

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط کشت باکتری متعهد BL21 جهت تولید پروتئین نو ترکیب PEP

لادن یاری^{۱،۲}، کامران قاندى^{۱،۲*}، سمیه تنهایی^۲، فرزانه ربیعی^۲، محمد حسین نصر اصفهانی^{۳*}، سید مسعود هوشمند^۴، سید رسول ذاکر^۱، حسین بهاروند^{۴،۵}

- ۱- دانشگاه اصفهان - دانشکده علوم - گروه زیست شناسی - اصفهان - ایران
- ۲- پژوهشگاه رویان - پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - گروه مهندسی ژنتیک - اصفهان - ایران
- ۳- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - گروه زیست فناوری پزشکی - تهران - ایران
- ۴- دانشگاه علم و فرهنگ - دانشکده علوم - گروه زیست شناسی تکوینی - تهران - ایران
- ۵- پژوهشگاه رویان - پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - گروه سلولهای بنیادی و زیست شناسی تکوینی - تهران - ایران

چکیده

پس از گذر از تحقیقات ژنومی و وجود انبوهی از اطلاعات در بانک‌های ژنومی اینک دوران تحقیقات در زمینه پساژنومی و شناخت محصولات ژن‌ها، چگونگی ارتباط آنها با یکدیگر و شناخت مسیرهای داخل سلولی با ابزار توانمند پروتئومیکس است. هدف از این بررسی بهینه سازی شرایط لازم جهت تولید پروتئین نو ترکیب پراکسیزومی موشی (PEP) در سویه مناسب و مستعد شده از اشرشیاکلی به نام BL21 میباشد. پروتئین نو ترکیب PEP در مراحل بعدی خالص شده و به عنوان بخشی از مطالعات پروتئومیکسی برای شناسایی اجزاء سلولی واکنش دهنده با آن به کار خواهد رفت.

در این بررسی وکتور بیانی پروکاریوتی (pGEX6P2) که در آن cDNA PEP در مجاورت توالی کد کننده GST (کلوتاتیون ترانسفراز) قرار داده شده است، استفاده شد. سلولهای باکتریایی سویه BL21 بوسیله این وکتور بیانی ترانسفورم شدند. برای به دست آوردن بالاترین میزان بیان و حلالیت پروتئین، کشت سلولهای باکتریایی در محدوده دمایی ۳۷-۲۰ سانتی گراد ارزیابی شد. همچنین غلظت مناسب IPTG برای القاء بیان با بررسی محدوده ۱ تا ۱۰ میلی مولار صورت گرفت. پس از به دست آوردن بالاترین میزان بیان در گام بعدی لازم است پروتئین‌های درون سلولی آزاد شوند، بنابراین با استفاده از امواج اولتراسوند با قدرت‌ها و در زمان‌های متفاوت سلول‌ها لیز و سپس با افزودن شوینده NP40 یا Triton X-100 در غلظت‌های مختلف، پروتئین‌های محلول باکتریایی و پروتئین نو ترکیب بیان شده، آزاد شدند. بهینه ترین حالت برای بیان ژن و تولید پروتئین نو ترکیب PEP در دمای ۲۰ °C و غلظت ۱ μg/ml IPTG از ۱٪ (حجمی/حجمی) بکارگیری TritonX100 یا NP40 به عنوان شوینده‌های حلال غشایی به دست نیامد. هر چند که بهترین غلظت برای شوینده ۱٪ (حجمی/حجمی) مشخص شد.

واژگان کلیدی: پروتئومیکس؛ پروتئین پراکسیزومی (PEP)؛ پروتئین نو ترکیب؛ باکتری مستعد شده؛ IPTG

مقدمه

اسید آمینه‌ای است که کلونینگ آن در سال ۲۰۰۲ میلادی توسط Ferrer-Martinez صورت گرفت و در سال ۲۰۰۹ میلادی مجدداً توسط تنهایی و همکاران نیز در پژوهشکده رویان اصفهان کلون گردید (۱، ۲). انتهای کربوکسی ترمینال این پروتئین (اسید آمینه ۲۰۷ الی ۲۰۹) حاوی سیگنال هدایتی SKI که نوعی PTS1⁺ است، می‌باشد (۱، ۲).

