

## Optimizing purification processes of recombinant outer membrane protein (OMP) of *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing agent of citrus greening

**Hashem Kazemzadeh-Beneh** 

PhD Candidate, Department of Horticulture Science, Biotechnology & Plant Molecular Genetic Section, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, Email: kazemzadehashem@yahoo.com

**Davood Samsampour** 

\*Corresponding author. Associate Professor, Department of Horticulture Science, Biotechnology & Plant Molecular Genetic Section, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran, Email: samsampour@hormozgan.ac.ir

**Mohammad Reza Safarnejad** 

Associate Professor, Department of Plant Viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, Email: safarnejad@iripp.ir

**Seyed Mehdi Alavi** 

Associate Professor, Department of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, E-mail: mealavi@nigeb.ac.ir

---

### **Abstract**

#### **Objective**

The *omp* (Outer membrane protein) protein located at outer surface of the bacterial membrane body agent citrus greening disease (*Candidatus Liberibacter asiaticus*). The mentioned-protein can be used as antigen for generating polyclonal and monoclonal antibodies. Therefore, the purification of membrane proteins is exposed to many problems due to presence of hydrophilic structure. The purpose of this study was optimizing recovery and purification of the recombinant *omp* protein.

#### **Materials and Methods**

The pET28a bacterial expression construct containing *omp* gene was used to recombinant production of the mentioned-protein. The *omp* gene expression was conducted in *E. coli* strain Rosetta-Gami2. With considering to be hydrophilic of *omp* protein, its purification was investigated under denature condition. To attain it, the different concentrations of NaCl, urea and guanidine at the different acidity pH condition was applied. To obtain the pure *omp* recombinant protein, the protein recovery from polyacrylamide gel was performed by methods based on elution

by diffusion, sonication, and electroelution. The evaluation of quality and quantity purified protein was analyzed by SDS-PAGE and the protein concentration was calculated by ImageJ software. Also, to validate the purified proteins, Western blot was applied by specific antibody.

## Results

Primary results showed that using the 500 mM NaCl was detected as an essential share in purification buffers. Also, using urea as denature agent had twice the efficiency on the quantity of purified protein more than guanidine hydrochloride and thus, when 8 M urea supplemented in purification buffer, the highest purified protein was attained (450 µl/ml). Furthermore, the results related to recovery the single band of protein from gel indicated that the electroelution has highest efficient on recovery of the target protein from gel matrix compared to sonication and elution by diffusion methods. The results of SDS-PAGE confirmed to appear a protein with 34 kDa related to molecular weight of target protein. Western blot validated the recombinant protein in membrane.

## Conclusions

The current study showed that using urea in 8 M, NaCl in 500 mM concentration in purification buffers following adjusting the elution buffer on pH (4) in elution purification step can be apply as an optimized condition to attain the highest target protein concentration. Furthermore, electroelution method introduced as efficient method in order to recovery band of the target protein from polyacrylamide gel matrix.

**Keywords:** Urea, Membrane protein, Protein purification, Guanidine hydrochloride, Citrus greening, Recovery.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Kazemzadeh HB, Samsampour D, Safarnejad MR, Alavi SM (2022) Optimizing purification processes of recombinant outer membrane protein (OMP) of *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing agent of citrus greening. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 175-196.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 175-196.

DOI: 10.22103/jab.2022.18684.1361

Received: January 18, 2022.

Accepted: February 9, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant




Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian  
Biotechnology Society.


© the authors

## بهینه سازی تخلیص پروتئین نوترکیب خارج غشایی (OMP) باکتری عامل بیماری گرینینگ


### مرکبات

هاشم کاظم زاده بنه 


دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران، رایانامه: kazemzadehashem@yahoo.com

داود صمصام پور 

\*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران، رایانامه: samsampoor@hormozgan.ac.ir

محمد رضا صفرنژاد 

دانشیار، بخش ویروس شناسی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، رایانامه: safarnejad@iripp.ir

سید مهدی علوی 

دانشیار، گروه بیوتکنولوژی مولکولی گیاهی، موسسه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، رایانامه: mealavi@nigeb.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸

### چکیده

**هدف:** پروتئین خارج غشایی omp در سطح خارجی پیکره باکتری عامل بیماری گرینینگ مرکبات (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) وجود دارد. پروتئین مذکور می تواند به عنوان آنتی ژن برای تولید انواع آنتی بادی های مونوکلونال و پلی کلونال مورد استفاده قرار گیرد. با این حال خالص سازی پروتئین های غشایی به دلیل وجود ساختارهای آبگریز با مشکلات فراوانی همراه می باشد. در این راستا، هدف از اجرای پژوهش حاضر، بهینه سازی استحصال و تخلیص پروتئین نوترکیب omp می باشد.

**مواد و روش ها:** از سازه بیانی باکتریایی pET28a حاوی ژن omp برای تولید نوترکیب این پروتئین استفاده شد. بیان ژن omp در سویه باکتری Rosetta *E. coli* صورت پذیرفت. با توجه به آبگریز بودن پروتئین omp، خالص سازی آن در شرایط واسرشته مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور از غلظت های مختلف سدیم کلراید، اوره و گوانیدین هیدروکلراید در شرایط اسیدی pH متفاوت استفاده گردید. به منظور دستیابی به پروتئین کاملاً خالص نوترکیب، استحصال پروتئین از ژل پلی آکریل آمید

با روش‌های مبتنی بر سونیکاسیون، شستشوی توسط انتشار و الکتروالوشن صورت پذیرفت. بررسی کمی و کیفیت پروتئین‌های خالص شده با انجام الکتروفورز SDS-PAGE و محاسبه غلظت پروتئین با نرم افزار ImageJ انجام گرفت. همچنین برای تایید ماهیت پروتئین خالص شده، آزمون وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی صورت پذیرفت.

**نتایج:** نتایج اولیه نشان داد که استفاده از غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار سدیم کلراید به عنوان یک جزء ضروری در بافرهای استخراج می‌باشد. همچنین استفاده از اوره به عنوان عامل دناتوره‌کننده کارایی دو برابری نسبت به گوانیدین هیدروکلراید در میزان پروتئین تخلیص شده داشت و بدین ترتیب بیشترین میزان پروتئین (۴۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) زمانی بدست آمد که غلظت ۸ مولار اوره در اجزای بافری تخلیص گنجانده شد. علاوه بر این، نتایج مربوط به جداسازی باند پروتئین از ژل نشان داد که روش الکتروالوشن بهترین کارایی را در بازیابی و جداسازی پروتئین هدف از ماتریکس ژل در مقایسه با روش سونیکاسیون و شستشوی توسط انتشار داشت. نتایج آزمون الکتروفورز پروتئین حاکی از وجود یک پروتئین با اندازه ۳۴ کیلو دالتون متناسب با وزن مولکولی پروتئین *omp* می‌باشد. آزمون وسترن بلات نیز موید ماهیت پروتئین نوترکیب در ممبران بود.

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از اوره با غلظت ۸ مولار، نمک سدیم کلراید با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار به همراه تنظیم بافر الوشن روی (۴) pH در مرحله تخلیص پروتئین می‌تواند به عنوان یک شرایط بهینه برای بدست آوردن بیشترین مقدار پروتئین هدف بکار رود. همچنین، روش الکتروالوشن به عنوان روش کارآمد جهت استحصال باند پروتئینی از روی ژل آکریل‌آمید معرفی شد.

**کلیدواژه‌ها:** کلیدواژه، کلیدواژه، کلیدواژه، کلیدواژه.

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** کاظم زاده بنه هاشم، صمصام پور داود، صفرنژاد محمد رضا، علوی سید مهدی (۱۴۰۱) بهینه سازی تخلیص پروتئین نوترکیب خارج غشایی (OMP) باکتری عامل بیماری گرینینگ مرکبات. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۱۴(۱)، ۱۷۵-۱۹۶.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant

Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

بیماری گرینینگ مرکبات یا هوپانگ لانگ بین (huanglongbing) یکی از بیماری‌های گیاهی مخرب باکتریایی در جهان می‌باشد که عمدتاً توسط گونه آسیایی آن *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) ایجاد می‌شود. علائم این بیماری متنوع بوده و اولین علائم بیماری زردی یک یا چند سرشاخه جوان در درختان بوده و با توسعه بیماری موجب مرگ سرشاخه‌ها

