

## همسانه‌سازی و بیان توالی کد کننده ABRaA در باکتری اشرشیاکلی

Cloning and expression of the sequence coding ABRaA in *Escherichia coli*.

فریبا رفیعی<sup>۱</sup>، علی اکبر شاهنجات بوشهری<sup>۱</sup>، هوشنگ علیزاده<sup>\*۱</sup>

۱- بهترتب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، پردازش کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

Rafiei F<sup>1</sup>, Shah Nejat Boushehri AA<sup>1</sup>, Alizadeh H<sup>\*1</sup>

۱- Phd Student, Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

ابرین یک پروتئین گیاهی سمی از خانواده پروتئین‌های بازدارنده‌ی ریبوزومی و با ماهیت گلیکوپروتئینی است. این پروتئین شامل دو زنجیره متفاوت A و B است، زنجیره A با وزن ۳۰ کیلو دالتون و با فعالیت آن- گلیکوزیدازی rRNA و زنجیره B با وزن حدود ۳۵ کیلو دالتون و با خاصیت لکتینی که نقش آن تسهیل جذب زنجیره A به داخل سلول می‌بان است. در این مطالعه، جداسازی توالی DNA کد کننده زنجیره A ابرین از گیاه *Abrus precatorius* با استفاده از تکنیک PCR انجام و در تی وکتور همسانه‌سازی شد. توالی حاصل به طول ۲۵۳ bp به عنوان اولین توالی ژنومی زنجیره A ابرین با شماره دسترسی MF573784 در پایگاه NCBI GenBank ثبت شد. در ادامه ساختار مولکولی و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ساختارهای دوم و سوم توالی پروتئینی ABRaA با وزن مولکولی ۲۸/۰۷ کیلو دالتون، نشان داد که این پروتئین از نظر ساختاری مشابه با توالی پروتئین‌های بازدارنده‌ی ریبوزومی نوع II گیاهی می‌باشد. بیان پروتئین نوترکیب در سویه (DE3) BL21 انجام و صحت آن با استفاده از آزمون لکه‌گذاری وسترن بلات تائید شد.

### واژه‌های کلیدی

ابرین  
پروتئین نوترکیب  
همسانه سازی  
وسترن بلات

گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای هستند که دارای  $\alpha$ - ۱ و ۴ متصل به رزیدوهای گالاكتوز می‌باشند، با اتصال زنجیره B به این گیرندها، زنجیره A ابرین، وارد سلول می‌شود (Olsnes 2004). هنگامی که زنجیره A سم ابرین به صورت اندوسيتوز وارد سلول می‌شود، اثرات سمی آن بر روی ریبوزوم 60S منجر به مهار RIP‌های طولی‌سازی EF-1 و EF-2 و جلوگیری از سنتز پروتئین شده، و نهایتاً منجر به مرگ سلولی می‌شود. در واقع فرآیند مهار سنتز پروتئین شامل غیرفعال‌سازی کاتالیتیکی ریبوزوم است که توسط زنجیره A سم ابرین انجام می‌شود، این عمل با حذف یک آدنین کلیدی از توالی GAGA loop حفاظت شده در جایگاه ۴۳۲۴ 28S rRNA زیر واحد 60S ریبوزوم، انجام می‌شود.

rRNA پورین‌زدایی شده پس از آن، دیگر قادر نیست به فاکتور طولی‌سازی پروتئین (EF-2)، متصل شود، این امر منجر به توقف سنتز پروتئین و نهایتاً مرگ سلول می‌شود (Karande et al. 2017; Audi et al. 2005; Reyes et al. 2012). در واقع القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده<sup>۷</sup> توسط ابرین می‌تواند نتیجه‌ی فرآیند آسیب به DNA به علت آزاد شدن آدنین از چندین جایگاه باشد، که این امر منجر به ایجاد جایگاه‌های فاقد پورین/فاقد پیریمیدن شده و باعث تضعیف ستون قند-فسفات DNA می‌شود. RIP‌ها آدنین را نه تنها از RNA، بلکه از DNA، دم پلی A و کلاهک mRNA نیز حذف می‌کنند (Polito et al. 2011; Fuchs and Bachran 2012).

