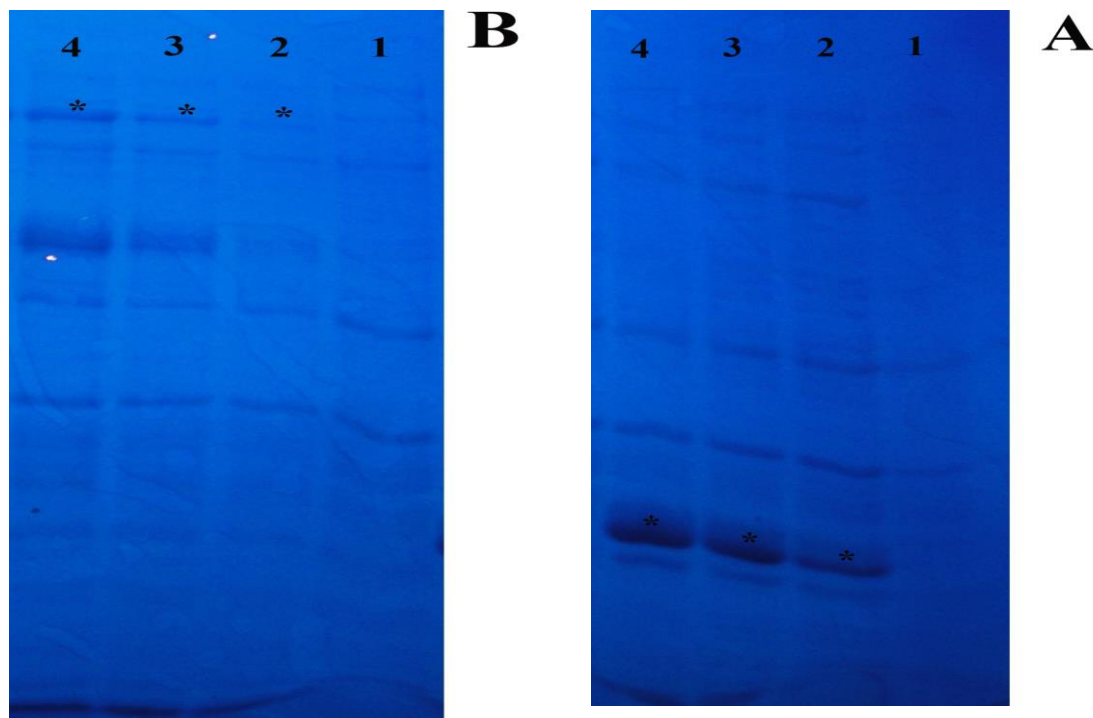
شکل ۵. بررسی بیان پروتئین GST و GST-VcCryDASH1co16 به ترتیب در سویه Top10 دارای پلاسمید pGEX-2TK (A) و سویه Top10 دارای پلاسمید pGCD1co16 (B)، در زمان‌های متفاوت و القاء با ۳ mM IPTG، با استفاده از روش SDS-PAGE. چاهک ۱: پروفایل پروتئین قبل از القاء بیان؛ چاهک ۲: پروفایل پروتئین ۱ ساعت بعد از القاء بیان؛ چاهک ۳: پروفایل پروتئین ۳ ساعت بعد از القاء بیان؛ چاهک ۴: پروفایل پروتئین ۹ ساعت بعد از القاء بیان. علامت "\*" موقعیت پروتئین GST را نشان می‌دهند. باکتری دارای پلاسمید pGCD1co16 پروتئین GST-VcCryDASH1co16 را بیان نکرده است.