می‌شود. کلروز رگبرگی یا ابلقی شدن به صورت لکه های زرد نامتقارن در دو طرف رگبرگ اصلی برگ، ریزش برگ‌های آلوده، کوچک ماندن برگ‌های جدید، ظهور علائم کمبود مواد غذایی نظیر روی و منگنز، میوه‌های کوچک نامتقارن دارای برآمدگی‌های نامنظم با محور خمیده و بذور چروکیده و عقیم، مزه شور و تلخی میوه‌های آلوده، کاهش گلدهی درختان بالغ و گلدهی خارج از فصل از شاخصه‌های این بیماری است. میوه‌های آلوده بروی درخت کوچک، سخت و کم آب بوده و رنگ غیر طبیعی غیریکنواخت می‌گیرند به طوری که دم میوه رنگ گرفته و گلگاه سبز باقی می‌ماند. نام گرینینگ هم به همین دلیل به این بیماری داده شده است (Cellier et al. 2020). در سالهای اخیر این بیماری از جنوب ایران (سیستان و بلوچستان و هرمزگان) گزارش شده است ولی برآورد دقیقی از خسارت آن در ایران هنوز صورت نگرفته است (Faghihi et al. 2009). در دو دهه گذشته، مدارک و مستندهای علمی متعددی تاکید کرده‌اند که بدلیل محدود به آوند آبکشی بودن باکتری عامل بیماری و ناتوانی در کشت آزمایشگاهی آن در محیط کشت های مصنوعی، هیچ راهکار شناخته شده و موثری جهت کنترل و مدیریت بیماری گرینینگ مرکبات ناشی از باکتری مذکور معرفی نشده است (Cellier et al. 2020). در این شرایط پیش آمده، مهندسی تولید آنتی‌بادی جهت شناسایی و کنترل باکتری مذکور می‌تواند راهکار منطقی تری به شمار بیاید. آنتی‌بادی ها ابزارهای اساسی برای تشخیص سرولوژیکی هستند که امکان شناسایی و باند شدن به آنتی‌ژن‌های هدف با اختصاصیت بسیار بالا دارند. با اینحال، به دلیل عدم امکان کشت این باکتری در محیط کشت آزمایشگاهی، امکان عصاره گیری آنتی‌ژن پلی کلونال از گیاهان آلوده به بیماری گرینینگ به منظور تولید آنتی‌بادی اختصاصی مسیر نمی‌باشد. دست‌آوردهای اخیر در بیوتکنولوژی مولکولی این شرایط را فراهم آورده است که بتوان ژنهای حیاتی موثر در مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی را جهت پیشبرد اهداف برنامه های مدیریتی دستکاری نمود. با توجه به در دسترس بودن توالی کامل ژنوم باکتری CLas، امکان شناسایی بهتر و سریع ژنهای موجود در سطح غشاء یا ژنهای دارای نقش حیاتی در عکس العمل پاتوژن - میزبان و به کارگیری این ژنها با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب جهت تولید موفق آنتی‌بادی اختصاصی میسر می‌گردد (Hong et al. 2019). ژن کد کننده پروتئین خارج غشایی *omp* (Outer membrane protein) حاوی توالی با حفاظت شدگی بالا و بسیار اختصاصی بین گونه‌ها، یک ژن از غشاء سطحی باکتری CLas است که به عنوان مارکر مولکولی جهت شناسایی اولیه بیماری گرینینگ در روش های مبتنی بر PCR استفاده شده است (Hong et al. 2019). علاوه بر این، گزارش شده است که ژن هیدروفوبیک *omp* بیان شده در سطح غشاء پاتوژن پتانسیل بسیار بالایی در تولید آنتی‌بادی اختصاصی دارد (Khushiramani et al. 2007; Cho et al. 2020). در میان سیستم‌های بیان ژن مختلف جهت تولید پروتئین نوترکیب، بیان ژن هدف در باکتری (*E. coli*) یک پلیت‌فورم بیانی با سیستم میزبانی شناخته شده‌ای است که به طور وسیع برای تولید پروتئین نوترکیب بدون تغییرات پس از ترجمه ژن مورد استفاده قرار گرفته است (Upadhyay et al. 2014). هزینه پایین تجهیزات لازم، رشد بسیار بالای باکتری در یک محیط کشت ساده، غلظت بالای سلولی و تولید بالا در مقیاس وسیع از مزیت‌های اصلی برای استفاده از این میزبان بیانی به شمار می‌روند (Wang et al. 2017). بعد از بیان پروتئین نوترکیب هدف در باکتری میزبانی، معمولاً پروتئین مذکور با استفاده از روش‌های مختلف تخلیص مبتنی بر ستون کروماتوگرافی جهت بهره‌مندی در زمینه‌های اهدافی مختلف تحقیقاتی خالص‌سازی

می‌شوند. یک روش منفرد و ساده تخلیص برای تمام پروتئین‌ها وجود ندارد و بسته به هدف تحقیق، شرایط و مراحل خالص‌سازی یک پروتئین بایستی بهینه‌سازی شود. بنابراین، ممکن است فرآیند و عملیات تخلیص یک پروتئین با پروتئین دیگر بسیار متفاوت باشد (Asenjo & Andrews 2009). به منظور دستیابی به سطح بالای خلوص پروتئین، ضروری است در تخلیص پروتئین نوترکیب، چندین مرحله کروماتوگرافی بکار گرفته شود. یکسری از تکنیک‌های قابل دسترس نظیر تبادل کاتیونی و آنیونی در محدوده‌ی pH های مختلف، کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون، تمایلی و غیره وجود دارد. بنابراین در یک نمونه پروتئین ناشناخته یا عصاره سلولی، بهینه‌سازی‌های متعددی با انتخاب روش مناسب‌تر و اجرای مراحل کارآمدتر تخلیص به منظور دستیابی به خلوص بالا و ایده‌آل پروتئین نوترکیب هدف وجود دارد (Duong-Ly & Gabelli 2014). الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌امید در سدیم دودیل سولفات SDS-PAGE یکی از تکنیک‌هایی است که به عنوان یک روش آنالیتیکال کارآمد جهت تعیین کمیت و اندازه پلی‌پتیدها در نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرد. اغلب در بسیاری از زمینه‌ها نظیر پروتئومیکس، بیوتکنولوژی مولکولی، دارویی و بیوتکنولوژی پزشکی جهت بررسی نقشه پروتئینی، ارزیابی بیان پروتئین هدف و رنگ‌آمیزی کردن پروتئین مخصوصا زمانیکه پروتئین ناشناخته باشد، ضروری است که پروتئین مورد نظر از ماتریکس ژل پلی‌آکریل‌امید به منظور آنالیز بهتر و کارآمدتر نظیر طیف سنجی جرمی، توالی‌یابی آمینواسیدی و آنالیز تغییرات پس از ترجمه استحصال شود (Harrington 1990). در بسیاری از موارد ذکر شده، پیشبرد اهداف تحقیقی نیازمند روش حساسی است که پروتئین مورد نظر را به طور مستقیم به فاز مایع بازیابی شود طوری‌که از تغییرات شیمیایی و واسرشته شدن پروتئین بازیابی شده، ممانعت به عمل آورد. بطور معمول روش‌هایی مانند شستشو یا ایلوت کردن توسط انتشار<sup>۱</sup>، الکتروالوشن<sup>۲</sup> و سونیکاسیون<sup>۳</sup> جهت بازیابی پروتئین هدف بیان شده از ماتریکس ژل پلی‌آکریل‌امید بکار رفته است (Retamal et al. 1999; Kurien and Scofield 2012). مطالعاتی مبنی بر بازیابی و جداسازی پروتئین ژن آلفاتوکسین بیماری *Clostridium septicum* از ژل جهت تولید آنتی‌بادی به روش الکتروفورز توسط (Ballard et al. 1992; Vahid et al. 2011) گزارش شده است. در این راستا، در پژوهش حاضر، بهینه‌سازی تخلیص پروتئین نوترکیب خارج غشایی *omp* باکتری عامل بیماری گرینینگ مرکبات برای دستیابی به خلوص بالای پروتئین نوترکیب هدف و باند اختصاصی و مجزای آن از ماتریکس ژل پلی‌آکریل‌امید صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

**کلون‌سازی و بیان ژن هدف:** استخراج DNA به روش CTAB از نهال‌های آلوده پرتغال تهیه شده از شهرستان میناب استان هرمزگان طبق روش Murray and Thompson (1980) انجام شد. ابتدا ژن کدکننده *omp* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای

<sup>۱</sup> Elution by diffusion

<sup>۲</sup> Electroelution

<sup>۳</sup> Sonication

پلی مرز به کمک آغازگرهای اختصاصی شامل آغازگر رفت omp F1 5-TGA GGA TCC ATA TTT TTT AGG-3 و توالی آغازگر برگشتی omp R1 5-AGT GTC GAC CAT GCG ATT ACC TAT ACG-3 به ترتیب حاوی سایت برشی آنزیم *XoI* و *NcoI* تکثیر شده و قطعه مربوطه در ناقل بیانی pET28a وارد شد. سازه جدید pET28a-omp به باکتری *E. coli* سویه Rosetta-Gami2 (DE3) وارد شد و از این سلول های تراریخته باکتری برای تولید پروتئین نوترکیب omp استفاده شد (Dasari Venkata 2009). یک کلنی از کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب به صورت جداگانه در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت 2YT مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامیسین و گلوکز یک درصد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به صورت شبانه کشت شد. پس از کشت شبانه باکتری، کشت مجدد از باکتری در ۵۰۰ میلی لیتر محیط حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامیسین و گلوکز یک درصد انجام شد. پس از رسیدن به جذب نوری (OD<sub>600</sub>) ۰/۵، یک نمونه از این مرحله برداشته شد و سپس عمل القا به تولید پروتئین با استفاده از ماده شیمیایی ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید (IPTG) در غلظت یک میلی مولار و در زمان ۱۶ ساعت صورت گرفت (Ausubel et al. 1995). در نهایت سلول به کمک سانتریفیوژ (۳۰ دقیقه در ۴۰۰۰× جمع آوری و مایع رویی دور ریخته شد و ته نشین به مدت ۱۶ ساعت در ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. رسوب منجمد ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت تا کاملاً ذوب شد. به ازای هر گرم وزن تر دو تا پنج میلی لیتر بافر لیز کننده و سپس یک گرم در میلی لیتر آنزیم لیزوزیم اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. تخریب دیواره سلولی باکتری با استفاده از امواج صوتی اولتراسونیک با توان ۲۰۰ وات به تعداد هفت دوره ۱۰ ثانیه ای با فواصل میانی ۱۰ ثانیه، بر روی یخ صورت گرفت. سلول های تخریب شده به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی جهت استفاده در ستون دارای رزین نیکل (Ni<sup>2+</sup>) جداسازی شد.

