

کلونینگ، بیان ژن و تخلیص آنزیم *CEL I* اندونوکلئاز از گیاه کرفس

سولماز خلیق فرد^{۱*}، مژگان بنده پور^۲، وحید رضا یاسایی^۴، کاظم پریور^۱، بهرام کاظمی^۳

۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳ مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴ مرکز تحقیقات ژنومیکس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: آنزیم ICEL یک گلیکوپروتئین گیاهی است که از گیاهان دسته کرفس استخراج می شود و اولین آنزیم یوکاریوتی است که پیوند ناجور را با اختصاصیت بالا در یکی از دو رشته DNA برش می دهد. هدف از این پژوهش کلون کردن ژن، بیان و تخلیص آنزیم CEL I اندونوکلئاز و بررسی عملکرد آن بر روی ژن های جهش یافته در محیط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روش ها: در این تحقیق از گیاه کرفس mRNA استخراج شد و سپس RT-PCR صورت گرفت و محصول به عنوان الگو در تکثیر PCR مورد استفاده قرار گرفت. ژن در پلاسمید بیانی *pET32a* ساب کلون شد و درون باکتری *E. coli* سویه *plysS* (*BL2I(DE₃)*) ترانسفورم گردید. پروموتور ژن با IPTG القا شد و با وسترن بلاتینگ مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین با ستون کروماتوگرافی تمایلی (His.Tag/S.Tag) تخلیص شد. همچنین فعالیت اندونوکلئازی آنزیم روی محصول PCR ژن جهش یافته و نرمال در حال بررسی می باشد.

یافته ها: کلونینگ ژن با موفقیت انجام شد، پروتئین نوترکیب تخلیص شد و نتایج اولیه نشان دادند که آنزیم می تواند نواحی هترودوبلکس ژن را شناسایی کند.

نتیجه گیری: آنزیم CEL I نوترکیب می تواند نواحی هترودوبلکس راشناسایی نماید.

کلمات کلیدی: آنزیم CEL I اندونوکلئاز، وسترن بلاتینگ، پلاسمید pET32a، پروتئین نوترکیب، کروماتوگرافی تمایلی

مقدمه

در طی بررسی های انجام شده مشخص گردیده است آنزیم *CEL I* که از گیاه کرفس استخراج می شود جهش هایی را که بصورت هترودوبلکس می باشند می تواند شناسایی کند. در مطالعه انجام شده، اصول و روش های گوناگونی برای شناسایی جهش و عوامل آن وجود دارد که می توان برای طراحی روش های جدید از آن ها استفاده کرد. یک رویکرد خاص استفاده از آنزیم *CEL I* نوکلئاز در orthologs نشان دهنده ویژگی بالا برای همه پیوندهای ناجور بوده و روش آسان و قوی به نظر می رسند (۱۱). در گذشته چندین روش برای کشف جهش ها و پلی مورفیسم ها در ژن ها بکار رفته اند که بیشتر آنها مقرون به صرفه نمی باشند (۱۷)

با توجه به اهمیت شناسایی جهش های ژنی در سال های اخیر، دانشمندان به فکر پیدا کردن تکنیک هایی برای شناسایی آن ها پرداختند. یکی از تکنیک ها استفاده از آنزیم های محدودکننده می باشد اما این آنزیم ها ترادف های خاصی را روی ژنوم شناسایی و هضم می کنند که فقط برای جهش های شناخته شده، با در نظر گرفتن ترادف قابل استفاده هستند.

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
Email: skhalighfard96@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۰۳
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۷/۱۲