ژن پراکسیزومال پروتئین موشی^۱ (PEP) کدکننده پروتئینی ۲۰۹

* دکتر کامران قاندى و دکتر محمد حسین نصر اصفهانی، PhD
پژوهشگاه رویان - پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی - مرکز تحقیقات علوم سلولی - گروه مهندسی ژنتیک - بلاک ۳۷۱ - کوچه شهید علیخانی - خیابان مهر - خیابان سلمان فارسی - اصفهان - ایران
تلفن: ۰۳۱۱-۲۶۱۳۹۰۰

پست الکترونیک: kamranghaedi@royaninstitute.org

mh_nasr@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱۷

1. Peroxisomal Protein
2. Peroxisomal Targeting Signal Type 1

شناسایی نقش آن در در مکانیسم ماهیچه و عصب زائی بسیار حائز اهمیت است. در بررسی برهم کنش‌های پروتئین با پروتئین یکی از کاربردی ترین روش‌ها اضافه کردن دنباله (tag) به پروتئین مورد مطالعه می‌باشد که امکان جداسازی اجزاء کمپلکس واکنشر با پروتئین دنباله دار را فراهم می‌کند و در نهایت شناسایی مجموعه برهم کنش کننده با آنالیز اسپکتروسکوپی حجمی انجام می‌شود. برای شناسایی پروتئین‌های دارای برهم‌کنش با PEP از سازه ژنی GST-PEP که در وکتور بیان شونده باکتریایی pGEX6p2 کلون شده بود استفاده گردید (۱۵). در پژوهش حاضر، شرایط بهینه تولید پروتئین نوترکیب GST-PEP با لحاظ کردن تغییرات در دمای کشت، غلظت القاء کننده IPTG، تعداد و قدرت امواج اولتراسوند و تغییر در نوع و غلظت شونده‌ها صورت گرفت. هدف از بهینه سازی تولید این پروتئین آن است که GST-PEP را از طریق روش کروماتوگرافی تمایلی با ذرات سفاروز متصل به گلوکاتیون خالص نموده و میان کنش آن با دیگر پروتئین‌ها را در مطالعات آتی مشخص نماییم. بدین وسیله نهایتاً نقش آن در مکانیسم ماهیچه و عصب زائی شناخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها:

تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد برای بیان پروتئین نوترکیب: باکتریهای اشرشیاکلی سویه BL21 از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه و سپس طبق روش کلسیم کلراید (۱۶) سلول‌های باکتریایی مستعد^۸ مناسب بیان پروتئین‌های نوترکیب تهیه شده و تا زمان استفاده در 70°C نگهداری شدند.

ترانسفورماسیون سلول‌های باکتریایی مستعد با وکتورهای pGEX6P2 و pGEX6P2/PEP:

سلول‌های باکتریایی مستعد با دو وکتور pGEX6P2 (Pharmacia) و pGEX6P2/PEP (۱۵) biotech) ترانسفورم شدند. بدین صورت که ۲ نانوگرم از هر کدام از پلاسمیدها با $50\ \mu\text{l}$ سلول‌های BL21 مخلوط و نیم ساعت روی یخ انکوبه شدند. پس از آن نمونه‌ها بلافاصله 45°C ثانیه در دمای 42°C در معرض شوک حرارتی قرار گرفتند. سپس