دسترسی محدود برای تهیه پروتئین سمی ابرین، روش‌های پیچیده استخراج، خالص‌سازی این پروتئین از گیاه و مقرن به صرفه نبودن این روش‌ها سبب شد تا در پی بیان این پروتئین دارویی در باکتری به منظور کاهش هزینه و دسترسی بهتر این دارو باشیم. با توجه به این‌که سیستم‌های پروکاریوتی جهت سنتز پروتئین‌های نوترکیب کوچک دارای مزایایی زیادی مانند رشد سریع سلولی، تولید سطوح بالایی از رهاسازی پروتئین در محیط کشت، کمک

## مقدمه

پروتئین‌های بازدارنده‌ی ریبوزومی (RIPs)<sup>۱</sup>، خانواده‌ای از آنزیم‌ها با فعالیت ان- گلیکوزیدازی هستند که باعث آزاد شدن یک نوکلئوتید آدنین از زیر واحد ریبوزومی 60S می‌شوند (Stirpe 1992). RIP‌ها بر اساس ساختار اولیه به دو گروه تقسیم می‌شوند. RIP‌های نوع I که آنزیم‌های تک واحدی با وزن تقریباً ۳۰ کیلو دالتون و با فعالیت ان- گلیکوزیدازی هستند و هم‌چنین Barbieri et al. (1993) RIP‌های نوع II، شامل دو دمین متفاوت هستند، یک زنجیره A فعال ۳۰ کیلو دالتونی با فعالیت ان- گلیکوزیدازی rRNA و یک زنجیره B با وزن حدود ۳۵ کیلو دالتون و با خاصیت لکتینی که نقش آن تسهیل جذب زنجیره A به داخل سلول می‌زیبان است. این دو زنجیره توسط یک پیوند دی‌سولفیدی به صورت کووالان بهم متصل می‌شوند (Hegde et al. 1991).

مهم‌ترین RIP‌های گیاهی نوع II عبارتند از: ریسین<sup>۲</sup>، ساپورین<sup>۳</sup>، گلونین<sup>۴</sup> و ابرین<sup>۵</sup> (Ferreras et al. 2011). ابرین یک پروتئین سمی است که از گیاه Abrus precatorius L. به دست می‌آید (Carlini et al. 2002). گیاهی است چند ساله و از خانواده‌ی لگوم<sup>۶</sup>، زیستگاه اصلی این گیاه مناطق جنگلی نواحی گرمسیری مانند شمال استرالیا، جنوب شرق آسیا، ناحیه گرمسیری آسیا و غرب اقیانوس آرام است. در طب سنتی از ترکیبات این گیاه برای درمان جراحت‌هایی که توسط حیواناتی چون سگ، گربه و موش ایجاد می‌شود، استفاده می‌شود. از این گیاه علاوه بر درمان بیماری هاری، در درمان بیماری‌های چون پیسی و کزار نیز استفاده می‌شود (Taur et al. 2017).

A. precatorius سمی است ولی بذرها به علت داشتن بالاترین میزان سم، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Nwodo et al. 2012).

مکانیزم عمل این پروتئین سمی به این صورت است که ابتدا زنجیره B با ماهیت لکتینی به طور اختصاصی به گیرنده‌های سطحی سلول‌های یوکاریوتی متصل می‌شود، این گیرنده‌ها

<sup>1</sup> Ribosome inactivating protein<sup>2</sup> Ricin<sup>3</sup> Saporin<sup>4</sup> Gelonin<sup>5</sup> Abrin<sup>6</sup> Leguminosae<sup>7</sup> Apoptosis  
<sup>8</sup> Immunotoxins



### الف

شکل ۱-الف) رشد بذرها جوانه زده *Abrus precatorius* پس از دو هفته در ژرمیناتور ۲۵ درجه سانتی گراد (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی). ب) رشد گیاه *Abrus precatorius* پس از دو ماه.

برای تکثیر توالی DNA کد کننده ABRaA، واکنش PCR با غلظت نهایی ۱/۴ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار آغازگر، ۲ میکرولیتر بافر (۱۰X) و یک واحد آنزیم *Taq* DNA پلیمراز برای تکثیر انجام شد. برای دستیابی به دمای بقیه، تکثیر به صورت شیب دمایی از ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت تا دمای مناسب آغازگرها تعیین شود. به این منظور واسرشه‌سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}C$  به مدت ۴ دقیقه و ۳۳ چرخه حرارتی شامل مرحله واسرشه‌سازی در دمای  $94^{\circ}C$  به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای  $65^{\circ}C$ -۵۵ به مدت ۴۵ ثانیه و زمان بسط DNA در دمای  $72^{\circ}C$  به مدت ۶۰ ثانیه و همچنین مدت زمان بسط نهایی ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در ادامه آنزیم *Pfu* DNA پلیمراز برای تکثیر قطعه جهت استفاده در همسانه‌سازی به کار گرفته شد. برای این منظور غلظت نهایی اجزای واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۱/۵ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی مولار *Pfu* (Bio Basic, Canada) یک واحد آنزیم dNTP و DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل واسرشه‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای  $94^{\circ}C$  و ۳۳ چرخه حرارتی شامل مرحله واسرشه‌سازی در دمای  $94^{\circ}C$  به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای  $58^{\circ}C$  به مدت ۴۵ ثانیه و زمان بسط DNA در دمای  $72^{\circ}C$  به مدت دو دقیقه و همچنین بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR بر روی ژل آکارز یک درصد به مدت ۴۵ دقیقه