**بهینه سازی تخلیص پروتئین با استفاده از ستون کروماتوگرافی:** عملیات خالص سازی پروتئین نوترکیب تحت شرایط طبیعی (Native) و واسرشته (Denature condition) با استفاده از ستون آگارز حاوی یون های نیکل دو ظرفیتی صورت گرفت. جزئیات و اجزای بافرهای تخلیص پروتئین در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به اینکه قطعه ژنی هدف کلون شده در انتهای آمینی خود دارای دنباله شش تایی هیستیدین است، پروتئین بیان شده همراه با این دنباله بوده و این قابلیت را میسر می سازد که بتوان آن را توسط کروماتوگرافی و با استفاده از ستون دارای رزین نیکل (Ni<sup>2+</sup>) تخلیص کرد. جهت انجام این کار ۵۰۰ میکرولیتر از رزین Ni-NTA داخل ستون ریخته و با آب مقطر شستشو داده شد. روشن شدن حاصل از سانتریفیوژ مرحله قبلی دو بار از ستون عبور داده شد. نمونه های یک میلی لیتری از روشن شدن و محلول عبور داده شده از ستون نگهداری شدند. ستون با استفاده از ۴ میلی لیتر از بافر اتصال متعادل سازی شد و سپس دوبار شستشوی ستون با چهار میلی لیتر بافر شستشو انجام شد و نمونه ای یک میلی لیتری از این مرحله برداشته شد. پروتئین های متصل شده به رزین با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر الوشن در چهار نوبت شسته شدند. تأیید مرحله بیان و خالص سازی پروتئین نوترکیب هدف توسط ژل پلی اکریل آمید و همچنین آزمون وسترن بلاتینگ انجام شد (Ausubel et al. 1995). به منظور بهینه سازی تخلیص پروتئین omp، اثرات عامل های کاهشی ترکیب اوره در چهار سطح ۲، ۴، ۶ و ۸ مولار،

گوآنیدین هیدروکلراید در چهار سطح ۱، ۲، ۴ و ۶ مولار و نمک کلرید سدیم در سه سطح ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی مولار برای واسرشته کردن و بدست آوردن مقدار پروتئین بالا خالص سازی شده مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، اثرات محدوده‌ی رنجی pH های مختلف بالاتر و پایین تر از نقطه ایزوالکتریک (pI) پروتئین هدف در بافر الوشن به صورت پنج سطح ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در بدست آوردن خلوص بالای پروتئین هدف در مرحله الوشن گرفتن و شستشوی ستون تخلیص مورد آنالیز قرار گرفت. در مرحله ارزیابی، نتایج حاصل از اثرات عامل‌های مورد بررسی با اجزای بافری A تخلیص پروتئین با اوره و گوآنیدین هیدروکلراید تحت شرایط واسرشته به عنوان بافر کنترلی یا شاهد<sup>۵</sup> قیاس شد (جدول ۱).

**آنالیز پروتئین با تکنیک SDS-PAGE و وسترن بلات:** بررسی کیفیت پروتئین تخلیص شده توسط روش‌های بهینه سازی تخلیص و روش‌های بازبایی با الکتروفورز پروتئین در حضور سدیم دودسیل سولفات انجام شد. ژل عمودی شامل ژل جداکننده-ی ۱۲ درصد (pH ۸/۸) و ژل متراکم کننده‌ی چهار درصد (pH ۶/۸) مورد استفاده قرار گرفت (Ausubel et al. 1995). الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت تا رسیدن رنگ به انتهای ژل انجام شد. ژل در محلول رنگ‌آمیزی به مدت یک ساعت روی شیکر رنگ‌آمیزی و سپس ژل در محلول رنگ‌بری به مدت دو ساعت روی شیکر قرار گرفت. برای اطمینان از وجود پروتئین هدف، آنالیز وسترن بلات انجام شد. ابتدا پروتئین‌های نوترکیب تخلیص شده روی ژل SDS-PAGE به مدت یک و نیم ساعت در ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند و در مرحله بعدی با استفاده از تانک الکتروترانسفر در حضور بافر ترانسفر به مدت ۲ ساعت بر روی غشای نیتروسولوزی منتقل شدند. پروتئین‌های ایموبلایز شده بروی غشاء در شیر بدون چربی ۳ درصد به مدت یک شبانه روز بلاک شدند و بعد از آن در معرض آنتی بادی اولیه Anti-His tag به مدت سه ساعت در حالت شیک قرار گرفت. در نهایت غشاء در معرض آنتی بادی ثانویه goat anti-mouse کونژوه شده به کالین فسفاتاز قرار گرفت. باند حاصل از واکنش اتصال آنتی بادی‌ها با دنباله هیستیدین پروتئین نوترکیب با اضافه کردن سوبسترای<sup>۶</sup> NBT/BCIP تحت شرایط تاریک نمایان شد (Mahmood & Yang 2012).

**استخراج پروتئین از ژل SDS-PAGE:** جهت جداسازی پروتئین *omp* نوترکیب از ماتریکس ژل پلی آکریل آمید سه روش شستشوی توسط انتشار، سونیکاسیون و الکتروالویشن بکار گرفته شد. ابتدا پروتئین‌های نوترکیب تخلیص شده توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل، پس از اضافه کردن بافر نمونه و جوشاندن به مدت ۵ دقیقه توسط SDS-PAGE مورد آنالیز قرار گرفت.

<sup>4</sup> Isoelectric point

<sup>5</sup> Control buffer

<sup>6</sup> 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitro blue tetrazolium



جدول ۱. اجزای بافری مورد استفاده برای بهینه‌سازی تخلیص پروتئین نو ترکیب هدف تحت شرایط واسرشته

**Table 1. Composition of the buffer used for optimization and purification of the recombinat target protein under denature condition**

Applied buffers in protein purification under denature condition	Details of buffer	Control buffer urea A	Control buffer Guanidine-HCL A	Control buffer urea B	Control buffer Guanidine-HCL B	Control buffer urea C
بافرهای استفاده در استخراج پروتئین تحت شرایط دنچر	اجزای بافر	بافر کنترلی اوره A	بافر کنترلی گوانیدین هیدروکلراید A	بافر کنترلی اوره B	بافر کنترلی گوانیدین هیدروکلراید B	بافر کنترلی اوره C
بافر لیزکننده دنچر	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
Denature lysis buffer (1 Litter)	NaCl	250 mM	250 mM	500 mM	500 mM	500 mM
pH=7.8	Urea/Gu-HCL	4 M	(Gu-HCL) 2 M	4 M	(Gu-HCL) 2 M	6 M
بافر اتصال دنچر	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
Denature binding buffer (1 Litter)	NaCl	250 mM	250 mM	500 mM	500 mM	500 mM
pH=7.8	Urea	6 M	(Gu-HCL) 4 M	6 M	(Gu-HCL) 4 M	8 M
بافر شستشوی دنچر	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
Denature Washing Buffer (1 Litter)	NaCl	250 mM	250 mM	500 mM	500 mM	500 mM
pH=6.5	Urea	6 M	(Gu-HCL) 4 M	6 M	(Gu-HCL) 4 M	8 M
بافر الوشن دنچر	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM
Denature Elution Buffer (1 Litter)	NaCl	250 mM	250 mM	500 mM	500 mM	500 mM
pH=4.0	Urea	6 M	(Gu-HCL) 4 M	6M	(Gu-HCL) 4 M	8 M

**Gu-HCL: نشان دهنده عامل کاهشی گوانیدین هیدروکلراید است.**

برای شناسایی پروتئین مورد نظر از مارکر پروتئینی استاندارد رنگدار ثابت استفاده شد. برای روش شستشوی توسط انتشار، بعد از الکتروفورز کردن ژل، پروتئین مورد نظر درست از مقابل اندازه ۳۴ کیلو دالتونی از مارکر پروتئینی با استفاده از اسکارپل تیز بریده شد و چندین مرحله توسط آب مقطر استریل به مدت یک دقیقه شستشوی شد. پس از برش قطعات ژل به اندازه چند میلی متری توسط سرنگ های پنج میلی متری سه مرتبه با عبور از سرنگ پودر شد. به ژل های پودر شده بافر استخراج الوشن (۱۵۰ میلی مولار NaCl، ۵۰ میلی مولار Tris-HCl، ۰٫۱ میلی مولار EDTA در pH ۷٫۵) به میزان ۱ میکرو لیتر اضافه شد. بعد از کمی پیپت کردن در داخل فالكون، در دمای ۳۲ درجه به مدت یک شبانه روز انکوبه شد. بعد از انکوبه کردن، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ g دور سانتریفیوژ شد و سپس مورد سوپرناتانت با دقت به تیوپ جدید منتقل شد و بقیه مراحل طبق روش Harrington (1990) انجام گردید. نمونه‌های حاصل مجددا جهت تایید حضور پروتئین هدف مجددا مورد آنالیز قرار گرفتند.

در روش بازیابی از طریق سونیکاسیون، نیز قطعات ژل بریده شده حاوی پروتئین نو ترکیب مورد نظر ابتدا در ۲ میلی لیتر از بافر Tris/EDTA (۲۵۰ میلی مولار تریس و ۲۵۰ میلی مولار EDTA با pH ۷٫۴) شستشو شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل مجددا شستشوی گردید. سپس در مرحله بعدی قطعات ژل توسط پیپت پاستور خشک شدند و از داخل سرنگ ۵ میلی متری ۳ بار عبور داده شد تا کاملا پودر شوند. در نهایت به نمونه ها یک میلی لیتر از بافر ۲۰ میلی مولار تریس حاوی SDS ۰٫۱ درصد به نسبت ۱:۲ اضافه شد. در آخر با استفاده از امواج صوتی اولتراسونیک ( High-intensity ultrasonic processor, 50-W )

(model) با توان ۲۰۰ وات به تعداد هفت دوره ۱۰ ثانیه ای با فواصل میانی ۱۰ ثانیه، ۳ بار بر روی یخ سونیکه شد (Retamal et al. 1999). در روش بازیابی توسط الکتروالوشن، مطابق روش سونیکاسیون بانده مورد نظر از ژل بریده شد و با بافر مذکور و آب مقطر استریل به ترتیب شستشوی شدند. ژل به قطعات ریزتر بریده شده و در داخل محفظه شیشه ای بروی فیلتر متخلخل قرار داده شد. سپس مولکول‌های پروتئینی موجود در تکه‌های ژل از طریق فیلتر متخلخل بروی تله غشایی تحت تاثیر میدان الکتریکی عبور داده شدند تا در داخل بافر مورد نظر توضیح داده شده توسط Lei و همکاران (2007) آزاد شوند.