حضور این سیگنال هدایتی سبب انتقال پروتئین‌های پراکسیزومی به داخل ماتریکس اندامک پراکسیزوم می‌گردد (۳،۲). بررسی ترادف‌های اسید آمینه PEP نشان می‌دهد که هیچگونه مشابهتی بین این پروتئین و دیگر پروتئین‌ها وجود ندارد، تنها مورد استثناء مشابهت قسمتی از ساختمان PEP (اسید آمینه ۳۱ الی ۱۱۴) با دسته‌ای از پروتئین‌ها به نام گروه پروتئین‌های فیبرونکتین نوع ۳^۳ می‌باشد (۴،۱). گروه پروتئین‌های فیبرونکتین نوع ۳ گروه نامتجانسی از پروتئین‌های شامل گیرنده‌های سیتوکین^۴، مولکول‌های چسبنده^۵ و پروتئین‌های مربوط به ماهیچه می‌باشند. شباهت این گروه پروتئینی وجود دامنه فیبرونکتین نوع ۳ است که در ساختار ثانویه همه آن‌ها به یک صورت (زنجیره‌های β) می‌باشد. در دامنه فیبرونکتین نوع ۳، اسید آمینه‌های تریپتوفان، لوسین و تیروزین به صورت حفظ شده^۶ وجود دارند که در ساختار پروتئین PEP نیز به ترتیب اسید آمینه‌های Tyr98 و Trp51 Leu92 می‌باشند (۴-۱۰). به نظر می‌رسد حضور این دامنه در ساختمان PEP برای برهم‌کنش این پروتئین با پروتئین‌های دیگر و فعالیت آن لازم است (۲). این پروتئین همچنین دارای دو زنجیره آب‌گریز (اسیدهای آمینه ۱۲ الی ۳۱ و ۱۵۱ الی ۱۶۸) می‌باشد که اهمیت وجود آنها هنوز نامشخص است. مطالعات مربوط به حذف قطعات مختلف این ژن شامل زنجیره‌های آب‌گریز، دامنه فیبرونکتین نوع ۳ و سیگنال SKI نشان داد که جایگیری درون سلولی PEP درون پراکسیزومها منحصرآ مرتبط با وجود تری پپتید SKI در انتهای کربوکسی پروتئین می‌باشد (۱۲،۱۱). وجود مکان‌های احتمالی فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون نظیر اسید آمینه‌های ترئونین در جایگاه‌های ۳۸، ۱۳۷، ۱۲۱، ۸۳ و اسپارژین در جایگاه‌های ۳۶، ۸۱ حکایت از فسفریلاسیون و گلیکوزیلاسیون احتمالی این پروتئین دارد اما در این زمینه هنوز مطالعه‌ای صورت نگرفته است (۱ و ۲). امروزه ارتباط بین فعالیت پراکسیزوم‌ها و فرآیند رشد سلول‌های عصبی و میلینوژنز^۷ به خوبی شناخته شده است (۱۳). مشاهدات Ferrer-Martinez حاکی از بیان بالای ژن PEP در بافت‌های مرتبط با تحریکات عصبی نظیر قلب، ماهیچه‌های اسکلتی و مغز در موش بالغ می‌باشد (۱). در مطالعه دیگر توسط استاد شریف وهمکاران در پژوهشکده رویان نشان داده شد که در روند تمایز سلول‌های بنیادی موشی به عصب بیان این ژن افزایش چشمگیری دارد (۱۴). با این وجود هنوز نقش ژن PEP نامشخص می‌باشد، لذا لزوم مطالعات پروتئومیکسی و آنالیز برهم کنش‌های آن با دیگر پروتئین‌ها و در نهایت

3. Fibronectin Type III domain
4. Cytokine
5. Adhesion
6. Conserved
7. Myelinogenesis
8. Competent Cells

بهینه سازی غلظت القاء کننده:

بعد از تعیین بهینه دمای کشت، القاء کننده ایزوپروپیل D-β تیوگالاکتوزید (IPTG) برای بیان پروتئین نو ترکیب در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی مولار مورد بررسی قرار گرفت. و از دترجنت Triton X-100، ۰/۱٪ (v/v) طبق پروتکل (GST gene fusion system-Pharmacia) استفاده شد.

بهینه سازی نوع و غلظت دترجنت:

Triton X-100 و NP40 با غلظت‌های نهایی ۰/۱٪ و ۱٪ به بافر سونیکاسیون اضافه شده و سلولها پس از سونیکاسیون یک ساعت در این محلولها انکوبه شدند.

ارزیابی روند بهینه سازی به وسیله SDS-PAGE:

۲۰ μl سوپرناتانت تولید شده طی مراحل بهینه سازی دما، غلظت IPTG، قدرت اموج اولتراسوند و نوع و غلظت دترجنت و همچنین رسوب تولید شده در بهینه سازی دما، که در ۶۰۰ μl از محلول بافر سونیکاسیون سوسپانسیونه شده بود، با ۴ μl محلول ۵X Sample Buffer (Bio rad) مخلوط شده و این نمونه‌ها در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند تا پروتئین‌های موجود در آنها خطی شده و از یکدیگر جدا شدند. سپس نمونه‌ها در چاهک‌های ژل اکریلامید - بیس اکریلامید (که به صورت دو بخشی با غلظت‌های ۵٪ به عنوان بخش Stacking، که در آن همگی پروتئین‌های موجود در نمونه ردیف و در یک خط قرار می‌گیرند محل قرارگیری چاهک‌هاست و ۱۲٪ به عنوان بخش Resolving، که قسمتی از ژل است که در آن پروتئین‌ها بر اساس جرم شان از هم جدا می‌شوند) ریخته شدند. ژل‌ها ۱ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ در دستگاه (Mini Protean Tetra- Bio rad) الکتروفورز شدند. سپس ژل‌ها با کوماسی بلو رنگ آمیزی شده و باندهای پروتئینی از جمله GST و GST-PEP مشاهده و بررسی شدند.