در سال ۱۹۷۶ محققان نوکلئازهای S_1 ، P_1 و Nuclease Mung bean را شناختند. این آنزیم ها در PH اسیدی فعالیت می کنند و مانند سایر نوکلئازهای RNase و DNase دارای عملکرد بیولوژیک می باشند و برای فعالیت خود به یون Zn^{2+} نیاز دارند. محققان در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۰ نشان داده اند، آنزیم *CEL I* یک مانوزیل گلیکوپروتئین است که مولکول DNA را از جایگاه ۳ تک نوکلئوتید جهش یافته برش می دهد. همچنین آنزیم *CEL I*، در تحقیق آشکارسازی جهش ها تاثیرات مفید وسیعی را فراهم آورده است. آنزیم *CEL I*، ۱۰۰٪ توالی های متغیر موجود را می تواند کشف کند، که این توالی ها شامل دگرگونی های نادرست و وارونگی ها و حذف ها می باشند (۳). آنزیم *CEL I* برای کاربردهای ژنوتیپینگ مناسب است و همه سکانس های حاوی پیوند ناجور^۱ را ترجیحاً شکاف می دهد و برای شناسایی هترودوپلکس های DNA استفاده می شود (۵ و ۶). استفاده از آنزیم *CEL I* روشی برای کشف موتاژنها و پلی مورفیسم های ژن BRCA1 می باشد. اندونوکلئاز های شبیه *CEL I* در جوانه یونجه، اسفناج، کرفس و گوجه فرنگی یافت شده اند این آنالیزها نشان می دهد که آنزیم *CEL I* در عمل اولویتی برای بازهای G>A>C>T دارد. در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که پروتئین نوترکیب تولید شده *CEL I/pPIC9* در *P.pastoris*^۲ جرم مولکولی بالاتری نسبت به پروتئین طبیعی داشته و ممکن است به علت هایپرگلیکوزیلاسیون^۳ و یا تغییرات پس از ترجمه باشد. دیگر پروتئین های نوترکیب تولید شده در *P. pastoris* همچنین دارای جرم مولکولی بالاتری نسبت به حالت طبیعی پروتئین نشان دادند (۴ و ۷). که به درجه بالای از N - گلیکوزیلاسیون نسبت داده شده است. شایع است که این پروتئین ها ۵۰ - ۱۰۰ α - (۱،۶) - مانوز، گلیکوزیله با انشعابات کوتاه α - (۱،۲) - مانوز انتهایی را تحمل می کنند واز سوی دیگر، امکان پیدا کردن انتهاهای کوتاه الیگوساکاریدی O - گلیکوزیلاسیون را که می تواند با نصف پروتئین پیوند دهند، جرم مولکولی بالاتری از حالت طبیعی پروتئین نشان می دهند (۲). یانگ و همکارانش در سال (۲۰۰۰)، آنزیم *CEL I* را از عصاره گیاه کرفس خالص سازی کردند و توالی mRNA ی کد کننده آن را نیز کلون نمودند (۱).

در سال ۱۹۷۶ محققان نوکلئازهای S_1 ، P_1 و Nuclease Mung bean را شناختند. این آنزیم ها در PH اسیدی فعالیت می کنند و مانند سایر نوکلئازهای RNase و DNase دارای عملکرد بیولوژیک می باشند و برای فعالیت خود به یون Zn^{2+} نیاز دارند. محققان در سال های ۱۹۹۸ و ۲۰۰۰ نشان داده اند، آنزیم *CEL I* یک مانوزیل گلیکوپروتئین است که مولکول DNA را از جایگاه ۳ تک نوکلئوتید جهش یافته برش می دهد. همچنین آنزیم *CEL I*، در تحقیق آشکارسازی جهش ها تاثیرات مفید وسیعی را فراهم آورده است. آنزیم *CEL I*، ۱۰۰٪ توالی های متغیر موجود را می تواند کشف کند، که این توالی ها شامل دگرگونی های نادرست و وارونگی ها و حذف ها می باشند (۳). آنزیم *CEL I* برای کاربردهای ژنوتیپینگ مناسب است و همه سکانس های حاوی پیوند ناجور^۱ را ترجیحاً شکاف می دهد و برای شناسایی هترودوپلکس های DNA استفاده می شود (۵ و ۶). استفاده از آنزیم *CEL I* روشی برای کشف موتاژنها و پلی مورفیسم های ژن BRCA1 می باشد. اندونوکلئاز های شبیه *CEL I* در جوانه یونجه، اسفناج، کرفس و گوجه فرنگی یافت شده اند این آنالیزها نشان می دهد که آنزیم *CEL I* در عمل اولویتی برای بازهای G>A>C>T دارد. در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که پروتئین نوترکیب تولید شده *CEL I/pPIC9* در *P.pastoris*^۲ جرم مولکولی بالاتری نسبت به پروتئین طبیعی داشته و ممکن است به علت هایپرگلیکوزیلاسیون^۳ و یا تغییرات پس از ترجمه باشد. دیگر پروتئین های نوترکیب تولید شده در *P. pastoris* همچنین دارای جرم مولکولی بالاتری نسبت به حالت طبیعی پروتئین نشان دادند (۴ و ۷). که به درجه بالای از N - گلیکوزیلاسیون نسبت داده شده است. شایع است که این پروتئین ها ۵۰ - ۱۰۰ α - (۱،۶) - مانوز، گلیکوزیله با انشعابات کوتاه α - (۱،۲) - مانوز انتهایی را تحمل می کنند واز سوی دیگر، امکان پیدا کردن انتهاهای کوتاه الیگوساکاریدی O - گلیکوزیلاسیون را که می تواند با نصف پروتئین پیوند دهند، جرم مولکولی بالاتری از حالت طبیعی پروتئین نشان می دهند (۲). یانگ و همکارانش در سال (۲۰۰۰)، آنزیم *CEL I* را از عصاره گیاه کرفس خالص سازی کردند و توالی mRNA ی کد کننده آن را نیز کلون نمودند (۱).

در این تحقیق از گیاه کرفس mRNA استخراج شد و سپس

مواد و روش ها

تکه کوچکی از ساقه گیاه کرفس^۴ در زیر هود به قطعات ریز در آورده شد و داخل میکروتیوپ ۱/۵ ml استریل ریخته شد. و با استفاده از (RNase pulsed lysis Buffer) و کلروفورم mRNA ان استخراج شد بر اساس ترادف ژن *CEL I* در بانک ژنی دو پرایمر برای تکثیر آن طراحی و سنتز گردید که جایگاه آنزیمی آن در بالادست و پایین دست پرایمرها خارج از جایگاه ژن *CEL I* طراحی شد.