### تعیین کارایی بهینه‌سازی تخلیص و استحصال: بعد از اتمام مراحل تخلیص و ایزوله کردن از ماتریکس ژل، الکتروفورز

پروتئین‌ها در حضور سدیم دودسیل فسفات صورت گرفت. تعیین میزان پروتئین تخلیص شده یا استحصال شده از ماتریکس ژل با استفاده از نرم افزار ImageJ و مقایسه با مقادیر مشخص پروتئین استاندارد (۲۵۰، ۷۵۰، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) آلبومین سرم گاوی (BSA)<sup>۷</sup> صورت گرفت. برای این منظور، پس از انجام مراحل SDS-PAGE، تصویر ژل توسط نرم افزار اسکن شد و سپس پس براساس شدت باند پلات‌هایی رسم شدند. با مقایسه مساحت زیر باند نمونه‌ها با مساحت زیر پلات پروتئین استاندارد غلظت پروتئین مجهول بدست آمد. علاوه بر این، میزان خلوص نمونه‌ها با تقسیم مساحت پیک باند مورد نظر بر مجموع مساحت دیگر پیک‌های آن نمونه ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. در کل غلظت پروتئین نوترکیب با روش‌های مرتبط بوسیله رگرسیون‌های خطی بدست آمده از باندها با استفاده از نرم افزار ImageJ مورد ارزیابی قرار گرفت.

### آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز و تجزیه واریانس و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۰) مورد بررسی قرار

گرفت. برای مقایسه بین شرایط بهینه مختلف و نیز تعیین اختلاف معنی‌دار بین آنها از تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار یا (LSD (least significant difference) استفاده به عمل آمد و معنی‌دار بودن تیمار در فاصله اطمینان ۹۵ درصد یا با احتمال ۰/۰۵ درصد بررسی شد.

## نتایج و بحث

### بهینه‌سازی تخلیص پروتئین omp در شرایط طبیعی و واسرشته: پس از جداسازی و انتقال ژن کد کننده omp

به ناقل بیانی باکتریایی pET28a، از این سازه برای تولید پروتئین نوترکیب omp استفاده شد. پس از بیان ژن در میزبان باکتریایی خالص‌سازی پروتئین نوترکیب در شرایط طبیعی و واسرشته صورت پذیرفت. کمیت و کیفیت پروتئین نوترکیب حاصله با روش الکتروفورز SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از خالص‌سازی پروتئین نوترکیب در شرایط طبیعی حاکی از عدم موفقیت آمیز بودن مراحل خالص‌سازی می‌باشد (شکل ۱؛ لاین E1-E3). با توجه به خصوصیات آب‌گریز بودن پروتئین omp،

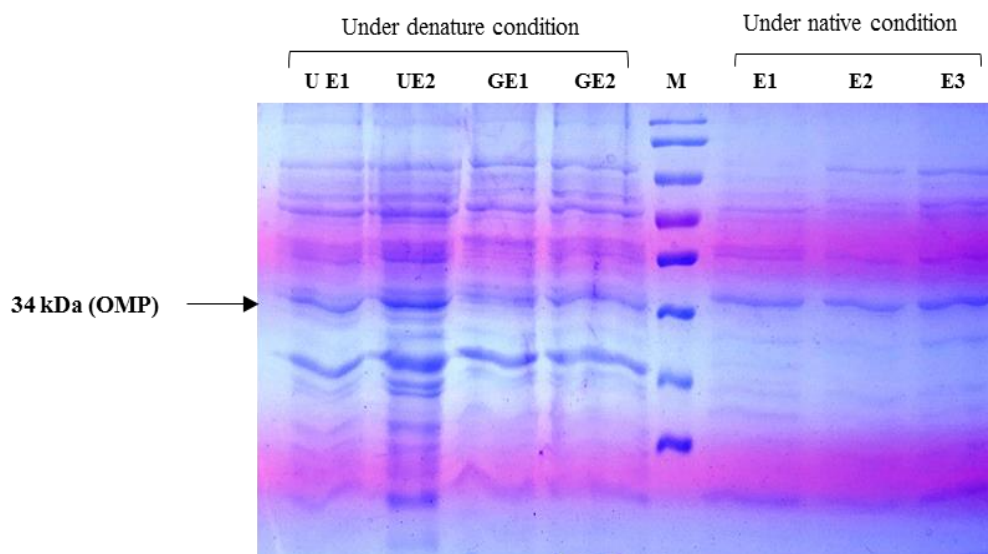
<sup>7</sup> Bovine serum albumin

بنظر می رسد که عمده پروتئین تولید شده به صورت نامحلول درآمده و در فاز مواد سلولی رسوب کرده می شود (Gu et al. 2003). نتایج بررسی ترادف آمینواسیدی *omp* در برنامه Expsy Protscale online software (<http://www.expsy.ch/tools/protscale.html>) نشان داد که این پروتئین حاوی ۲۸۹ آمینواسید با وزن مولکولی تخمینی حدوداً ۳۴ کیلوالتون می باشد. علاوه بر این، نقطه ایزوالکتریک (pI) آن در حدود ۶/۶۹ تخمین زده شد. تست هیدروفوبیسی حاصل از قیاس Kyte and Doolittle (1982) نشان داد که پروتئین ژن هدف بسیار آیدوگریز یا هیدروفوبیک می باشد.

با توجه به ماهیت آبگریزی پروتئین هدف، خالص سازی آن در شرایط واسرشته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اولیه آنالیز نشان داد که پروتئین خروجی از ستون کروماتوگرافی حاوی باند ۳۴ کیلوالتون مرتبط با پروتئین هدف بود ولی کارایی تلخیص پروتئین کمتر بود (شکل ۱). برای این منظور، بهینه سازی شرایط خالص سازی با غلظت های مختلف اوره و گوانیدین هیدروکلراید جهت تلخیص با کارایی بالا در چهار مرحله از فرآیند تلخیص تحت شرایط واسرشته مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). قبل از بررسی شرایط بهینه عوامل کاهش اوره و گوانیدین هیدروکلراید در تلخیص پروتئین هدف، ابتدا بهینه سازی اثر غلظت های مختلف نمک NaCl (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ میلی مولار) در اجزای بافر کنترلی اوره و گوانیدین هیدروکلراید (جدول ۱) مورد آنالیز قرار گرفت و غلظت پروتئین حاصله با استفاده از رگرسیون خطی نرم افزار ImageJ از روی پیک باند حاصله از ژل مورد محاسبه واقع شد.

#### بهینه سازی غلظت سدیم کلراید در طی مراحل تلخیص: با توجه به نقش سدیم کلراید در اتصال و جداسازی پروتئین

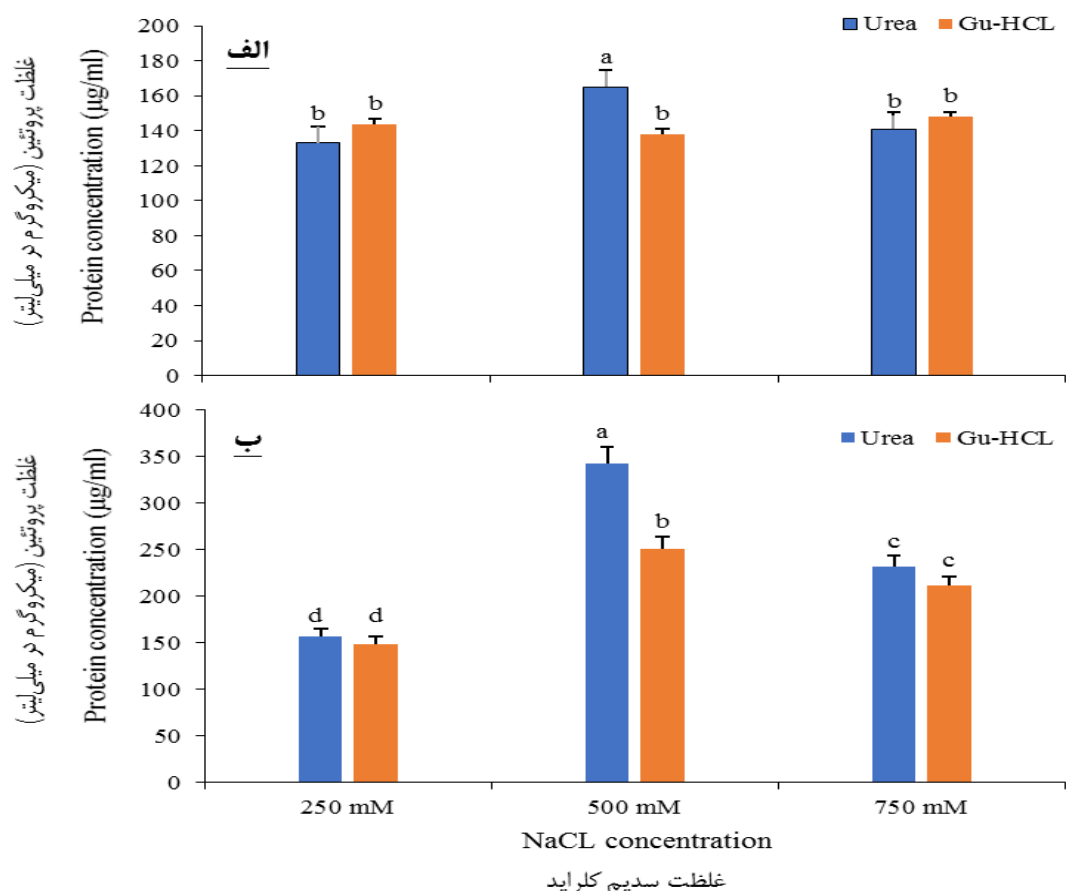
به ستون کروماتوگرافی، لازم است که غلظت مناسب این ترکیب در بافرهای مورد استفاده در مراحل خالص سازی بهینه سازی گردد. غلظت های مختلف سدیم کلراید در مراحل شستشوی (Washing) و الوشن (Elution) طبق بافر کنترلی A در جدول ۱ اعمال شد. نتایج حاصل از بهینه سازی غلظت های مختلف سدیم کلراید در دو مرحله از تلخیص پروتئین نوترکیب (شکل ۲) نشان داد که بهینه سازی غلظت سدیم کلراید در مرحله الویشن تلخیص به مراتب کارایی بالاتری از مرحله شستشوی داشت. در مرحله شستشوی تنها غلظت ۵۰۰ میلی مولار سدیم کلراید توانست باعث افزایش در میزان کمی پروتئین تلخیصی در بافر کنترلی اوره گردد در صورتیکه اعمال این غلظت از سدیم کلراید در مرحله الویشن بطور قابل ملاحظه ای مقدار پروتئین تلخیصی را حدوداً ۲/۵ برابر نسبت به مرحله شستشوی افزایش داد (شکل ۲ الف و ب). اساس روش کروماتوگرافی تعویض یونی برهمکنش یونی است و در واقع یک رقابت میان یونها جهت لیگاند شدن به گروه های باردار شده با بار مخالف بروی یک تعویض یونی برقرار است. قدرت یونی، بار خالص، توزیع بار سطحی پروتئین، طبیعت یونهای ویژه در حلال و خواص تعویض کننده یونی نظیر سدیم کلراید می تواند برهمکنش میان پروتئین و یک تعویض کننده یونی تحت تاثیر قرار دهند (Babaie 2020). در داخل ستون کروماتوگرافی همواره بین فاز ساکن (جامد) و فاز متحرک (محلول) مبادله می شود و هر مولکول با بار سطحی مخالف فاز ساکن متصل خواهد شد؛ بدین صورت که مولکول هایی با بار منفی به رزین آنیون تعویضی و مولکول های با بار مثبت به رزین کاتیون تعویضی پیوند می شوند.