**Figure 5. Expression analysis of the GST and GST-VcCryDASH1co16 in Top10 strain having the pGEX-2TK (A) and pGCD1co16 plasmids (B) respectively, under the different incubation times and induction by 3 mM IPTG, through SDS-PAGE method. Lane 1: the protein profile before expression induction; Lane 2: the protein profile after 1-hour expression induction; Lane 3: the protein profile after 3 hours expression induction; Lane 4: the protein profile after 9 hours expression induction. The "\*" symbols show the GST position. The bacterium having the pGCD1co16 didn't express GST-VcCryDASH1co16.**

همان‌طور که در تصویر مشخص است میزان حضور پروتئین نوترکیب GST-VcCryDASH1co16 در روشناور و همچنین لاشه سلولی (پس از تخریب دیواره با امواج صوتی) بعد از ۳ ساعت القاء بیان پروتئین نسبت به ۱ ساعت القاء بیان، شدت بیشتری را نشان می‌دهد. همچنین مشخص است که پروتئین نوترکیب، در باکتری به هر دو حالت محلول و نامحلول دیده می‌شود. این مشاهده با پیش‌گویی انجام‌گرفته توسط الگوریتم PROSO مطابقت دارد. به‌منظور تخلیص پروتئین‌های GST- و GST-VcCryDASH1co16، رسوب باکتری‌های *E. coli* سویه Rosetta که به‌ترتیب حاوی پلاسمیدهای pGEX-2TK و pGCD1co16 بودند و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۲°C توسط ۳ mM IPTG بیان پروتئین در آن‌ها القاء شده بود، در

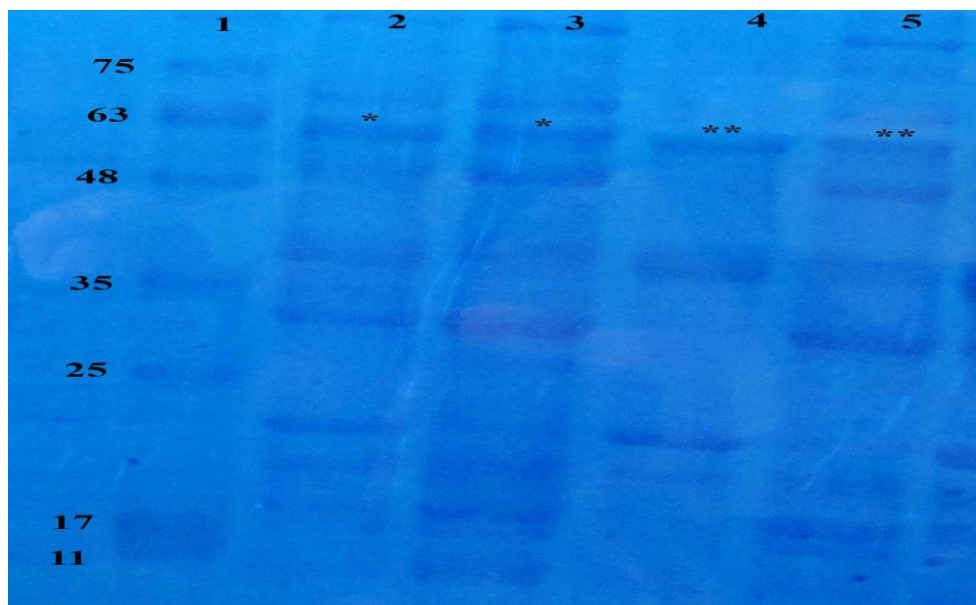


حجم مناسبی از PBS سرد معلق‌سازی و تخریب دیواره سلولی با استفاده از امواج اولتراسونیک انجام شد. سپس با روش کروماتوگرافی تمایلی، تخلیص پروتئین‌ها صورت گرفت. به‌منظور بررسی صحت تخلیص، محلول پروتئینی با استفاده از SDS-PAGE مورد بررسی گردید (شکل ۸).