توالی توالی پرایمر بالادست دارای جایگاه برش برای آنزیم BamHI :

5'-GGATCCATGACGCGATTATATTCTG-3'

توالی پرایمر پایین دست دارای جایگاه برش برای آنزیم *SacI*:

5'-GAGCTCTCATGCCAAAGAATGATCT-3'

با واکنش RT-PCR به کمک آنزیم نسخه بردار معکوس cDNA آن سنتز شد. برای تهیه cDNA مواد زیر در یک میکروتیوپ ۱/۵ ml ریخته شد:

- 1 - Mismatch
- 2 - *Pichia pastoris*
- 3 - hyperglycosis
- 4- *Apium graveolens*

کلونینگ ژن *CEL I* در وکتور pTZ57R :

محصول PCR توسط کیت استخراج DNA از روی ژل تخلیص شد. محصول PCR خالص شده مطابق با دستور العمل T/A Cloning (فرمنتاز) در وکتور pTZ57R کلون شد. سلول مستعد *E. coli* سویه *Top10* با استفاده از روش بیوشیمیایی کلرید کلسیم تهیه شد و وکتور نو ترکیب درون آن ترانسفرم و روی پلیت حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند. صحت کلونینگ با استفاده از PCR ژن *CEL I* و هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیم های *BamHI, SacI* (شرکت فرمنتاز) و همچنین توسط آنزیم تاییدی *Ksp221(BclI)* که روی پلاسمید جایگاه شناسایی ندارد ولی ژن *CEL I* را برش میدهد انجام گرفت (۸).

ساب کلونینگ ژن *CEL I* در وکتور بیانی pET32a

وکتور نو ترکیب pTZ57R/*CEL I* با آنزیم های *BamHI, SacI* هضم شد و ژن جدا شده از آن در وکتور بیانی pET32a(+) هضم شده با آنزیم های مذکور ساب کلون و در سلول های مستعد *E. coli* سویه *BL2I(DE3)* ترانسفورم گردید و روی پلیت حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. مانند قبل کلونینگ ژن تایید شد. صحت ساب کلونینگ با استفاده از PCR ژن *CEL I* و هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیم های *BamHI, SacI* (شرکت فرمنتاز) و همچنین توسط آنزیم تاییدی *PctI (BsmI)* که روی پلاسمید جایگاه شناسایی ندارد ولی ژن *CEL I* را برش میدهد انجام گرفت (۸).

ساب کلونینگ ژن *CEL I* در وکتور بیانی pET32a

وکتور نو ترکیب pTZ57R/*CEL I* با آنزیم های *BamHI, SacI* هضم شد و ژن جدا شده از آن در وکتور بیانی pET32a (+) هضم شده با آنزیم های مذکور ساب کلون و در سلول های مستعد *E. coli* سویه *BL2I(DE3)* ترانسفورم گردید و روی پلیت حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. مانند قبل کلونینگ ژن تایید شد. صحت ساب کلونینگ با استفاده از PCR ژن *CEL I* و هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب توسط آنزیم های *BamHI, SacI* (شرکت فرمنتاز) و همچنین توسط آنزیم تاییدی *PctI(BsmI)* که روی پلاسمید جایگاه شناسایی ندارد ولی ژن *CEL I* را برش می دهد انجام گرفت (۸).

بیان ژن *CEL I* و تایید آن

کشت شبانه با یک کلنی حاوی پلاسمید نو ترکیب انجام گرفت و

جدول ۱- برنامه انجام واکنش RT-PCR برای تولید cDNA

M-Mulv Buffer	(1x) 1μ4
dNTP(10 mm)	(0.3mM) 1μ5/0
primer (oligo dt)	(40pmol) 1μ1
RNA	(1μg) 1μ10
Reverse transcriptase	(100 unit) 1μ5/0
DEPC-Treated Water(to10μl)	1μ4
Total valume	1μ20

واکنش به حجم 120μ رسانده و واکنش PCR در ادامه انجام شد. برای تهیه PCR مواد زیر در یک میکروتیوپ 0.5 ml ریخته شد:

جدول ۲- برنامه انجام واکنش PCR برای تولید DNA

cDNA(0.5-1μg)	1μl
dNTP (10mM)	0/5μl(0.3mM)
MgCl ₂ (50mM)	1μl(1.5 mM)
Primers (work)	2μl(40pmol)
Buffer PCR10x	3μl(1x)
Taq DNA polymerase	0/25μl(1 unit/ML)
D.W.	up to 30μl

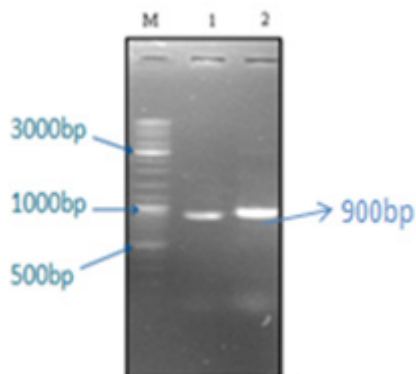
واکنش PCR انجام شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد. اساس نشانگر اندازه ۱۰ کیلوبازی GeneRuler 10 kb DNA ladder تخمین زده شد (۸).