شکل ۱. نتایج حاصل از تخلیص پروتئین نو ترکیب *omp* تحت شرایط طبیعی و واسرشته با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل. E1-E3: نمایانگر الوشن‌های تخلیص شده پروتئین نو ترکیب هدف تحت شرایط طبیعی؛ UE1-UE2 و GE1-GE2: به ترتیب نشان دهنده الوشن‌های تخلیص شده به کمک عامل کاهشی اوره و گوانیدین هیدروکلراید به عنوان بافرهای کنترلی A و M: نمایانگر مارکر پروتئینی رنگی استاندارد که باند پروتئین هدف کمی بالاتر از باند آن با اندازه ۳۳ کیلو دالتون قرار گرفته است

**Figure 1. The obtained the *omp* recombinant protein under the native and denature conditions by using the nickel chromatography column. E1-E3: representing the purified elution's of recombinant target protein under native condition; UE1-EU2 and GE1-GE2: representing the purified elution's via reducing agents such as urea and guanidine hydrochloride as control buffer A; M: shows the per-stained protein ladder where the band of target protein located at above band with the 33 kDa size belonged to protein marker**

بنابراین معمولاً یک گرادیان صفر تا غلظت بالای سدیم کلراید جهت تعویض پیوند مولکولی برای آنیونها ( $Cl^-$ ) و کاتیونها ( $Na^+$ ) استفاده می‌شود (Jungbauer & Hahn 2009). در این مطالعه مشاهده شد که غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار سدیم کلراید در مرحله الوشن تخلیص بیشترین اثر را در افزایش غلظت پروتئین بدست آمده داشت در حالیکه استفاده از غلظت‌های بالاتر و یا پایین تر باعث کاهش میزان پروتئین نو ترکیب حاصله شد (شکل ۲). بنابراین، این احتمال وجود دارد که سدیم کلراید با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار شرایط لازم تعویض یونی برای اتصال پروتئین هدف به رزین ستون نیکل را بهتر فراهم نموده است. از اینرو، غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار سدیم کلراید به عنوان غلظت بهینه در مرحله بعدی برای بهینه سازی تخلیص با اوره و گوانیدین هیدروکلراید در اجزای بافر بصورت ثابت گنجانده شد.



شکل ۲. بهینه سازی غلظت‌های مختلف نمک (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ میلی‌مولار) در اجزای بافری کنترلی اوره و گوانیدین هیدروکلراید (Gu-HCL) در مرحله شستشوی (الف) و مرحله الوشن (ب) تخلیص *omp* تحت شرایط واسرشته با استفاده از ستون کرما توگرافی تعویض یونی نیکل. هر غلظت پروتئین از میانگین سه باند (سه تکرار) پروتئین مذکور با استفاده از نرم افزار ImageJ بر مبنای رگرسیون خطی محاسبه شده است. حروف متفاوت تغییرات معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد را نشان می‌دهد. علامت بادر نمودار نشان دهنده انحراف استاندارد (SD) است

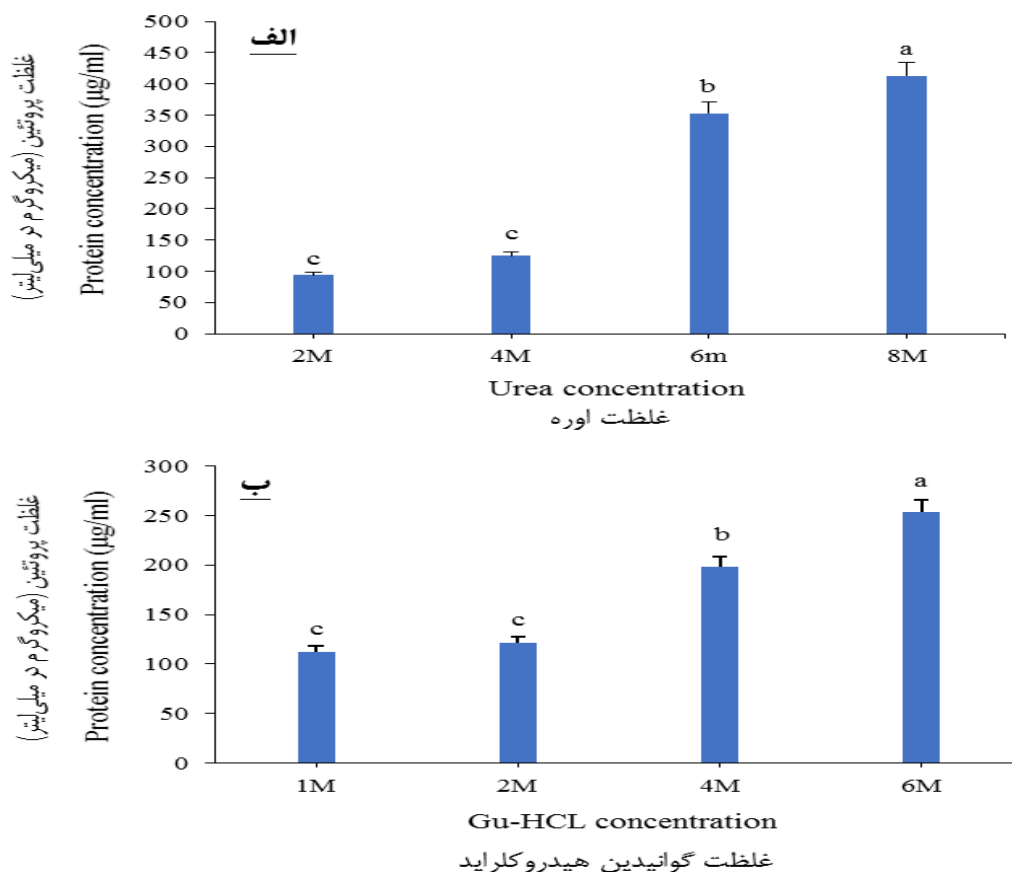
**Figure 2. Optimization of the different concentration of NaCL (250, 500 and 750 mM) in urea control buffer A and guanidine hydrochloride (Gu-HCL) at washing (A) and elution (B) steps of the *omp* purification under denature condition via nickel ion-exchange chromatography column. Each protein concentration has calculated from three bands of an *omp* protein sample via ImageJ software based on linear regression. Different letters indicate significance at  $p<0.05$ . Error bars indicate standard deviation (SD) in figure**

بهینه سازی غلظت اوره و گوانیدین هیدروکلراید در مراحل خالص سازی پروتئین نوترکیب در شرایط

واسرشته: غلظت بهینه سدیم کلراید (۵۰۰ میلی مولار)، برای تهیه بافرهای کنترلی تخلیص اوره B و تخلیص گوانیدین هیدروکلراید

B استفاده شد و کارایی غلظت‌های مختلف اوره و گوانیدین هیدروکلراید در اجزای بافری تخلیص مورد بررسی قرار گرفت و بدین

ترتیب نتایج حاصل از آن با بافرهای کنترلی B قیاس شد (جدول ۱).