شکل ۶. بررسی بیان پروتئین GST و GST-VcCryDASH1co16 به ترتیب در سویه Rosetta دارای پلاسمید pGEX-2TK (A) و سویه Rosetta دارای پلاسمید pGCD1co16 (B)، در زمان‌های متفاوت و القاء با ۳ mM IPTG، با استفاده از روش SDS-PAGE. چاهک ۱: پروفایل پروتئین قبل از القاء بیان؛ چاهک ۲: پروفایل پروتئین ۱ ساعت بعد از القاء بیان؛ چاهک ۳: پروفایل پروتئین ۳ ساعت بعد از القاء بیان؛ چاهک ۴: پروفایل پروتئین ۹ ساعت بعد از القاء بیان. علامت "\*" موقعیت پروتئین GST و GST-VcCryDASH1co16 را نشان می‌دهد.

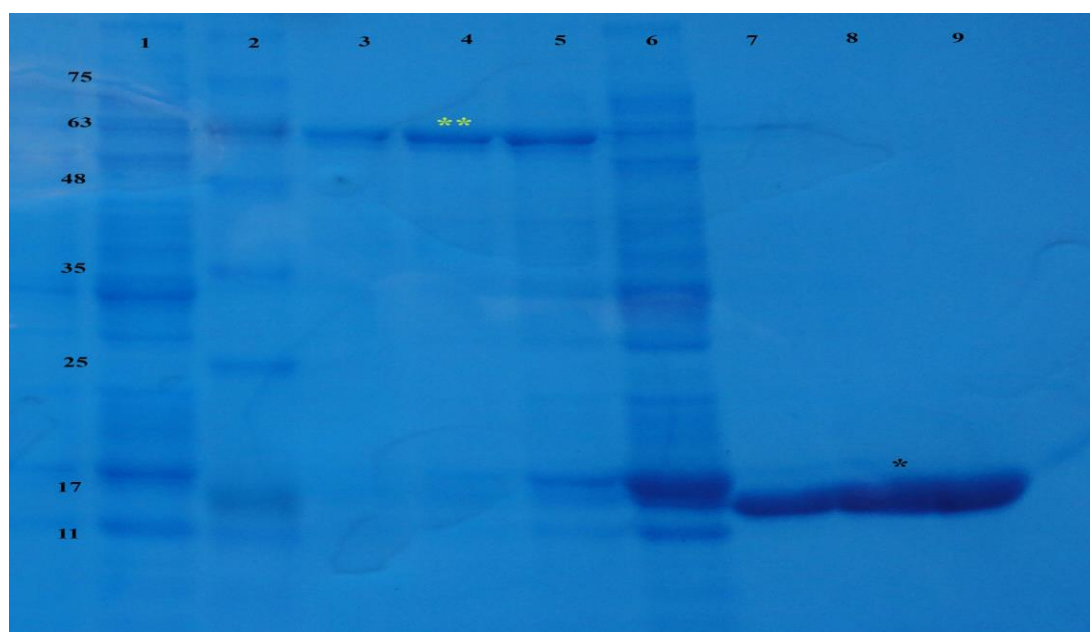
**Figure 6.** Expression analysis of the GST and GST-VcCryDASH1co16 in Rosetta strain having the pGEX-2TK (A) and pGCD1co16 plasmids (B) respectively, under the different incubation times and induction by 3 mM IPTG, through SDS-PAGE method. Lane 1: the protein profile before expression induction; Lane 2: the protein profile after 1-hour expression induction; Lane 3: the protein profile after 3 hours expression induction; Lane 4: the protein profile after 9 hours expression induction. The "\*" symbols show the GST and GST-VcCryDASH1co16 position.