جدول ۳- برنامه انجام واکنش PCR برای تکثیر ژن *CEL I*

Initial Denaturation	5 minutes	94°C	once
Denaturation	30 seconds	94°C	30cycle
Annealing	40 seconds	58°C	
Extension	1 minutes	72°C	
Final extension	5 minutes	72°C	once

یافته ها

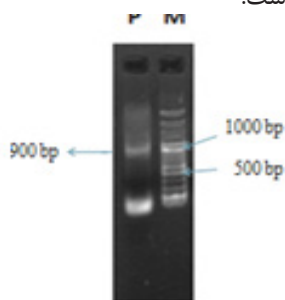
واکنش PCR: تحت شرایط اپتیموم واکنش PCR از cDNA تهیه شده از گیاه کرفس انجام شد یک باند حدوداً ۹۰۰ جفت نوکلئوتید روی ژل مشاهده شد (شکل ۱).



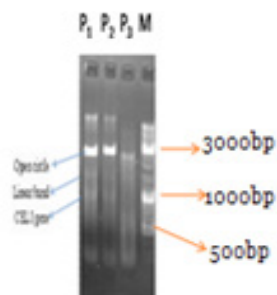
شکل ۱- M: مارکر DNA با اندازه ۱۰ هزار جفت باز،
۲: نشاندهنده محصول PCR ژن *CEL1* به طول ۹۰۰ bp.

تایید صحت کلونینگ و ساب کلونینگ

الگوی الکتروفورزی محصول PCR از وکتور نوترکیب *pTZ57R/CEL1* در شکل ۲ و برش آنزیمی وکتور نوترکیب در شکل ۳ و برش آنزیمی تاییدی روی وکتور نوترکیب در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۲- M: مارکر DNA با اندازه ۳ هزار جفت باز،
P: محصول PCR پلاسمید نوترکیب *pTZ57R/CEL1*



شکل ۳- P₃: پلاسمید نوترکیب بدون تاثیر آنزیم

روز بعد مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آن به ۱۰ سی سی محیط کشت جدید تلقیح شد ($OD_{600}=0.6$) پروموتور ژن با اضافه کردن ۱/۵ میلی مولار IPTG (ایزوپروپیل ۱-D-β-تیوگالاکتوپیرانوزید) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۵ ساعت القا شد. قبل از القا نمونه برداشته شد و چند ساعت بعد نیز نمونه گیری انجام شد (۹ و ۱۰).

انجام SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ

نمونه ها تحت شرایط دناتوره در کنار نشانگر پروتئینی روی ژل پلی آکریل آمید با غلظت ۱۲٪ باندهای پروتئینی روی غشاء نیتروسولوزی انتقال داده شدند. غشاء با محلول TBS1X به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر با rpm ۲۰۰ شستشو داده شد این مرحله دو بار تکرار شد. غشاء به ظرف مخصوص حاوی محلول Blocking منتقل شد و مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد روی شیکر قرار گرفت و مجدداً غشاء طبق پروتوکول مربوطه شستشو داده شد و به ظرف حاوی آنتی بادی کنژوگه اختصاصی His.Tag منتقل شد و به مدت دو ساعت در شیکر با سرعت rpm ۸۰ قرار گرفت. و ۵ دفعه با محلول TBST 1X با سرعت rpm ۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر شستشو داده شد و باند پروتئین با افزودن سوپسترا ظاهر شد (۱۰).

تخلیص پروتئین نوترکیب

نمونه های باکتری جمع آوری شده با بافر لیز کننده مخلوط شده و سپس با سونیکاسیون به مدت ۵ ثانیه با قدرت ۶۰ در حدود ۲۰ بار (هرکدام شامل ۳۰ ثانیه سونیکاسیون شکسته شدند. محلول به دست آمده بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و محلول (روبی) شفاف به دست آمده با ستون کروماتوگرافی (Ni-NTA/His Bind Resin) پروتئین نوترکیب تخلیص شد. برای وسترن از بافر آلکالین فسفاتاز سوپسترا ($20NB^{1}/BCIP^{2}$) و دامینوبنزامین و پراکسید هیدروژن (DAB_2^3/H_2O) استفاده شد. در ادامه این تحقیق به بررسی عملکرد آنزیم نو ترکیب *CEL1* با آنزیم طبیعی آن پرداخته شده است که هنوز در مراحل اولیه بررسی است.