شکل ۳. بهینه سازی غلظت‌های مختلف عوامل کاهش‌دهنده اوره (الف) و گوانیدین هیدروکلراید (ب) در اجزای بافری بر تخلیص پروتئین نوترکیب *omp* توسط ستون کروماتوگرافی یونی نیکل. Gu-HCL: گوانیدین هیدروکلراید؛ هر غلظت پروتئین از میانگین سه باند (سه تکرار) پروتئین مذکور با استفاده از نرم افزار ImageJ بر مبنای رگرسیون خطی محاسبه شده است. حروف متفاوت تغییرات معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد را نشان می‌دهد. علامت بادر نمودار نشان دهنده انحراف استاندارد (SD) است

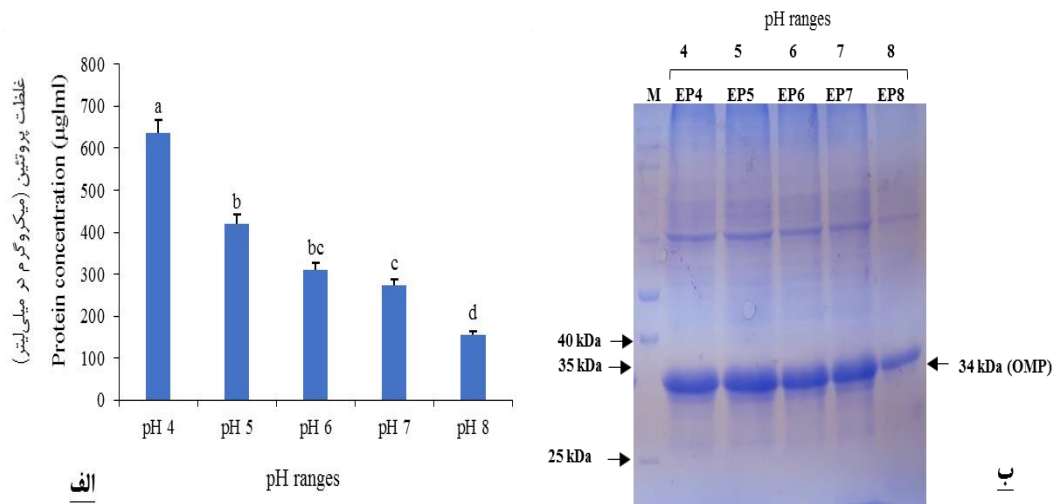
**Figure 3.** Optimization of the different concentration reducing agents, including urea (A) and guanidine hydrochloride (B) in the buffer on purification rate of *omp* recombinant protein via nickel ion-exchange chromatography column. Gu-HCL: representing the guanidine hydrochloride. Each protein concentration has calculated from three bands of a *omp* protein sample via ImageJ software based on linear regression. Different letters indicate significance at  $p < 0.05$ . Error bars indicate standard deviation (SD) in figure

آنالیز SDS-PAGE به همراه ارزیابی شدت باندهای حاصله از روی ژل توسط نرم افزار ImageJ نشان داد که مقدار پروتئین نو ترکیب خروجی از مراحل تخلیص توسط اوره به مراتب بالاتر از عامل کاهشی گوانیدین هیدروکلراید بود. نتایج آنالیز آماری مقایسه میانگین آزمون دانکن نشان داد که با افزایش غلظت عوامل کاهشی اوره و گوانیدین هیدروکلراید در اجزای بافری در هر چهار مرحله از تخلیص پروتئین هدف منجر به افزایش معنی دار میزان پروتئین تخلیصی شد. نتایج حاصله نشان داد که میزان پروتئین تخلیص شده با روش استفاده از اوره به مراتب خیلی بالاتر از گوانیدین هیدروکلراید می باشد (شکل ۳ ب). بنابراین غلظت‌های مختلف گوانیدین تاثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش میزان پروتئین حاصله ندارد (شکل ۳ الف). نتایج نشان داد که استفاده از غلظت ۸ مولار اوره در اجزای بافری تخلیص منجر به بدست آمدن بالاترین میزان پروتئین خروجی (۴۱۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) از فرایند تخلیص شد که نشان دهنده اتصال بالای پروتئین هدف لینک شده با توالی هستیدین به رزین ستون تحت شرایط بافری مذکور می‌باشد. نتایج حاصله حاکی از اینست که با افزایش غلظت عوامل کاهشی، میزان پروتئین خروجی از ستون کروماتوگرافی نیز افزایش می‌باشد. این روند افزایشی میزان پروتئین توسط عامل کاهشی اوره محسوس تر از عامل کاهشی گوانیدین هیدروکلراید بود (شکل ۳). اگر چه مکانسیم تاثیر عامل کاهشی کاملاً معلوم نشده است ولی مطالعه‌ها نشان داده است که استفاده از عامل کاهشی اوره باعث جلوگیری از توده‌ای شدن پروتئین و حفظ ساختار آن می‌شود. علاوه بر این، آن عنوان شده است که عامل کاهشی به دلیل تاثیر گذاری و برهمکنش با سطح هیدروفوبیک اسیدآمین‌های پروتئین هدف اثر خوبی در تاخوردگی پروتئین دارد ( Yamaguchi and Miyazaki 2014). از آنجا که پروتئین نو ترکیب *omp* داری سطح هیدروفوبیک می‌باشد، بنابراین این احتمال وجود دارد که عامل کاهشی اوره از طریق برهمکنش با سطح هیدروفوبیک پروتئین نو ترکیب باعث پایداری و تخلیص بهتر آن شده است. علی رغم مزیت های فراوان تولید پروتئین نو ترکیب در سیستم بیانی باکتری *E. coli*، استفاده از این سیستم برای تولید مقادیر بالای پروتئین های نامحلول در بیشتر موارد منجر به تولید پروتئین نو ترکیب غیرفعال و توده‌ای بنام اینکلوزن بادی (IBs) Inclusion bodies می‌کند (Vallejo & Rinas 2004). نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد محلول سازی پروتئین حاصله در ساختارهای IBs، در محیط‌های واسرشته با استفاده از ترکیباتی از قبیل اوره و گوانیدین هیدروکلراید امکان پذیر می‌شود. ایجاد تاخوردگی مجدد (Refolding) در پروتئین دنچیر شده می‌تواند منجر به بازبازی ساختار اصلی پروتئین شده و سبب شود پروتئین حاصله از لحاظ زیستی قابلیت عملکرد بیوشیمیایی خود را به عنوان یک پروتئین فعال بدست آورد تا در برنامه تحقیقاتی آتی نظیر تولید آنتی‌بادی از عملکرد خوبی به صورت ایمونوزن برخوردار باشد ( Alibolandi & Mirzahoseini 2011; Yamaguchi et al. 2014; Mirhosseini et al. 2019). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که غلظت بالای عامل کاهشی اوره بهتر از عامل کاهشی گوانیدین هیدروکلراید در محلول سازی پروتئین نو ترکیب و ایجاد شرایط یونی مناسبی جهت اتصال دنباله هستیدین پروتئین هدف به رزین ستون نیکل عمل نموده است.

**بهینه سازی pH در بافرهای مورد استفاده:** مطالعات قبلی نشان داده است که کارایی بهتر عامل واسرشته سازی اوره جهت محلول سازی پروتئین های نامحلول به میزان pH وابستگی دارد و بایستی شرایط بهینه pH برای هر پروتئین مشخص شود

(Vallejo & Rinas 2004). از اینرو، غلظت ۸ مولار اوره و ۶ مولار گوانیدین به همراه غلظت بهینه نمک سدیم کلراید (۵۰۰ میلی‌مولار) به عنوان غلظت بهینه در اجزای بافری فرایند تخلیص پروتئین نوترکیب *omp* تحت شرایط واسرشته جهت بررسی اثرات pH های مختلف ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ در کارایی تخلیص در مرحله الوشن به عنوان بافر کنترلی C گنجانده شد (جدول ۱). مشخص شده است که اجزای بافری الوشن از قبیل نقطه ایزوالکتریک پروتئین (pI) یک فاکتور موثر در خالص سازی پروتئین های نوترکیب می باشد (Llompert et al. 2010). مقایسه میانگین حاصل از محاسبه پیک باندهای مرتبط با پروتئین هدف بروی ژل به کمک نرم افزار ImageJ نشان داد که با کاهش pH بافر الوشن از حالت بازی به سمت اسیدی میزان غلظت پروتئین تخلیصی خروجی از ستون کروماتوگرافی بطور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. بنابراین، بیشترین مقدار پروتئین تخلیصی (۶۳۵,۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) زمانی بدست آمد که pH بافر الوشن در محدوده ۴ تنظیم شده بود در حالیکه کمترین مقدار آن (۱۵۵,۷ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محدوده pH برابر با ۸ حاصل شد (شکل ۴ الف). آنالیز SDS-PAGE نیز اثر pH های پایین (۴، ۵، ۶) بر افزایش میزان غلظت پروتئین هدف خروجی تحت شرایط دنیچیر توسط ستون کروماتوگرافی با اندازه ۳۴ کیلودالتون را تایید کرد (شکل ۴ ب). در این مطالعه، نقطه ایزوالکتریک پروتئین *omp* به کمک سرور و پایگاه داده پروتئینی مربوطه در حدود ۶/۶۹ تخمین زده شد. عنوان شده است که اگر پروتئین هدف دارای نقطه ایزوالکتریک اسیدی باشد، در این حالت تبادل آنیونی بهترین انتخاب بوده و بایستی pH بافر الوشن حداقل یک واحد بیشتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئینی باشد که بار منفی گرفته باشد. در مقابل، اگر پروتئین هدف حاوی نقطه ایزوالکتریک پایه (نزدیک ۷) باشد، در اینصورت تبادل کاتیونی بهترین انتخاب بوده که بایستی pH بافر الوشن حداقل یک واحد کمتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین هدفی باشد که بار مثبت کافی گرفته باشد (Jungbauer & Hahn 2009). pH یکی از فاکتورهای مهم اثرگذار در برهمکنش پروتئین و یک تعویض کننده یونی است علاوه بر تعیین بار سطح پروتئین و تعویض کننده یونی، یکی از مهم‌ترین پارامترها در تعیین پیوند پروتئین است. اگر چه پروتئین‌ها در pH های مختلف بار خالص متفاوتی دارند، اما پیوند پروتئین به تعویض کننده یونی زمانی اتفاق می‌افتد که بار خالص سطح پروتئین مخالف بار گروه‌های موجود در تعویض کننده یونی باشد. هر چه pH محلول نسبت به نقطه ایزوالکتریک پروتئین فاصله بیشتری داشته باشد، پروتئین به بستر (تعویض کننده یونی) پیوند قوی برقرار می‌کند. در pH های نزدیک نقطه ایزوالکتریک به دلیل بار خالص کم بروی سطح پروتئین، پیوند پروتئین با بستر پیوند محکمی نخواهد بود (Babaie 2020). بنابراین احتمالاً در pH های پایین تر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین OMP (pI مساوی ۶,۶۹) شرایط لازم برای اتصال قوی بین پروتئین و تعویض کننده یونی برقرار بوده و بدین ترتیب با قدرت یونی بالای بافری الوشن از بستر ستون شستشوی شدند تا کارایی مناسبی از تخلیص پروتئین هدف بدست آید. در کل نتایج حاصل از بهینه سازی عوامل کاهشی اوره و گوانیدین هیدروکلراید، نمک سدیم کلراید و pH های مختلف بر فرایند تخلیص تحت شرایط دنیچیر نشان داد که وجود عامل اوره با غلظت ۸ مولار به همراه نمک سدیم کلراید با غلظت ۵۰۰ میلی‌مولار و تنظیم pH بافری الوشن بروی ۴ می‌تواند به عنوان بهینه‌ترین حالت بافری مورد استفاده برای تخلیص پروتئین نوترکیب *omp* با کارایی بالاتر معرفی شود.