شکل ۷. بررسی انحلال‌پذیری پروتئین GST-VcCryDASH1co16، در سویه Rosetta دارای پلاسمید pGCD1co16 با استفاده از روش SDS-PAGE. چاهک ۱: اندازه‌نمای (مارکر) Prestained Protein Ladder (شماره سمت چپ، وزن مولکولی پروتئین‌های مارکر را برحسب واحد kDa نشان می‌دهند)؛ چاهک ۲: پروفایل پروتئینی مربوط به لاشه باکتریایی (پس از تخریب دیواره)، بعد از ۳ ساعت القای بیان پروتئین در باکتری‌ها؛ چاهک ۳: پروفایل پروتئینی مربوط به روشناور (پس از تخریب دیواره)، بعد از ۳ ساعت القای بیان پروتئین در باکتری‌ها؛ چاهک ۴: پروفایل پروتئینی مربوط به لاشه باکتریایی، (پس از تخریب دیواره)، بعد از ۱ ساعت القای بیان پروتئین در باکتری‌ها؛ چاهک ۵: پروفایل پروتئینی مربوط به روشناور (پس از تخریب دیواره)، بعد از ۱ ساعت القای بیان پروتئین در باکتری‌ها. علامت "\*" محل GST-VcCryDASH1co16 را نشان می‌دهد.

**Figure 7. The investigation of GST-VcCryDASH1co16 solubility, in Rosetta strain having the pGCD1co16, by SDS-PAGE method. Lane 1: Prestained Protein Ladder, Sinaclon Co (the numbers of the left- side show the molecular weights of the protein ladder bonds in kDa unit); Lane 2: the protein profile of the bacterial corpse (after cell wall disruption) after 3 hours induction of protein expression in bacteria; Lane 3: the protein profile of the supernatant (after cell wall disruption), after 3 hours induction of protein expression in bacteria; Lane 4: the protein profile of the bacterial corpse (after cell wall disruption), after 1 hour induction of protein expression in bacteria; Lane 5: the protein profile of the supernatant (after cell wall disruption), after 1 hour induction of protein expression in bacteria. The "\*" symbols show the position of the GST-VcCryDASH1co16.**