تکنیک خالص سازی پروتئین از طریق گلوکوتایون - S - ترانسفرز:

محلول شفاف سوپرناتانت‌ها حاصل از تخریب باکتری‌های ترانسفورم شده مستقیماً با ماتریکس گلوکوتایون سفاروز (Bio-World) مجاور گردید. بدین صورت که به هر کدام از نمونه‌ها میزان ۱۵ μl سوسپانسیون ۵۰٪ گلوکوتایون سفاروز را که از قبل سه بار با بافر سونیکاسیون شستشو یافته بود، اضافه گردید و بمدت ۱۴-۱۶ ساعت در دمای ۴°C در یخچال تحت روتاسیون قرار گرفت. نمونه‌ها را با دور ۷۰۰۰ rpm

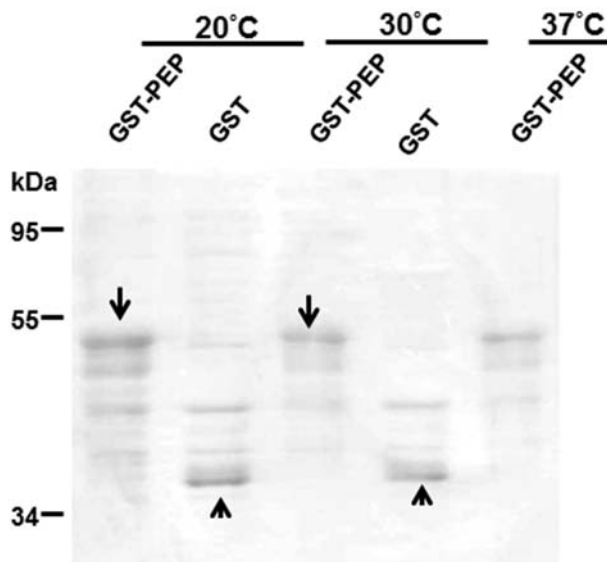
به آنها ۲۵۰ μl محیط SOC (۱۶) افزوده و یک ساعت در دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C و دور ۲۲۵ rpm قرار گرفتند. ۵۰ μl از هر نمونه روی محیط کشت 2YT حاوی آمپی سیلین (۱۶) کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷°C پس از ۱۶ ساعت کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمیدهای فوق رشد نمودند.

بررسی شرایط بهینه برای تولید پروتئین نو ترکیب:

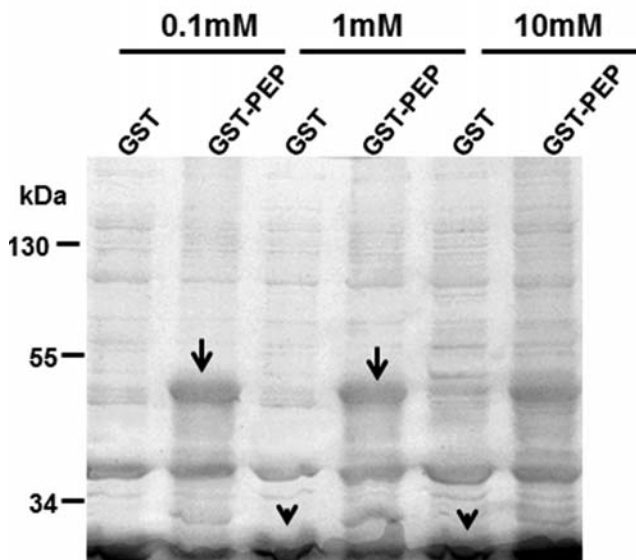
در تمامی مراحل بهینه سازی ۲ μl از هر نمونه باکتری ترانسفورم شده به ۵ ml از محیط 2YT مایع حاوی آمپی سیلین افزوده شد و ۱۴ ساعت در دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷°C با دور ۲۲۵ rpm قرار گرفت. بعد از این مدت از هر لوله ۴ μl به لوله‌های ۵ ml محیط 2YT افزوده شده و در ۲۰°C تا رسیدن جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ nm به میزان ۰/۶ تا ۰/۸ که محدوده رشد لگاریتمی باکتری است، انکوبه شدند. سپس برای القاء تولید پروتئین نو ترکیب ایزوپروپیل تیوگالاکتوزیداز (Sigma) (IPTG) به هر لوله افزوده شده و سپس سلول‌ها ۱۴ تا ۱۶ ساعت به رشدشان ادامه دادند. سپس نمونه‌ها در دمای ۴°C و دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به هر نمونه از سلول‌های رسوب یافته ۶۰۰ μl بافر سونیکاسیون حاوی گلیسرول ۱۰٪، Tris-HCl (pH: 7.5)، ۵۰ mM NaCl، ۱۵۰ mM EDTA، ۱۰ mM DTT (Sigma)، ۱۰ mM PMSF (Sigma) و مهار کننده‌های پروتئازهای باکتریایی به میزان ۱۰۰۰/۱٪ (Sigma) (v/v) افزوده شده و عمل سونیکاسیون تا زمان شفاف شدن محلول‌های مورد بررسی صورت گرفت. در مرحله بعد برای حذف بقایای دیواره سلولی، به هر نمونه بافر سونیکاسیون حاوی دترجنت افزوده و یک ساعت روی یخ انکوبه شد. در نهایت نمونه‌ها در دمای ۴°C و دور ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول سوپرناتانت حاصله برای بررسی بهینه تولید پروتئین نو ترکیب محلول به وسیله SDS-PAGE ارزیابی شدند.