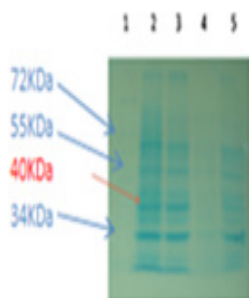
1 Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

2 Nitro blue tetrazolium chloride

3 Di Amino Benzidine

بیان پروتئین CEL1

پس از القای پریموتور و نمونه برداری در زمان های مختلف نمونه ها روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند. در شکل ۷ باند پروتئینی در ناحیه ۴۰ کیلو دالتون را نشان می دهد. در شکل ۸ وسترن بلاتینگ با آنتی بادی علیه His.Tag را نشان می دهد.



شکل ۷- ستون ۱: مارکر مخصوص SDS-PAGE.

ستون ۲: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب در پنج ساعت بعد از القا
ستون ۳: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب در سه ساعت بعد از القا
ستون ۴: لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید نوترکیب در زمان صفر
ستون ۵: لیز سلول باکتریایی فاقد پلاسمید نوترکیب.



شکل ۸- ۱ و ۲: بیان ژن CEL1.

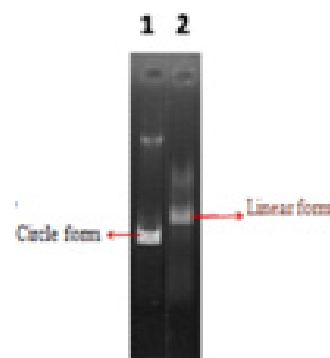
۳: نمونه سلولی BL2I فاقد پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل منفی.

کروماتوگرام مربوط به خالص سازی پروتئین CEL1 در شکل ۹ مشاهده می شود. شکل ۱۰ الگوی الکتروفورز پروتئین خالص شده CEL1 را روی ژل SDS-PAGE نشان می دهد. شکل ۱۰ نتیجه وسترن بلات از پروتئین نوترکیب در سلول القا شده را نشان می دهد.

P₂: هضم آنزیمی با آنزیم های محدودگر BamHI / SacI

P₁: هضم آنزیمی با آنزیم های محدودگر BamHI / SacI

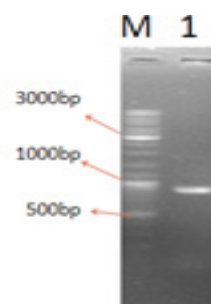
M: مارکر DNA با اندازه ۱۰ هزار جفت باز



شکل ۴- ۱: پلاسمید نوترکیب بدون تاثیر آنزیم.

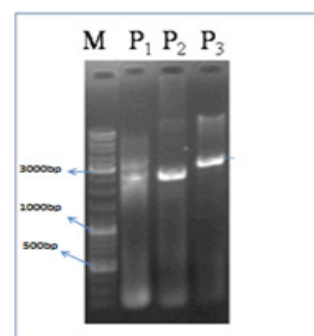
۲: هضم آنزیمی با آنزیم محدودگر Ksp22I(BclII)

شکل ۵ الگوی الکتروفورزی PCR مربوط به وکتور pET32a/ CEL1 و شکل ۶ الگوی برش آنزیم برای تایید وکتور نوترکیب را نشان می دهد.



شکل ۵- M: مارکر DNA با اندازه ۱۰ هزار جفت باز.

۱: محصول PCR پلاسمید نوترکیب pET32a/CEL1.



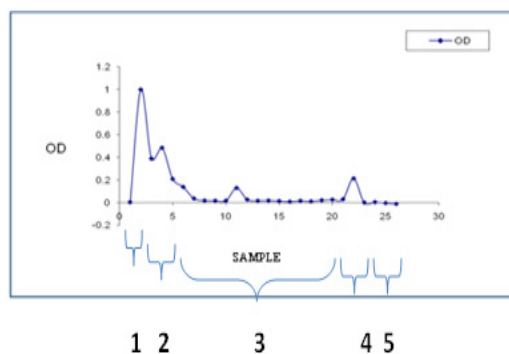
شکل ۶- M: مارکر DNA با اندازه ۱۰ هزار جفت باز.

P₁: پلاسمید نوترکیب بدون تاثیر آنزیم، P₂: پلاسمید نوترکیب بدون

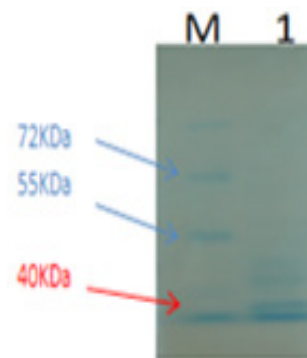
تاثیر آنزیم، P₃: هضم آنزیمی با آنزیم محدودگر PctI(BsmI)