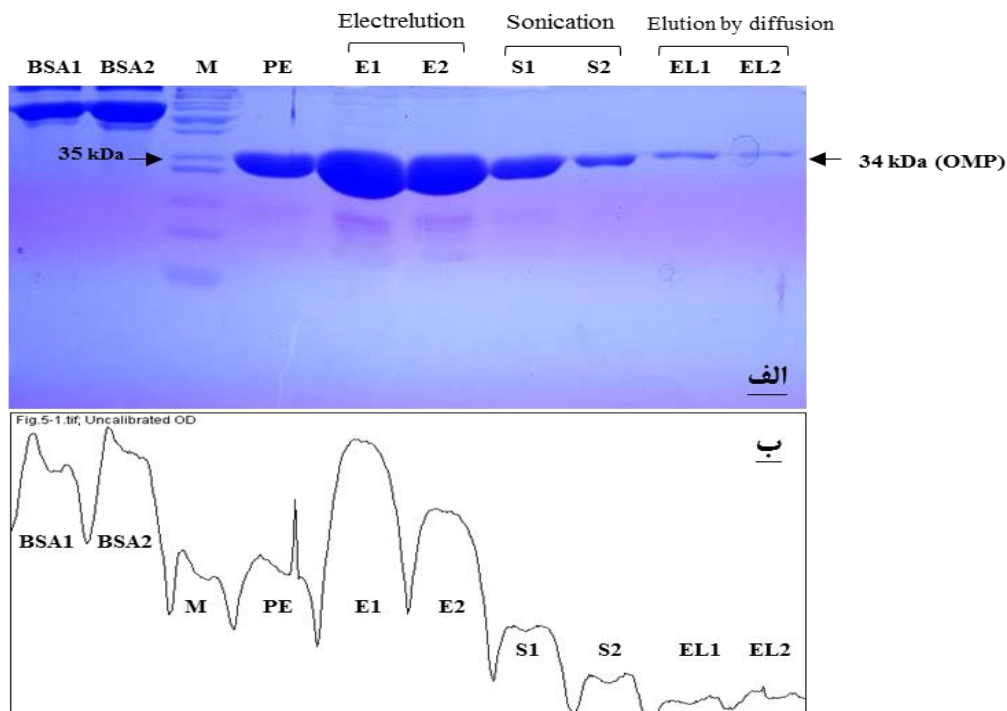


شکل ۴. الف) بهینه سازی pH های مختلف اجزای بافری حاوی ۸ مولار اوره و ۵۰۰ میلی مولار سدیم کلراید در مرحله الوشن Elution تخلیص پروتئین نو ترکیب بر میزان کارایی پروتئین خروجی از ستون کروماتوگرافی یونی نیکل. ب) آنالیز SDS-PAGE پروتئین های خروجی از ستون کروماتوگرافی نیکل تحت شرایط pH های مختلف طی مرحله Elution فرایند تخلیص پروتئین نو ترکیب هدف. M: نمایانگر مارکر پروتئینی غیر رنگی استاندارد؛ EP4، EP5، EP6، EP7 و EP8 به ترتیب نشان دهنده ی الوشن های حاوی باند پروتئین نو ترکیب به اندازه ۳۴ کیلو دالتون تخلیص شده از مرحله الوشن فرایند تخلیص تحت اجزای بافری الوشن با pH برابر ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸. هر غلظت پروتئین از میانگین سه باند (سه تکرار) پروتئین مذکور با استفاده از نرم افزار ImageJ بر مبنای رگرسیون خطی محاسبه شده است. حروف متفاوت تغییرات معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد را نشان می دهد. علامت بادر نمودار نشان دهنده انحراف استاندارد (SD) است

**Figure 4.** A) Optimization of the different pH of buffer purification containing 8 M urea and 500 mM NaCL at elution step of recombinant protein on efficient rate of outcome protein by nickel ion-exchange chromatography column. B) SDS-PAGE analysis of obtained by nickel chromatography column under different pH in the elution step of target protein purification. M: unstained protein ladder; EP4, EP5, EP6, EP7 and EP8 representing the elution containing purified recombinant protein with 34 kDa in elution step of purification with elution buffer, respectively, which its pH was measured at 4, 5, 6, 7, and 8. Each protein concentration has calculated from three bands of an *omp* protein sample via ImageJ software based on linear regression. Different letters indicate significance at  $p < 0.05$ . Error bars indicate standard deviation (SD) in figure

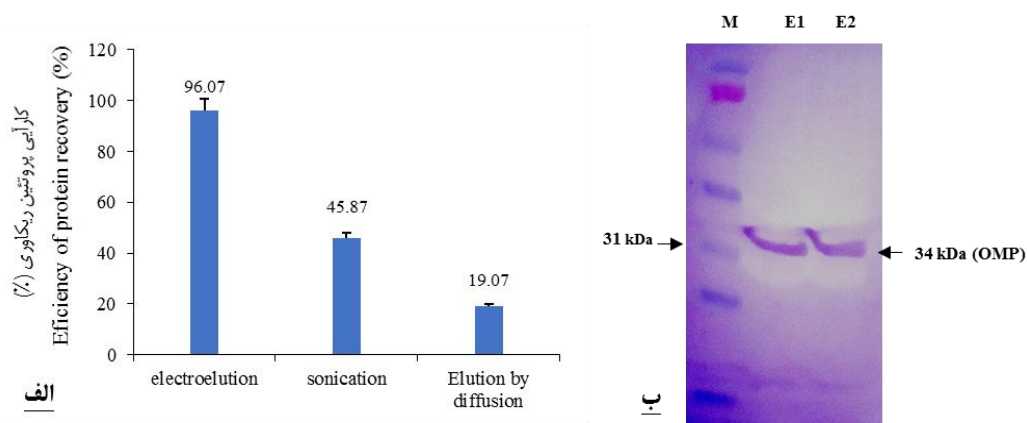
**بهینه سازی استخراج پروتئین از ژل پلی آگریل آمید: استخراج پروتئین از ژل الکتروفورز برای تهیه پروتئین کاملا خالص و به منظور تولید آنتی بادی انجام می شود.** از آنجا که نتایج حاصل از بهینه سازی تخلیص حاکی از وجود باند پروتئین هدف به همراه باندهای مزاحم مرتبط با پروتئین های باکتری میزبان داشت. بنابراین، جهت بدست آوردن تک باند اختصاصی پروتئین هدف از روش های بازیابی استفاده شد. کارایی و میزان پروتئین بدست آمده توسط آنالیز SDS-PAGE مقایسه قرار گرفت و سپس مساحت زیر پیک باند بدست آمده بر مبنای رگرسیون خطی توسط نرم افزار ImageJ محاسبه شد (شکل ۵ ب). نتایج نشان داد که هر سه روش قادر به ایزوله کردن باند مرتبط با پروتئین هدف به اندازه ۳۴ کیلو دالتون شدند (شکل ۵ الف). با بررسی کارایی بدست آمده از روش های استحصال، استنباط شد که کارایی روش الکتروالوژن بهتر از دو روش دیگر بود و قادر به بازیابی ۹۶ درصد از پروتئین هدف از ماتریکس ژل شده است. از اینرو، کارایی ۹۶/۰۷٪، ۴۵/۸۷٪ و ۱۹/۰۷٪ به ترتیب برای روش بازیابی الکتروالوژن، سونیکاسیون و شستشوی توسط انتشار بدست آمد (شکل ۶ الف). با وجود اینکه روش الکتروالوژن بهترین کارایی در استحصال پروتئین از ماتریکس ژل داشت اما آنالیز آن نشان داد که علاوه بر پروتئین اصلی حاوی چندین باند مرتبط با سایر پروتئین ها نیز هست. برای حذف این باندها، پروتئین استحصال شده توسط الکتروالوژن توسط ستون کروماتوگرافی تخلیص شدند. نتایج نشان داد که با اینکار باندهای مزاحم حذف شدند و پروتئین هدف تک باند بدست آمد هر چند مقدار آن از مقدار بازیابی شده کمتر بود (شکل ۵ الف؛ لاین PE). بعد از استحصال پروتئین هدف از ماتریکس ژل به منظور تایید ماهیت پروتئین هدف از آنالیز وسترن بلاتینگ استفاده شد. آنالیز وسترن بلات حضور پروتئین با باند مجزا با اندازه ۳۴ کیلودالتون متعلق به پروتئین هدف را تایید نمود (شکل ۶ ب).