بهینه سازی دمای کشت:

در مرحله اول تاثیر دمای کشت روی میزان و حلالیت پروتئین نو ترکیب حاصل بررسی شد. بدین منظور در مرحله پس از القاء، باکتریها در دماهای ۲۰°C، ۳۰°C یا ۳۷°C انکوبه شدند. در این مرحله IPTG با غلظت ۰/۱ mM و از دترجنت Triton X-100، ۰/۱٪ (v/v) طبق پروتکل (GST gene fusion system-Pharmacia) استفاده شد.



شکل ۱: میزان تولید دو پروتئین GST و GST-PEP در فراکسیون سوپرناتانت سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده با دو وکتور pGEX6P2 و pGEX6P2/PEP در دماهای کشت ۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد. در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، بهترین میزان پروتئین‌های تحت بررسی مشاهده شد. باند مرتبط با پروتئین GST با نوک پیکان و GST-PEP با نوک پیکان مشخص گردیده است. در تمامی موارد القاء بیان با غلظت ۱، ۰ میلی مولار از IPTG صورت گرفت.



شکل ۲: بررسی تأثیر تغییر غلظت IPTG در میزان تولید پروتئین نوترکیب. GST-PEP میزان تولید دو پروتئین GST و GST-PEP در فراکسیون سوپرناتانت سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده با دو وکتور pGEX6P2 و pGEX6P2/PEP با استفاده از غلظت‌های ۱، ۰/۱ و ۱۰ میلی مولار از IPTG نشان داده شده است. باند مرتبط با پروتئین GST با نوک پیکان و GST-PEP با پیکان مشخص گردیده است.

در $4^{\circ}C$ سانتریفیوژ کرده و محلول اضافه روئی دور ریخته شد. بعد از اتصال پروتئین‌های الحاقی به ماتریکس گلوکوتایون سفاروز چندین مرتبه شستشو صورت گرفت تا اتصالات غیر اختصاصی به ماتریکس حذف شده و در نهایت سوسپانسیون گلوکوتایون سفاروز متصل به GST-PEP و یا GST جهت الکتروفورز از نوع SDS-PAGE (Fermentas) به کار گرفته شد. در الکتروفورز از نشانگر Ruler Prestained Protein Ladder استفاده شد.

رنگ امیزی کوماسی بلو:

جهت رنگ امیزی باندهای پروتئین، ژل‌های حاصل از SDS-PAGE بین ۷ تا ۱۶ ساعت در مقدار کافی محلول رنگی (شامل Commassie Brilliant Blue G250 (Merck) (w/v) 0.1%، 7% (v/v) Acetic Acid Glacial (Merck)، Methanol 50% (v/v) (Merck) قرار داده شد، سپس محلول رنگ تخلیه شده و ژل‌ها در محلول رنگ بر (شامل 7% (v/v) Acetic Acid Glacial (Merck)، Methanol (Merck) 50% (v/v) شسته شدند تا زمینه آنها بی رنگ گردید. آنگاه ژل‌ها را در محلول فیکساتور مخصوص نگهداری ژل (شامل 10% (v/v) Glycerol (Merck)، 15% (v/v) Ethanol (Merck) به مدت حداقل نیم ساعت قرار داده و سپس در میان دو لایه سلفون خشک کننده (Sigma) خشک گردیدند.