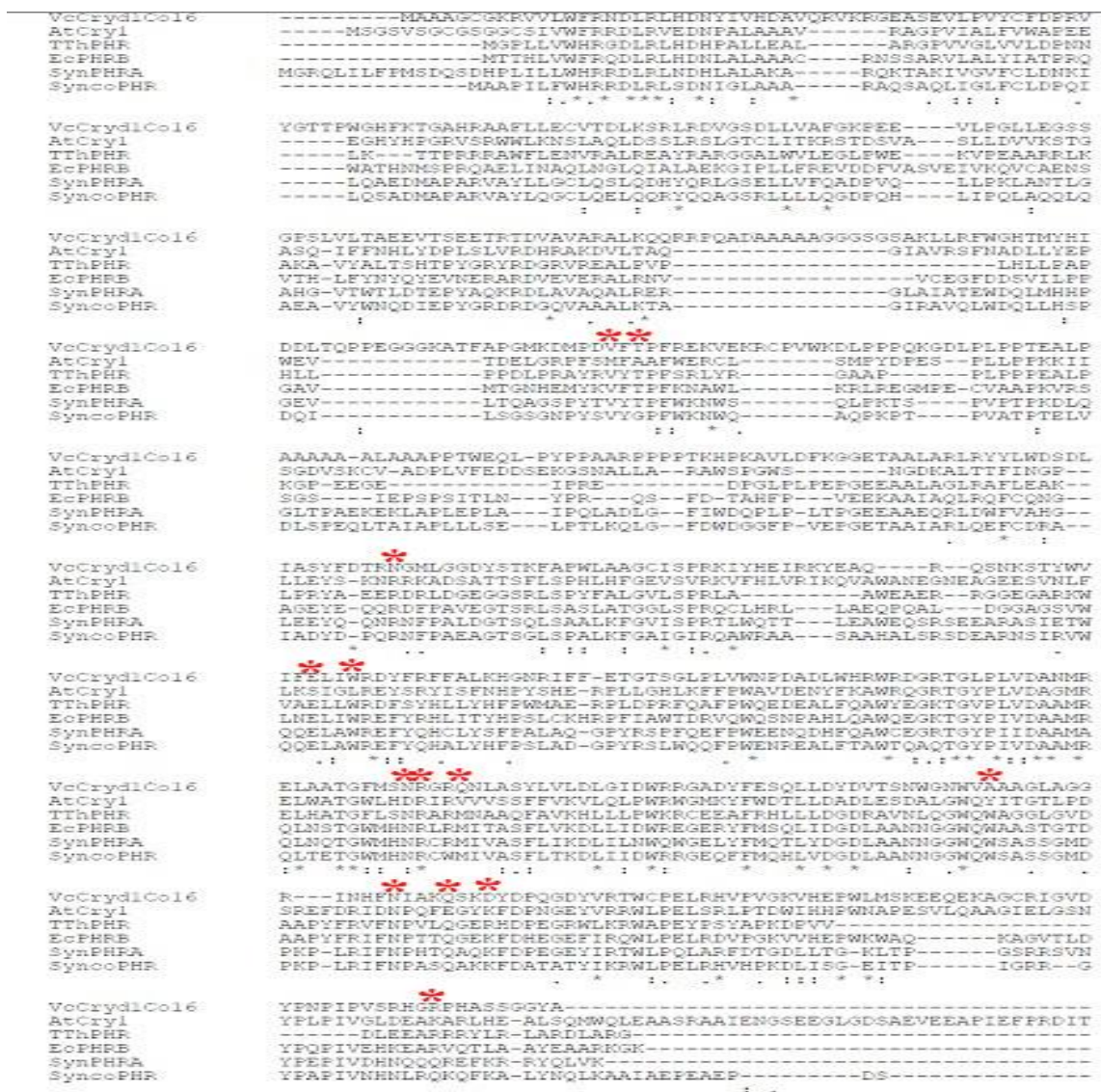
وزن مولکولی بدست‌آمده از ساختار اولیه پروتئین‌های GST و GST-VcCryDASH1co16 به ترتیب برابر با kDa ۲۷/۷ و ۸۶/۶ می‌باشد اما پروتئین‌های GST و GST-VcCryDASH1co16 تخلیص‌شده در ژل SDS-PAGE، به ترتیب در مقابل باندهای ۱۷ و ۶۳ کیلودالتون قرار گرفتند. دلیل این تفاوت، نوع بافر بارگذاری ژل SDS-PAGE، pH مربوط به سیستم بافری الکتروفورز (مشاهده‌ی انجام شده که در این مقاله آورده نشده است) و نحوه‌ی ایجادشدن میسل بین SDS موجود در بافر نمونه و پروتئین مورد مطالعه می‌باشد. مطالعه‌ی انجام‌شده توسط Rath و همکاران (2009) نشان داد پروتئین‌های آماده برای بارگذاری در ژل SDS-PAGE، با SDS موجود در بافر بارگذاری، پیکربندی جدیدی تشکیل را می‌دهند که در پروتئین‌های مختلف بسته به ماهیت آمینواسیدهای سازنده آن‌ها متفاوت خواهد بود. ایجاد ساختارهای میسلی متفاوت (بین پروتئین و SDS)، میزان مهاجرت پروتئین‌های دارای اندازه متناظر را در ژل پلی‌آکریل‌امید، متفاوت می‌کند. به‌منظور مطالعه قابلیت اتصال پروتئین VcCryDASH1co16 به DNA، هم‌ردیف‌سازی آن با ۴ پروتئین که قابلیت اتصال به DNA در آن‌ها اثبات شده و یک پروتئین ناتوان در اتصال به DNA انجام و محل آمینواسیدهای کلیدی مشخص شد (شکل ۹). در پژوهشی Li and Sancar (1990) نشان دادند که موتاسیون تریپتوفان ۲۷۸ در توالی DNA فتولیز *E. coli* باعث کاهش تمایل این پروتئین به DNA می‌شود. Torizawa و همکاران (2004) مشاهده کردند، موتاسیون‌های آرژنین ۳۱۱، تریپتوفان ۳۵۳ و آرژنین ۳۶۶ (هر کدام به‌طور جداگانه) باعث کاهش توانایی DNA فتولیز *Thermus thermophilus* در اتصال به DNA می‌شود. با توجه به بررسی حفاظت‌شدگی این آمینواسیدها و آمینواسیدهای مهم دیگر در اتصال به DNA می‌توان به دید مناسبی در مورد قابلیت اتصال احتمالی پروتئین VcCryDASH1co16 دست یافت.