به شکل گیری ساختار پروتئین، امکان دستورزی ژنتیکی و کتور بیان، صرفه جویی در هزینه و جمع آوری پروتئین‌های ترشح شده در محیط کشت می‌باشد (Li et al. 2007)، در این تحقیق جداسازی توالی کد کننده زنجیره A برین از ژنوم گیاه *E.coli* و بیان این پروتئین در سیستم پروکاریوتی *precatorius* مورد توجه قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

به منظور جداسازی توالی کد کننده زنجیره A پروتئین ابرین<sup>۱</sup> (ABRaA)، بذر گیاه *A. precatorius* (TEHIE و کشت داده شد. ابتدا بذرها استریل شده (Mahmoodi et al. 2014) و سپس برای از بین بردن خواب بذر، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه در آب  $100^{\circ}C$  درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس بذرها در ژرمیناتور ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند (Prakash et al. 2013). پس از دو هفته بذرها جوانه زده به محیط کوکوپیت، پیت و پرلیت با نسبت‌های ۱:۱:۲:۱ انتقال داده شدند و بعد از گذشت دو ماه از رشد گیاه (شکل ۱-۱)، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های گیاه به روش Doyle and Doyle CTAB با اندکی تغییرات انجام گرفت (1987).

آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی cDNA کد کننده abrin A-chain از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با شماره دسترسی (X76720)، با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند:

Forward: 5'-  
GAATTCTGGATCCGAAGATAGGCCATCAAGTTT  
CCACTG-3'

Reverse: 5'-  
CTCGAGATTGGCGATTGCAGACAAAAAGCATC  
-3'  
(در سمت ۵' آغازگر پیش رو به ترتیب از جایگاه‌های برشی آنزیم‌های EcoRI- BamHI و در سمت ۵' آغازگر پیش رو از جایگاه Bioneer آنزیم *XhoI* استفاده شد. آغازگرها توسط شرکت Bioneer جنوبی ساخته شدند).

<sup>۱</sup> ABRaA :Abrain-a A chain

سیکل ۱۵ ثانیه‌ای) انجام شد و پروتئین‌های حاصل با استفاده از SDS-PAGE ۱۰ درصد بررسی شدند. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA Agarose (Qiagen, Germany) انجام شد. برای تأیید پروتئین مورد نظر روش وسترن بلات با استفاده از آنتی‌بادی هیستیدین در رقت ۳۰۰۰:۱ و آنتی‌بادی اختصاصی با رقت ۶۰۰:۱ انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از برنامه Expasy مورد ترجمه قرار گرفته و خصوصیات بیوشیمیابی توالی اسید‌آمینه به‌دست آمده، شامل شاخص‌های آلفاگرام، آب‌گریزی و ناپایداری با استفاده از Doolittle برنامه‌های ProtParam و ProtScale به روش (1982). (Gasteiger et al. 2005) and Kyte همچنین پیش‌بینی موقعیت درون‌سلولی پروتئین کد شده توسط Briesemeister et al. (2010) ABRaA با استفاده از برنامه YLOC (2010) انجام گرفت. ساختارهای دوم و سوم توالی پروتئینی ABRaA با استفاده از برنامه I-TASSER تعیین شد. هم‌چنین توالی اسید‌آمینه به‌دست آمده به‌منظور یافتن توالی‌های پروتئینی مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از الگوریتم BLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مورد جستجو قرار گرفت و تعدادی توالی از منابع مختلف که بیشترین شباهت (بالاتر از ۵۰ درصد) را با توالی پروتئینی مورد نظر داشتند، انتخاب شدند. هم‌رديفی چندگانه توالی پروتئینی ABRaA با استفاده از نرم‌افزار Clustal Omega انجام شد. بررسی وجود سیگنال پیتید، با کمک برنامه SignalP 4.1 انجام شد.