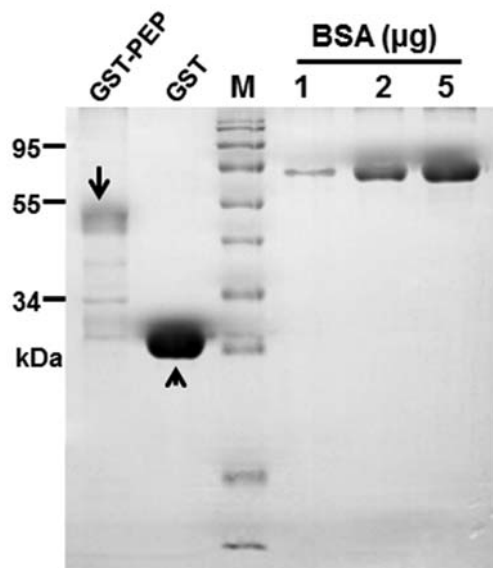
نتایج:

بهینه‌سازی دمای مناسب کشت جهت تخلیص پروتئین پراکسی زومی (PEP):

انکوباسیون باکتری‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد پس از القاء با IPTG موجب تولید بیشتر پروتئین محلول گردید. (شکل ۱).

بهینه‌سازی غلظت مناسب IPTG جهت القای تولید پروتئین پراکسی زومی (PEP):

در ادامه بهینه‌سازی شرایط لازم جهت بیان پروتئین نوترکیب PEP، تعیین غلظت مناسب از القاء کننده IPTG بسیار ضروری بود، لذا سه غلظت ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی مولار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله تفاوت معناداری در بیان پروتئین نوترکیب PEP را با تغییر غلظت IPTG نشان نداد. از این رو در ادامه کار از غلظت کمتر (۰/۱ میلی

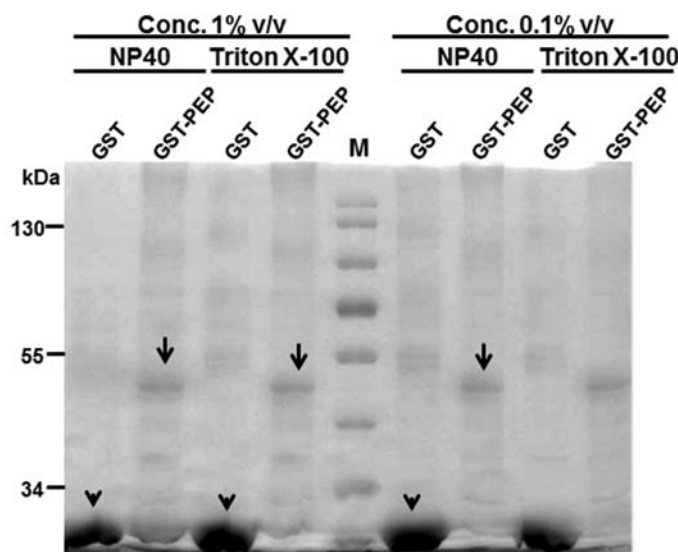


شکل ۴: تخلیص پروتئین نوترکیب GST-PEP و بررسی آن با رنگ آمیزی کوماسی بلو. دو پروتئین GST و GST-PEP بعد از کشت در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، القاء در حضور IPTG با غلظت ۰/۱ میلی مولار و شوینده Triton X-100 با کمک سیستم کروماتوگرافی تمایلی گلوکوتایون سفاروز خالص سازی شدند. نمونه‌ها با تکنیک رنگ آمیزی کوماسی بلو مشخص شدند. باند مرتبط با پروتئین GST با نوک پیکان و GST-PEP با پیکان مشخص گردیده است. M شناساگر پروتئین (Fermentas) می‌باشد.

به دنبال هر چه بهتر کردن شرایط بیان پروتئین نوترکیب پراکسی زومی، در نهایت امر لازم بود تا این پروتئین تخلیص شود. در نتیجه با بهره گیری از یک سیستم کروماتوگرافی تمایلی بر پایه تمایل اتصال گلوکوتایون-S- ترانسفرز به ماتریکس دارای لیگاند گلوکوتایون این کار صورت گرفت که نتایج حاصل از رنگ آمیزی کوماسی بلو در شکل ۴ نشان داده شده است.