بحث

تکنیک های متعددی برای آشکارسازی جهش های تک نوکلئوتیدی ابداع گردیده است که هر یک با قابلیت های خاص خود برای آشکارسازی این جهش ها در توالی های ژنومی مورد استفاده قرار می گیرند. معذالک، آنچه که در این زمینه بسیار مطلوب خواهد بود، وجود تکنیکی است که علاوه بر قابلیت بکارگیری در زمینه های تحقیقاتی مختلف، کم هزینه و نیازمند به امکانات آزمایشگاهی کمتر بوده و بتوان آنرا بطور گسترده برای غربال کردن ژنوم مورد استفاده قرار داد. تحقیقات گذشته مشخص نموده است که آنزیم *CEL I* می تواند جهش های ناجور را در ژنوم شناسایی کرده و برش دهد و علاوه بر اینکه بر روی تک رشته ها موثر است روی دو رشته ها هم می تواند موثر باشد و همانند یک اندونوکلئاز عمل کند (۶). ویژگی های ارزشمند فعالیت آنزیمی *CEL I* سبب شده است که روش آنالیز هترودوپلکس مبتنی بر آن از جمله ساده ترین و موثرترین روش های شناسایی مکان جهش های تک نوکلئوتیدی در مولکول های DNA محسوب شود. فعالیت آنزیمی *CEL I* را اولین بار اولیکوسکی و همکارانش در گیاه کرفس کشف کردند (۶). این آنزیم انتهای ۳' لوپ تشکیل شده در مناطق هترودوپلکس قطعات DNA را برش می دهد و قابلیت منحصر بفردی، که آن را از سایر آنزیم های مشابه نظیر نوکلئاز S_1 و نوکلئاز P_1 متمایز می نماید، فعالیت بسیار مطلوب در شرایط آزمایشگاه در محدوده pH خنثی است (۱۳). این آنزیم یک گلیکو پروتئین با گروه گلیکوزیدی مانوزیل است که در حضور Zn^{+2} و Mg^{+2} از فعالیت بسیار مطلوب در محدوده pH= 5/5-9 برخوردار می باشد. با کشف این آنزیم ارزشمند، اولیکوسکی و همکاران توانستند روش آنالیز هترودوپلکس را ارتقاء داده و بعنوان تکنیکی ساده، ارزان و موثر برای شناسایی و آشکارسازی جهش های تک نوکلئوتیدی (SNP) در مولکول های DNA مطرح نمایند (۱). تکنیک آنالیز هترودوپلکس مبتنی بر *CEL I*، روشی بسیار ساده، کم هزینه، سریع و حساس برای آشکارسازی جهش های تک نوکلئوتیدی بوده و از جنبه های کاربردی و تحقیقاتی بسیار گسترده ای برخوردار می باشد (۱۱). دسترسی به آنزیم اندونوکلئاز *CEL I* راه گشای بسیاری از تحقیقات مبتنی بر شناسایی SNP برای محققان



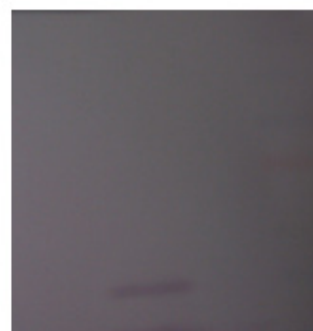
شکل ۹- بخش ۱: washing اولیه که از ستون عبور داده شد قبل از flow through، بخش ۲: جمع آوری flow through از ستون، بخش ۳: washing بعد از flow through که معمولا ۱۰ برابر حجم رزین ستون است، بخش ۴: جمع آوری Eluting بعد از washing، بخش ۵: washing بعد از Eluting.



شکل ۱۰- ستون M: مارکر مخصوص SDS-PAGE.

ستون ۱: بعد از تخلیص با کروماتوگرافی تمایلی.

4 3 2 1



شکل ۱۱- ۱: مارکر مخصوص وسترن بلائینگ.

۲: Flowthroy جمع آوری بعد از Eluting، ۳: پروتئین *CEL I* خالص شده که با استون رسوب گیری شده، ۴: نمونه سلولی BL2I فاقد پلاسمید نوترکیب به عنوان کنترل منفی.