### نتایج و بحث

طبق نتیجه حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که به صورت شیب دمایی ۵۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد، و با آنزیم Taq DNA پلی‌مراز انجام شد، قطعه ABRaA در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد تکثیر شد (شکل ۲-الف). به‌منظور تکثیر با آنزیم *Pfu* پلی‌مراز در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای تکثیر انتخاب شد. قطعه مورد استفاده ABRaA برای همسانه‌سازی در تی وکتور pTG19 در حضور آنزیم *Pfu* پلی‌مراز تکثیر شد (شکل ۲-ب).

کلون‌های رشد کرده بر روی محیط انتخابی از طریق کلونی PCR با پرایمرهای اختصاصی، هضم آنزیمی و در نهایت با توالی‌یابی

تفکیک شد و سپس با استفاده از کیت تخلیص از ژل Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) شد. قطعه حاصل پس از افزودن تک نوکلئوتید A در تی وکتور pTG19 (Vivantis, Malaysia) طبق دستورالعمل آن شرکت Takara، همسانه‌سازی شد. واکنش الحاق با استفاده از آنزیم (T4 DNA Ligase)(Japan) انجام شد و سپس به روش شوک حرارتی انتقال سازه به سلول‌های مستعد باکتری *E.coli*, سویه DH5α صورت گرفت (Sambrook and Russell 2001) غربال سلول‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، از محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین (با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. کلون‌های نوترکیب به‌دست آمده بر روی محیط انتخابی آمپی‌سیلین، از طریق کلونی PCR تایید شدند و به‌منظور تایید نهایی استخراج پلاسمید مطابق روش لیز قلیابی انجام شد (Sambrook and Russell 2001) و هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرکت فرمتو، جهت اطمینان از وجود قطعه صورت گرفت. توالی‌یابی DNA پلاسمید نوترکیب توسط شرکت Seqlab آلمان انجام گرفت.

پس از تایید توالی کد کننده ABRaA، برای ساخت سازه جهت تولید پروتئین مورد نظر در باکتری، قطعه مورد نظر با برش *BamHI/XhoI* در ناقل بیانی (pET28a+) در *pETABRaA* گرفت. سپس انتقال *pETABRaA* به میزبان بیانی (DE3) BI21 مطابق دستورالعمل (Sambrook and Russell 2001) صورت گرفت. تک کلون‌ها از سویه BI21 (DE3) حاوی سازه مورد نظر به صورت کشت شبانه در محیط کشت LB حاوی کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. روز بعد کشت شبانه با محیط تازه به نسبت ۱:۲۰ ارقیق شد و پس از رسیدن به OD<sub>600</sub> ۰/۳ تا ۰/۵، به محیط کشت باکتری<sup>۱</sup> IPTG با غلظت ۰/۸ میلی‌مolar اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از ۵ ساعت نمونه‌برداری انجام گرفت. پس از القای بیان، پروتئین‌های حاصل بر روی SDS-PAGE تفکیک شدند (Sambrook and Russell 2001). باکتری‌ها در شرایط ۴۰۰۰×g به مدت ۷ دقیقه رسوب داده شدند. استخراج پروتئین کل از باکتری با استفاده از دستگاه فرآصوت با امواج صوتی ۹۰ (سه

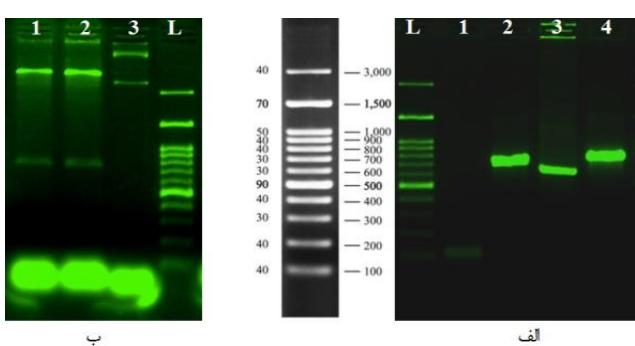
<sup>۱</sup> Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside

## همسانه‌سازی و بیان توالی کد کننده ABRaA در...

همچنین در توالی اسید آمینه این پروتئین یک اسید آمینه سیستئین و سیزده اسید آمینه آسپاراژین وجود دارد که در فرآیند ان-گلیکوزیلاسیون نقش دارند. همچنین مشخص شد که این پروتئین فاقد پیتید نشانه است، چون برای وجود پیتید نشانه باید نمره D از ۰/۴۵ بیشتر باشد که برای پروتئین فوق عدد ۰/۰۹۹ ثبت شد Bendtsen et al. (2004).