بحث:

تاکنون استفاده از روشهای ژنتیکی و پروتئومیکسی منجر به شناسایی ۳۲ نوع پروتئین پراکسین که لازمه بیوژنز پراکسیزومها می‌باشند، شده است. بعضی از پراکسینها مسئول تقسیم شدن پراکسیزوم و تشکیل پراکسیزومهای جدید تر از پراکسیزومهای قبلی می‌باشند اما بیشتر آنها در انتقال و هدایت پروتئینهای ماتریکس پراکسیزومی نقش دارند



شکل ۳: بررسی تأثیر تغییر نوع شوینده در میزان پروتئین نوترکیب GST-PEP. میزان دو پروتئین GST و GST-PEP در فراکسیون سوپرناتانت سلولهای باکتریایی ترانسفورم شده با دو وکتور pGEX6P2 و pGEX6P2/PEP در حضور دو نوع شوینده NP40 و Triton X-100 نشان داده شده است. میزان پروتئینهای تحت بررسی ضمن تغییر در نوع شوینده تفاوت معناداری را نشان نداد. باند مرتبط با پروتئین GST با نوک پیکان و GST-PEP با پیکان مشخص گردیده است. M شناساگر پروتئین (Fermentas) می‌باشد.

مولار) استفاده گردید (شکل ۲).

انتخاب شوینده مناسب از میان Triton X-100 و NP40 جهت حذف بقایای دیواره سلولی باکتریایی و رهايش بهتر پروتئینهای سیتوزولی:

ضمن به کارگیری امواج صوتی برای تخریب غشاء سلول لازم بود تا با کمک یک شوینده غیر یونی چربی‌های سلولی بقایای غشاء باکتری به میزان بیشتری حذف شوند تا پروتئینهای درون سلولی هرچه بیشتر رها شده، و دسترسی و بررسی آنها بهتر صورت بگیرد. در این مطالعه دو شوینده Triton X-100 و NP40 تحت بررسی قرار گرفتند که در غلظت‌های یکسان از هر دو شوینده نتایج مطابق شکل ۳ به دست آمد.

آنالیز نهایی تخلیص پروتئین پراکسی زومی (PEP) بعد از بهینه سازی شرایط فوق از طریق رنگ کوماسی بلو:

این ارگانل تقویت می‌گردد (۱۹،۲۰). لذا مطالعات بیشتر و بررسی نقش احتمالی پروتئین PEP در این مورد ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر پروتئین PEP متصل به GST درون سلول‌های باکتریایی BL21 بیان شده و با کمک گلوکوتایون سفاروز از طریق اتصال آن به GST مورد تخلیص قرار گرفت تا در مطالعات گسترده تر و شناخت پروتئین‌های واکنش دهنده با PEP در سلول‌های بنیادی در مسیر تمایز به عصب مورد استفاده قرار بگیرد.

تقدیر و تشکر:

کلیه نتایج حاصل در این پژوهش از بودجه مرتبط با طرح شماره ۳-۱۴۸ پژوهشگاه رویان تامین گردیده است.

(۱۸،۱۷). بسیاری از بیماریهای پراکسیزومی به علت نقص در انتقال پروتئین‌های ماتریکس پراکسیزومی به درون پراکسیزوم می‌باشند و هر چه تعداد پروتئین‌های واقع در این ارگانل بیشتر شناخته شود احتمالاً ارتباط بیشتری بین آنها و بیماریهای انسانی با منشاء پراکسیزومی یافت می‌شود. یکی از پروتئین‌های شناخته شده پراکسیزومی PEP می‌باشد. مطالعات بیوانفورماتیک با نرم افزارهای مختلف نشان داد که پروتئین PEP دارای یک دامنه مشابه با فیبرونکتین نوع ۳ می‌باشد (از اسید آمینه ۳۱ تا ۱۱۴). که تاکنون در مورد نقش احتمالی این دامنه در پروتئین مورد نظر اطلاعاتی به دست نیامده است (۱ و ۲). بنابراین حضور این دامنه در ساختمان پروتئین PEP نشان دهنده وجود برهمکنش احتمالی این پروتئین با دیگر پروتئین‌های ناشناخته می‌باشد. این ایده با توجه به نقش اسکلت سلولی در مورفوژنز پراکسیزوم و پراکنندگی داخل سلولی