**نتیجه گیری:** از آنجا که اینکلوژن بادی های حاوی پروتئین نوترکیب هدف و سایر پروتئین های آلوده می باشد، بنابراین، چندین روش برای بدست آوردن فرم فعال زیستی پروتئین هدف از حالت توده ای رسوب کرده، گزارش شده است. غلظت های بالای عوامل کاهشی اوره و گوانیدین هیدروکلراید به عنوان روش کاربردی جهت بدست آوردن فرم فعال پروتئین استفاده شده است (Yamaguchi and Miyazaki 2014). نتایج این تحقیق نشان داد که بهینه سازی تخلیص پروتئین *omp* با عامل کاهشی اوره به همراه نمک کلرید سدیم تحت شرایط pH خاص باعث افزایش کارایی بهتر خالص سازی تحت شرایط واسرشته شد و به دنبال آن تک باند پروتئین مربوطه از ماتریکس ژل توسط روش های الکتروالوژن و سونیکاسیون بطور موفقیت آمیزی بازیابی شد.



شکل ۵. الف) آنالیز SDS-PAGE پروتئین‌های *omp* استحصال شده از ماتریکس ژل توسط روشهای الکتروالوژن، سونیکاسیون و شستشوی توسط انتشار. ب) ارزیابی کمیت پروتئین‌های *omp* بدست آمده از روشهای استحصال پس از بار گذاری در ژل SDS-PAGE توسط نرم افزار آنالیز تصویری ImageJ. M: نمایانگر مارکر پروتئینی غیر رنگی استاندارد؛ BSA2 و BSA1: به ترتیب نشان دهنده پروتئین سرم گاوی با غلظت ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر؛ PE: پروتئین تخلیص شده حاصل از استحصال با روش الکتروالوژن توسط ستون کروماتوگرافی نیکل؛ E1 و E2: نشان دهنده پروتئینهای هدف استحصال شده توسط روش الکتروالوژن؛ S1 و S2: نشان دهنده پروتئینهای هدف بازبایی شده توسط روش سونیکاسیون؛ EL1 و EL2: نشان دهنده پروتئینهای هدف استحصال شده توسط روش شستشوی توسط انتشار؛ پیک پلاتهای مرتبط با شدت رنگ باندهای متعلق به هر چاهک در زیر پیک خودش با نام یکسان در شکل ب آورده شده است

Figure 5. A) The SDS-PAGE analysis of the *omp* protein recovered by electroelution, sonication, and elution by diffusion from gel matrix. B) The quantity evaluation of *omp* protein isolated by recovery methods after loading in SDS-PAGE gel via image processing by ImageJ software. M: unstained protein ladder; BSA1 and BSA2: representing the bovine serum albumin concentration at 500 and 750  $\mu\text{g/ml}$ ; PE: the purified *omp* protein by nickel chromatography column from protein recovered by electroelution method; E1-E2: target protein recovered by electroelution; S1-S2: target protein recovered by sonication method; EL1-EL2: target protein recovered by elution by diffusion method. The plot peak related to color intensity of the bands belonging to each well are given under its own peak with the same name in Figure B



شکل ۶. الف) بررسی کارایی روش‌های استحصال با الکتروالوشن، سونیکاسیون و شستشوی توسط انتشار بر ایزوله کردن پروتئین هدف از ماتریکس ژل SDS-PAGE. ب) آزمون وسترن بلائینگ جهت تایید حضور پروتئین هدف *omp* در نمونه‌های ایزوله شده توسط روش‌های استحصال به کمک آنتی بادی اولیه (mouse anti-His monoclonal) و ثانویه (goat anti-mouse polyclonal) متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز. M: نمایانگر مارکر پروتئینی رنگی استاندارد. E1 و E2: به ترتیب نشان دهنده پروتئین هدف جدا شده از ماتریکس ژل به روش الکتروالوشن و سونیکاسیون

**Figure 6. A) The efficiency of electroelution, sonication, and elution by diffusion recovery methods on isolating target protein from SDS-PAGE gel matrix. B) Western blotting analysis in order to confirm the *omp* target protein in samples isolated by recovery methods with using the primary antibody (mouse anti-His monoclonal) and secondary (goat anti-mouse polyclonal) conjugated to alkaline phosphatase. M: per-stained protein ladder; E1-E2: the recovered target protein by electroelution and sonication methods from gel matrix, respectively**

استفاده موفقیت‌آمیز از روش الکتروالوشن جهت بازیابی سایر پروتئین‌ها نظیر پروتئین میوگلوبین، آلبومین سرم گاوی، انولاز و تریپسینوژن گاوی از بین قطعات ژل گزارش شده است (Li et al. 2012). بنابراین، بهینه‌سازی مناسب تخلیص پروتئین و بدست آمدن فرم خالص آن با استفاده از روش‌های بازیابی این امکان را فراهم می‌آورد که ژن *omp* به عنوان یک ژن خارج غشایی باکتری عامل بیماری گرینینگ مرکبات از قابلیت بسیار بالایی در استفاده از آن به عنوان ایمونوژن جهت تولید آنتی‌بادی اختصاصی در برنامه‌های آتی برخوردار باشد.

**سپاسگزاری:** از سازمان امور دانشجویان کشور / مرکز فرصت مطالعات دانشجویی کشور به خاطر حمایت مالی در اجرای

پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## References

- Alibolandi, M, Mirzahoseini H (2001) Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int* Article ID 631607, 6 pages. doi:10.1155/2011/631607.
- Asenjo J, Andrews BA (2009) Protein purification using chromatography: Selection of type, modelling and optimization of operating conditions. *J Mol Recognit* 22(2), 65-76.
- Ausubel F, Brent R, Kingstone (1995) *Current protocols in molecular biology*. New York, Wiley Interscience.
- Babaie M (2020) Proteins separation and purification methods with focus on chromatography: A review study. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 20 (2), 151-175 (In Persian).
- Ballard J, Bryant A, Stevens D, Tweten RK (1992) Purification and characterization of the lethal toxin (alpha-toxin) of *Clostridium septicum*. *Infect Immun* 60, 784-790.
- Cellier G, Redondo, C, Cubero J et al. (2020) Comparison of the performance of the main real-time and conventional PCR detection tests for ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp., plant pathogenic bacteria causing the Huanglongbing disease in *Citrus* spp. *Eur J Plant Pathol*, <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02052-3>.
- Cho SH, Kil EJ, Cho S et al. (2020) Development of novel detection system for sweet potato leaf curl virus using recombinant scFv. *Sci Rep* 10, 8039.
- Dasari Venkata RK (2009) Cloning, high expression and purification of recombinant human interferon  $\beta$ -1b in *E. coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 158, 140-54.
- Duong-Ly KC, Gabelli SB (2014) Using ion exchange chromatography to purify a recombinantly expressed protein. *Meth Enzymol* 541, 95-103.
- Faghihi, M, Salehi M, Bagheri A, Izadpanah K (2009) First report of citrus huanglongbing disease on orange in Iran. *Plant Pathol* 58, 793 (Abstract).
- Gu Z, Zhu X, Ni S et al. (2003) Inhibition of aggregation by media selection, sample loading and elution in size exclusion chromatographic refolding of denatured bovine carbonic anhydrase B. *J Biochem Biophys Methods* 56, 165-175.
- Harrington MG (1990) Elution of protein from gels. *Meth. Enzymol* 182, 488-495.
- Hong Y, Luo Y, Yi J et al. (2019) Screening nested-PCR primer for ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing and application in Hunan, China. *PLoS ONE* 14 (2), e0212020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212020>.
- Jungbauer A, Hahn R (2009) Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol* 463, 349-71.
- Khushiramani R, Girisha SK, Karunasagar I (2007). Protective efficacy of recombinant OmpTS protein of *Aeromonas hydrophila* in Indian major carp. *Vaccine* 25, 1157-1158.

- Kurien BT, Scofield RH (2012) Extraction of proteins from gels-A brief review. *Methods Mol Biol* 869, 403-405.
- Kyte J, Doolittle R (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.
- Lei Z, Anand A, Mysore KS, Sumner LW (2007) Electroelution of intact proteins from SDS-PAGE gels and their subsequent MALDI-TOF MS analysis. *Methods Mol Biol* 355, 353-363.
- Li GQ, Shao J, Guo CG et al. (2012) A simple monolithic column electroelution for protein recovery from gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 430(1), 24-31.
- Llompart B, Llop-Tous I, Marzabal P et al. (2010) Protein production from recombinant protein bodies. *Process Biochem* 45, 1816-1820.
- Mahmood T, Yang PC (2012) Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 4(9), 429-434.
- Mirhosseini SA, Latifi AM, Hosseini HM et al. (2019) The efficient solubilization and refolding of recombinant organophosphorus hydrolyses inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *J Appl Biotechnol* 6(1), 20-25.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8, 4321-4325.
- Retamal CA, Thiebaut P, Alves EW (1999) Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal Biochem* 268,15-20.
- Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee KJ, Panda AK (2014) Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E. coli* into active tetrameric protein. *Front Microbiol* 15, 1-10.
- Vahid R, Mohammad H, Shakeri F et al. (2011) Anti *Clostridium septicum* alpha toxin antibody. *Journal of US-China Medical Science* 8(1), 40-45.
- Vallejo LF, Rinas U (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Factories* 3 (11), 1-12.
- Wang Y, van Oosterwijk N, Ali, AM (2017) A systematic protein refolding screen method using the DGR approach reveals that time and secondary TSA are essential variables. *Sci Rep* 9355, 1-10.
- Yamaguchi H, Miyazaki M (2014) Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* 4 (1), 235-251.