شکل ۸. بررسی SDS-PAGE پروتئین‌های GST و GST-VcCryDASH1co16 تخلیص شده. چاهک ۱: روشناور حاوی GST-VcCryDASH1co16 قبل از اعمال تخلیص؛ چاهک ۲: اندازه‌نمای (مارکر) پروتئینی Prestained Protein Ladder شرکت سیناکلون (اعداد سمت چپ، وزن مولکولی پروتئین‌های مارکر را برحسب واحد kDa نشان می‌دهند)؛ چاهک ۳: پروتئین GST-VcCryDASH1co16 در ایلوشن ۳ (Elution 3)؛ چاهک ۴: پروتئین GST-VcCryDASH1co16 در ایلوشن ۲؛ چاهک ۵: پروتئین GST-VcCryDASH1co16 در ایلوشن ۱؛ چاهک ۶: روشناور پروتئینی حاوی GST قبل از اعمال تخلیص؛ چاهک ۷: GST در ایلوشن ۳؛ چاهک ۸: GST در ایلوشن ۲؛ چاهک ۹: GST در ایلوشن ۱. علامت‌های "\*" و "\*\*" به ترتیب پروتئین GST و GST-VcCryDASH1co16 را نشان می‌دهند.

**Figure 8. SDS-PAGE analysis of the purified GST and GST-VcCryDASH1co16. Lane 1: unpurified supernatant with GST-VcCryDASH1co16; Lane 2: Prestained Protein Ladder Sinaclon Co (the numbers of the left- side show the molecular weights of the protein ladder bonds in kDa unit.); Lane 3: the GST-VcCryDASH1co16 in elution 3; Lane 4: the GST-VcCryDASH1co16 in elution 2; Lane 5: the GST-VcCryDASH1co16 in elution 1; Lane 6: unpurified supernatant with GST; Lane 7: the GST in elution 3; Lane 8: the GST in elution 2; Lane 9: the GST in elution 1; The "\*" and "\*\*" symbols show GST and GST-VcCryDASH1co16, respectively.**

در جدول ۲، آمینواسیدهای دخیل در اتصال به DNA (در ۴ پروتئین متصل شونده به DNA) مشخص شده‌اند. با توجه به این بررسی‌ها مشخص گردید که از بین ۱۳ آمینواسید برهمکنش کننده با DNA، ۹ عدد عینا در VcCryDASH1co16 وجود دارد، اما در AtCry1 (به‌عنوان پروتئینی که با DNA بر همکنش ندارد) فقط ۴ عدد دیده می‌شود که به ترتیب معادل ۶۹ و ۳۰/۷ درصد یکسانی<sup>۲۱</sup> می‌باشند. این مشاهده مشخص می‌کند که کریپتوکروم DASH1 ولوکس از نظر قابلیت اتصال به DNA حدواسط فتولیزهای ترمیم کننده DNA و کریپتوکروم دخیل در مسیر پیام‌رسانی علامت (AtCry1) می‌باشد. بدین ترتیب می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که این پروتئین، دارای عملکرد دوگانه‌ی قابلیت اتصال به DNA (به‌عنوان ترمیم کننده DNA آسیب دیده یا تنظیم کننده بیان ژن) و دخیل در تنظیم فرآیندهای نموی وابسته به نور می‌باشد.