References

1. Ferrer-Martínez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR (2002) Mouse PEP: A novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. *Dev Dyn*, 224(2), 154-167.
2. Tanhaie S, Ghaedi K, Karbalaii K, Razavi S, Ostadsharif M, Nazari-Jahantigh M, Rabeei F, Nematollahi M, Baharvand H, Nasr Esfahani MH (2009) Mouse peroxisomal protein cDNA cloning and characterization of its intracellular localization. *Yakhteh Medical Journal*, 11(2), 196-203.
3. Brown LA, Baker A. (2003) Peroxisome biogenesis and the role of protein import. *J Cell Mol Med*, 7(4), 388-400.
4. Carr P, Erickson H, Palmer A (1997) Backbone dynamics of homologous fibronectin type III cell adhesion domains from fibronectin and tenascin. *J Str*, 5, 949-959.
5. Bagutti C, Wobus AM, Fässler R, Watt FM (1996) Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol*, 179(1), 184-96.
6. Amodeo P, Fraternali F, Lesk AM, Pastore A (2001) Modularity and homology: modeling of the titin type I modules and their interfaces. *J Mol Biol*, 311, 283-296.
7. Huang H, Sylvan J, Jonas M, Barresi R, So PT, Campbell KP, Lee RT (2005) Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(1), 72-80.
8. Li L, Huang HH, Badilla CL, Fernandez JM (2005) Mechanical unfolding intermediates observed by single-molecule force spectroscopy in a fibronectin type III module. *J Mol Biol*, 345(4), 816-826.
9. Teufel A, Malik N, Mukhopadhyay M, Westphal H (2002)

- Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes. *Gene*, 297(1-2), 79-83.
10. Doniwa Y, Arimura SI, Tsutsumi N (2007) Mitochondria use actin filaments as rails for fast translocation in Arabidopsis and tobacco cells. *Plant Biotech*, 24, 441-447.
11. Ostadsharif M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH, Tanhaie S, Karbalaii K, Parivar K, Baharvand H (2009) Cytosolic localization of mouse peroxisomal protein/ Δ SKI fused with enhanced green fluorescent protein into Chinese hamster ovary-K1 and P19 cells. *Yakhteh Medical Journal*, 11(2), 154-159.
12. Ostadsharif M, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH, Tanhaie S, Karbalaie K, Baharvand H (2010) Sorting analysis of mouse peroxisomal protein by in vitro studies. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8(3), 186-192.
13. Singha I, Paintliaa AS, Khana M, Stanislausa R, Paintliaa MK, Haqa E, Singhb A.K, Contreras MA (2004) Impaired peroxisomal function in the central nervous system with inflammatory disease of experimental autoimmune encephalomyelitis animals and protection by lovastatin treatment. *Brain Res*, 1022(1-2), 1-11.
14. Ostadsharif M, Ghaedi K., Nasr-Esfahani MH, Mojbafan M, Tanhaie S, Karbalaie K, Baharvand H (2011) The expression of peroxisomal protein transcripts increased by retinoic acid during neural differentiation. *Differentiation*, 81(2), 127-32.
15. Nazari Jahantigh M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH, Tanhaie S, Rabeei F, Karbalaie KH, Ostadsharif M, Nematollahi M, Baharvand H, Razavi S, Miroliaei M (2009) Construction of expression vectors carrying mouse

peroxisomal protein gene (PeP) with GST and Flag labels. African Journal of Biotechnology, 8 (22), 6040-6045.

16. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York.

17. Fujiki Y, Okumoto K, Kinoshita N, Ghaedi K (2006) Lessons from peroxisome-deficient Chinese hamster ovary (CHO) cell mutants (review). Biochim Biophys Acta, 1763, 1374-81.

18. Ghaedi K, Fujiki Y (2008) Isolation and characterization of novel phenotype CHO cell mutants defective in

peroxisome assembly, using ICR191 as a potent mutagenic agent. Cell Biochemistry & Function, 26, 1-8.

19. Schollenberger L, Gronemeyer T, Huber CM, Lay D, Wiese S, Meyer HE, Warscheid B, Saffrich R, Peränen J, Gorgas, Just WW (2010) RhoA regulates peroxisome association to microtubules and the Actin cytoskeleton. PLoS ONE 5(11), e13886.

20. Mathur J, Mathur N, Hulskamp M (2002) Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. Plant Physiology 128 (3), 1031-45.