بیولوژی مولکولی خواهد بود. اگر چه فعالیت آنزیمی شبیه به *CEL I* منحصر به گیاه کرفس نمی باشد و این فعالیت آنزیمی در بسیاری از گیاهان مشاهده می شود، بدلیل بروز بسیار بارز این فعالیت در گیاه کرفس، این گیاه بعنوان منبع آنزیم مزبور شناخته می شود (۶). در مطالعات گذشته میزان بیان ژن *CEL I* در ۱۲ نمونه گیاهی شامل ۷ رقم کرفس و ۵ گونه خویشاوند آن با استفاده از روش مقایسه نیمه کمی RT-PCR بررسی و مقایسه شد. اگرچه دو رقم کرفس GSB و ویکتوریا بیان کمتری را نسبت به دیگر ارقام نشان دادند، معذالک تفاوت بیان آنزیم موردنظر در بین ارقام مختلف کرفس چندان قابل ملاحظه نبود (۱۴). محققان در سال (۲۰۰۴) به مطالعه در زمینه کلون کردن آنزیم *CEL I* از گیاه توت فرنگی پرداختند. در این تحقیق وکتور بیانی که استفاده شده *pET28a* بود و سیستم بیانی آن *P.pastoris* بود (۱۲). محققان در سال (۲۰۰۷) به مطالعه جهش های نقطه ای ایجاد شده با عوامل جهش زا شیمیایی در روی گونه های مختلف گیاهی پرداختند. در این راه از یک تکنولوژی به نام TILLIN کمک گرفتند. این تکنیک یک راه سریع و ارزان قیمت برای شناسایی جهش های نقطه ای است. مزیت دیگر این تکنیک وابسته نبودن به طول ژنوم است. در این مطالعه آنزیم *CEL I* را روی چندین گونه گیاهی {حالت های آلوهرگزاپلوئید یا دیپلوئید} اثر دادند و مشاهده کردند که آنزیم *CEL I* روی جهش های هترودوپلکس و همودوپلکس اثر دارد (۱۸). همچنین نوع نو ترکیب این آنزیم با عصاره خالص شده آن هر دو دارای عملکرد یکسان بودند و آنزیم *CEL I* قادر به شناسایی جهش های تک نوکلئوتیدی هترودوپلکس و همودوپلکس بود (۱۶). آنزیم *CEL I* یک فاکتور مفید برای شناسایی جهش های تک نوکلئوتیدی به شمار می رود. وزن مولکولی آن ۴۰ کیلو دالتون و اندازه ژن آن ۹۰۰ جفت باز و حاوی ۳۰۰ اسید آمینه است. با توجه به نقش این پروتئین در مکانیزم شناسایی جهش های تک نوکلئوتیدی در مطالعات متعدد گزارش شده، امید زیادی به استفاده از این پروتئین در شناسایی جهش های تک نوکلئوتیدی هترودوپلکس و همودوپلکس است. با توجه به اهمیت پروتئین در شناسایی موتان، تمام طول ژن تکثیر و کلون شد. به طور کلی هدف از تحقیق انجام شده کلون کردن ژن *CEL I* و بیان و تخلیص پروتئین *CEL I* و بررسی عملکرد آنزیم نو ترکیب *CEL I*

I در شرایط آزمایشگاه بود. برای این کار از گیاه کرفس به عنوان نمونه استفاده شد. استخراج *CEL I* mRNA از این گونه گیاهی انجام گرفت. پس از تهیه mRNA جهت سنتز cDNA واکنش RT-PCR گذاشته شد. برای تهیه cDNA از پرایمرهای oligo dt استفاده شد. همچنین استخراج پلاسمید به روش دستی لیز قلیایی براساس پروتکل صورت گرفت. ژن *CEL I* با موفقیت کلون گردید. تایید صحت کلونینگ و ساب کلونینگ با استفاده از PCR ژن *CEL I* و هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های طراحی شده درون سکانس پرایمرها و همچنین آنزیم تاییدی Ksp22I(BclII) که جایگاه برش بر روی ژن *CEL I* داشت و بر روی T وکتور نداشت مورد بررسی قرار گرفت. از جمله نکاتی که در این تحقیق حاضر باید به آن توجه می کردیم انتخاب نوع وکتورمان بود زیرا باید در نهایت وارد یک سلول میزبان می کردیم تا در آن بیان شود. وکتور pET32a وکتوری است که در این تحقیق حاضر استفاده شد. آنزیم *CEL I* از جمله گلیکوپروتئین های ترشحی در گیاه کرفس می باشد. براساس مطالعات انجام شده ساختار گلیکوپروتئینی این آنزیم نقشی در فعالیت آنزیمی آن ندارد و فقط باعث پایداری ساختار آنزیم می شود. به همین دلیل ما برای بررسی آن پروتئین در شرایط آزمایشگاهی از باکتری استفاده کردیم. از جمله خصوصیات وکتور مورد استفاده داشتن ژن *TixA* در داخل وکتور بود که دارای ۱۰۹ اسید آمینه است که این ژن با اتصال به ترکیبات انکلوژن بادی باعث محلول شدن پروتئین می شود و از این طریق باعث می شود پروتئین *CEL I* که در گیاه به صورت ترشحی و انکلوژن است با اتصال به این ژن به صورت محلول در داخل سلول باقی بماند و به بیرون ترشح نشود و برای بررسی آن از رسوب سلول استفاده شد. این وکتور دارای دو جایگاه His.Tag و یک جایگاه S.Tag و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بود. به منظور ایجاد انتهای چسبنده و تسهیل واکنش لیگاسیون در ساب کلونینگ، پرایمرهای دارای جایگاه برش برای آنزیم های محدودگر *BamHI*, *SacI* در دو انتهای ژن طراحی شدند. ژن مورد نظر در سیستم بیانی *pET* کلون شده و باکتری *E.coli* سویه *BL21(DE3)plysS* توسط وکتور نو ترکیب ترانسفورم شد و در اثر القا توسط IPTG بیان شد. در باکتری *E.coli* لاکتوز می تواند به آلولاکتوز تبدیل شود و IPTG آنالوگ