شکل ۹. هم‌ردیف‌سازی پروتئین‌های شاخص درون خانواده پروتئینی کریپتوکروم/فتولیزاز که قابلیت اتصال به DNA را دارند (پروتئین های TThPHR, EcPHRB, SynPHRA و SyncoPHR) و پروتئین شاخص درون این خانواده که قابلیت اتصال به DNA را ندارد (AtCry1)، با VcCryDASH1co16 به کمک الگوریتم Clustal omega. پروتئین‌های استفاده شده و ارگانیزم حاوی پروتئین در ادامه آورده شده است: TThPHR (Thermus thermophilus Deoxyribodipyrimidine photo-lyase)؛ EcPHRB (E. coli Deoxyribodipyrimidine photo-lyase)؛ SynPHRA (Syncochocystis sp. Deoxyribodipyrimidine photo-lyase)؛ AtCry1 (Synechococcus sp. Cryptochrome-1)؛ VcCryd1co16 (Cryptochrome DASH1) (Volvox carteri) مربوط به علامت‌های " \*" قرمز، محل آمینواسیدهای کلیدی برای اتصال پروتئین‌های متصل شونده به DNA را نشان می‌دهند.

Figure 9. The alignment of the specific proteins in Cryptochrome/DNA photolyase protein family, with DNA binding ability (TThPHR, EcPHRB, SynPHRA and SyncoPHR

proteins) and without DNA binding ability (AtCry1 protein), compare to VcCryDASH1 by using Clustal omega algorithm. The proteins and their origin organisms are as follows: TThPHR (Deoxyribodipyrimidine photo-lyase from *Thermus thermophilus*); EcPHRB (Deoxyribodipyrimidine photo-lyase from *E. coli*); SynPHRA (Deoxyribodipyrimidine photo-lyase from *Synechocystis* sp.); SyncoPHR (Deoxyribodipyrimidine photo-lyase from *Synechococcus* sp.); AtCry1 (Cryptochrome-1 from *Arabidopsis thaliana*); VcCryd1co16 (Cryptochrome DASH1 from *Volvox carter*). The red "\*" symbols demonstrate the positions of the key amino acids that bind to DNA.

جدول ۲. بررسی آمینواسیدهای متصل شونده به DNA آسیب دیده، در چند عضو شاخص خانواده پروتئینی

### کریبتوکروم/فتولیز و پروتئین VcCryDASH1co16

Table 2. Study of the damaged DNA- binding amino acids, in some specific members of the Cryptochrome/photolyases protein family and VcCryDASH1co16 protein

نام پروتئین	آمینواسیدهای ویژه، در هم‌ردیف‌سازی												
Protein name	Special amino acids in alignment												
SyncoPHR	V148	G150	R232	E283	W286	N349	R350	M353	W392	N407	Q411	K414	Q461
EcoPHR	V150	T152	R227	E275	W278	N342	R343	M346	W385	N401	Q405	K408	R458
TiPHR	V135	T137	R201	E244	W247	N310	R311	M314	W353	N369	Q373	K376	R407
SynPHRA	V162	T164	R246	E297	W300	N363	R364	M367	W406	N421	Q425	K428	Q477
VcCryd1co16	V192	T194	N294	E342	W345	N408	R409	Q412	A451	N464	Q468	D471	R527
AtCry1	M157	A159	R239	S293	L296	D359	R360	V363	Y402	N418	E422	K425	K481
آمینواسیدهای حفاظت شده در فتولیزها Conserved amino acids in photolyases	V	G/T	R	E	W	N	R	M	W	N	Q	K	Q/R

### نتیجه گیری

تولید و خالص‌سازی پروتئین‌های پیش‌گویی شده، اولین قدم در مطالعه ویژگی‌های بیوفیزیکی و بیوشیمیایی آن‌ها می‌باشد. فتورسپتورها به دلیل جایگاه ویژه‌ای که در زیست‌شناسی سنتزی برای ساخت ابزارهای مولکولی پیدا کرده‌اند، گزینه‌های جذاب برای تحقیقات شده‌اند. در این پژوهش شرایط تولید فتورسپتور جلبکی VcCryDASH1 در دو سویه باکتری *E. coli* در زمان‌های مختلف اللقاء بیان، و همچنین میزان انحلال‌پذیری آن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد

که تولید این پروتئین در سویه بیانی Rosetta قابل اجراست و هر چند تقریباً نیمی از پروتئین تولیدی وارد کده نامحلول باکتری می‌شود اما با افزایش زمان القاء می‌توان مقدار کافی از آن را برای آزمایشات پایین‌دستی توصیف این پروتئین بدست آورد. نتایج هم‌ردیف‌سازی، حفاظت‌شدگی آمینواسیدهای متصل شونده به DNA را در VcCryDASH1 مشخص کرد. به‌نظر می‌رسد بتوان از این پروتئین برای ایجاد ابزارهای مولکولی پاسخگو به نور دارای قابلیت اصلاح DNA آسیب‌دیده، استفاده کرد. پروتئین تولیدی در این پژوهش برای بررسی‌های بیشتر جهت ارزیابی خصوصیات دینامیک مولکولی، طیف‌سنجی و ترمیم DNA مورد استفاده قرار خواهد گرفت و در صورت مشاهده ویژگی‌های خاص، می‌تواند به‌صورت ماده اولیه تولید ابزارهای مولکولی مفید در علوم پایه و کاربردی مورد استفاده قرار گیرد.

### سپاسگزاری

هزینه‌های این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی انجام شده است و از این طریق از مسئولین مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

### References

- Ahmed H (2004) Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. CRC Press, USA, pp. 71-131.
- Birnboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243–255.
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H et al. (2003) Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell* 11, 59-67.
- Chaves I, Pokorny R, Byrdin M et al. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol* 62, 335-364.
- Crick F (1999) The impact of molecular biology on neuroscience. *Philos. Trans. Royal Soc. B* 354, 2021–2025.
- Crick FH (1979) Thinking about the brain. *Sci Am* 241, 219–232.
- Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* 8, 26–29.
- Deisseroth K, Feng G, Majewska AK et al. (2006) Next-generation optical technologies for illuminating genetically targeted brain circuits. *J Neurosci* 26, 10380–10386.
- Kianianmomeni A (2015) UVB-based optogenetic tools. *Trends Biotechnol* 33, 59–61.
- Kianianmomeni A, Hallmann A (2016) Algal Photobiology: A Rich Source of Unusual Light Sensitive Proteins for Synthetic Biology and Optogenetics. In: Kianianmomeni A. (Eds.), *Optogenetics. Methods in Molecular Biology*. Humana Press., New York, pp. 37-54.

- Kianianmomeni A, Stehfest K, Nematollahi G et al. (2009) A Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. *Plant Physiol* 151, 347–366.
- Konermann S, Brigham MD, Trevino A et al. (2013) Optical control of mammalian endogenous transcription and epigenetic states. *Nature* 500, 472–476.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Li YF, Sancar A (1990) Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair. *Biochemistry* 29, 5698-706.
- Lin C, Todo T (2005) The cryptochromes. *Genome Biol* 6, 2201-2209.
- Mahajan P, Strain-Damerell C, Gileadi O, Burgess-Brown NA (2014) Medium-throughput production of recombinant human proteins: protein production in insect cells. *Methods Mol Biol* 1091, 95–121.
- Miesenbock G (2009) The optogenetic catechism. *Science* 326, 395–399.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M et al. (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296, 2395–2398.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W et al. (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *PNAS USA* 100, 13940-13945.
- Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG et al. (2009) Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *PNAS USA* 106, 1760-1765.
- Sievers F, Higgins DG (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Sci* 27, 135-145.
- Torizawa T, Ueda T, Kuramitsu S et al. (2004) Investigation of the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase DNA recognition mechanism by NMR analyses. *J Biol Chem* 279, 32950-32956.
- Walsh G (2014) *Proteins: biochemistry and biotechnology* (2<sup>nd</sup> edn), Wiley Blackwell, UK, pp. 65-89.