آن است که قادر به القای لاکتوز و پروموتورهای مشتق شده از آن برای بیان ژن مورد نظر است (۱۵). سپس الکتروفورز SDS-PAGE و تکنیک وسترن بلاتینگ انجام شد. برای وسترن از بافر آلكالین فسفاتاز سوبسترا (20NBT/BCIP) و دامینوبنزامین و پراکسید هیدروژن (DAB_2/H_2O) استفاده شد. به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب مورد نظر به دلیل دارا بودن His Tag از ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل استفاده شد. نمونه ها جمع آوری شد و در نهایت با کمک دستگاه کروماتوگرام غلظت پروتئین موجود در هر لوله به دست آمد و با کمک برنامه Excel نمودار رسم شد. سپس الکتروفورز SDS-PAGE و تکنیک وسترن بلاتینگ انجام شد. در ادامه تحقیق از عصاره خالص شده آنزیم *CEL I* از گیاه کرفس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. آنزیم نوترکیب *CEL I* و عصاره خالص شده بر روی محصول PCR ژنوم نرمال و ژنوم جهش یافته اثر داده شده اند که البته نتایج در دست بررسی می باشد.

نتیجه گیری

کلونینگ، ساب کلونینگ و بیان ژن *CEL I* با روش PCR، برش آنزیمی، تعیین توالی، آنزیم تاییدی، الکتروفورز SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ تایید می شود و تخلیص پروتئین نوترکیب توسط کروماتوگرافی تمایلی، الکتروفورز SDS-PAGE و تکنیک وسترن بلاتینگ تایید می شود. این پروتئین نوترکیب می تواند در جهت شناسایی جهش های تک نوکلئوتیدی در روی توالی ژنوم مورد استفاده قرار گیرد.

- (1) Yang B, Wen X, Kodali NS, Oleykowski CA, Miller CG, Kulinski J, Besack D, Yeung JA, Kowalski D, Yeung AT. Purification, Cloning, and Characterization of the CEL I Nuclease. *Biochemistry* 2000; 39: 3533-3541.
- (2) Bretthauer RK, Castellino FJ. Glycosylation of *Pichia pastoris* derived proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem* 1999; 30(3 pt): 193-200.
- (3) Desai NA, Shankar V. Single-strand-specific nucleases. *FEMS Microbiol. Rev* (2003); 26: 457-491.
- (4) Molhoj M, Ulvskov P, Dal Degan F. Characterization of a functional soluble form of a *Brassica napus* membrane-anchored endo-1,4-glucanase heterologously expressed in *Pichia pastoris*. *Plant Physiol* 2001; 127:674-684.
- (5) Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Chang DW, Yeung AT. Incision at nucleotide insertions/deletions and base pair mismatches by the SP nuclease of spinach. *Biochemistry* 1999; 38:2200-2205.
- (6) Oleykowski CA, Bronson Mullins CR, Godwin AK, Yeung TA. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res* 1998; 4597-4602.
- (7) Rotticci-Mulder JC, Gustavsson M, Holmquist M, Hult K, Martinele M. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida Antarctica* Lipase B and Lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Prot. Exp. Purif* 2001; 21:386-392.
- (8) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (9) Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ 1996. *Protein methods*. 2nd ed. New York: Wiley Liss.
- (10) Coligan J E, Dunn B M, Ploegh H L, Speicher D W, Wingfield P T 2007. *Current protocols in protein science*. New York: John Wiley and Sons.
- (11) McCallum, CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* (2000), 123: 439- 442.
- (12) Palomer X, Dominguez-Puigjaner E, Vendrell M, Llop-Tous I. Study of the strawberry CEL I endo- β -(1, 4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Plant Science* 2004; Pages 509-518.
- (13) Till B J, Burtner C, Comai L, Henikoff S. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases, *Nucleic Acids Res* (2004), 32(8): 2632-2641.
- (14) Zolala J, Bahrami AR, Farsi M, Matin MM, Yassae VR. Comparison of CEL I gene expression and mismatch cleavage activity in some apiaceae plant. *Springer Science + Business Media B.V* 2009; pp ;24:17-24
- (15) Shouchun C, Ying Z. Secretors expression and purification of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit and its application on intranasal vaccination of hantavirus. *Mol Biotechnol* 2009;41:91-8
- (16) Pimkin M, Caretti E, Canutescu A, Yeung JB, Cohn HC, Oleykowski Y C, Bellacosa A, Yeung AT. Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection. *BMC Biotechnology* 2007; pp: 7-29.
- (17) Gerard GF, Shandilya H, Qiu P, Shi YLo. Genetic variance detection using Surveyor nuclease. in *Genetic variance detection: technologies for pharmacogenomics* Edited by: Hecker KH. Eagleville, PA, USA, DNA Press, LLC 2006; pp: 95-129.
- (18) Silme RS, Cagirgan MI. TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) Technology for Plant Functional Genomics. *Journal of Applied Biological Sciences* 2007; 1(1): 77-80.