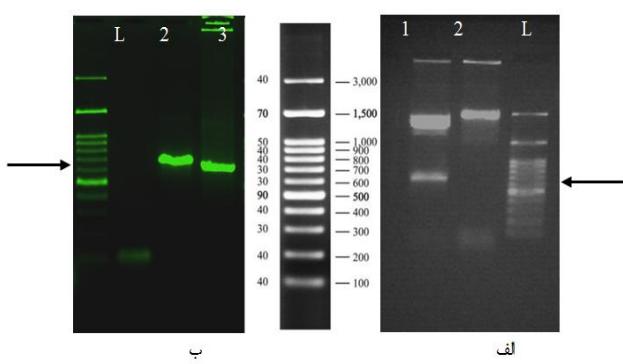
1	GAAAGATAGGCCCATCAAGTTTCCACTGAAAGTGCCACTTCACCAAAGCTAACAGCAGTTG	60
2	GAAAGATAGGCCCATCAAGTTTCCACTGAAAGTGCCACTTCACCAAAGCTAACAGCAGTTG	60
1	ATTGAAGCGTTCTGGGGAGCTAAAGGGTGGGGCTGATCACAGCAGTACCTGTGCTTGA	120
2	ATTGAAGCGTTCTGGGGAGCTAAAGGGTGGGGCTGATCACAGCAGTACCTGTGCTTGA	120
1	GATCCCCAACACAGTGGAGAAGAAAATCGATATACTCACAGTGAACCTCTCAACCTGGAG	180
2	GATCCCCAACACATTCGCAAGAAGAAAATCGATATACTCACAGTGAACCTCTCAACCTGGAG	180
1	AGGGAACTTATTGAGTAGGTATGCGATGTGACCCAAFCGATATGTGGTACCATACCGAGCA	240
2	AGGGAACTTATTGAGTAGGTATGCGATGTGACCCAAFCGATATGTGGTACCATACCGAGCA	240
1	GGAGTCTCAATTCTATTCTCTGAGCAGCAGCAGTGCATCTGCTACCTACCTTTCTACT	300
2	GGAGTCTCAATTCTATTCTCTGAGCAGCAGCAGTGCATCTGCTACCTACCTTTCTACT	300
1	GGCACCGCACGCGTACTCACCTCTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG	360
2	GGCACCGCACGCGTACTCACCTCTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG	360
1	CATCAGACGAGGAGGCGAAATAATAGCTTAAGGGTTACAGGGCTTGACACATGGAAATATGTTT	420
2	CATCAGACGAGGAGGCGAAATAATAGCTTAAGGGTTACAGGGCTTGACACATGGAAATATGTTT	420
1	CTACGAACTGGGGCGATGAGCTGAGGAAAGGGCTGTACCTCTGATCTGTTGATCTGTTG	480
2	CTACGAACTGGGGCGATGAGCTGAGGAAAGGGCTGTACCTCTGATCTGTTGATCTGTTG	480
1	ATGGCTTCTGAACTGCTCTCTGAGGTACATATCTAACCGGGCTTGGCTGCTGAACTCGGA	540
2	ATGGCTTCTGAACTGCTCTCTGAGGTACATATCTAACCGGGCTTGGCTGCTGAACTCGGA	540
1	ACTGGTAGGGCGTTTCAACCGAGTCCTGCAATGTTAGGGTATGGGAAACATTGGGGTAAAT	600
2	ACTGGTAGGGCGTTTCAACCGAGTCCTGCAATGTTAGGGTATGGGAAACATTGGGGTAAAT	600
1	CTGTCAACGGGTGTCAAGAATCGTCAAGAATCTTCTGAGCTGGGTACCTTTAGA	660
2	CTGTCAACGGGTGTCAAGAATCGTCAAGAATCTTCTGAGCTGGGTACCTTTAGA	660
1	CGATTTGTTAAATACAAACCGTGTATGTAGAGCTCTTGAGACACAAATCAGTGGCTGAGTCTA	720
2	CGATTTGTTAAATACAAACCGTGTATGTAGAGCTCTTGAGATCTTCTGAGCTACCCACAGTGGCTGAGTCTA	720
1	GCATTTGTTAAATACAAACCGTGTATGTAGAGCTCTTGAGATCTTCTGAGCTACCCACAGTGGCTGAGTCTA	758
2	GCATTTGTTAAATACAAACCGTGTATGTAGAGCTCTTGAGATCTTCTGAGCTACCCACAGTGGCTGAGTCTA	758

شکل ۴- بررسی هم ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن ABRaA با توالی نوکلئوتیدی cDNA کد کننده زنجیره A ابرین با شماره دسترسی X76720



شکل ۵- تائید حضور قطعه ABRaA در ناقل pET28a+ و نمایش بر روی ژل آکارز آکارز ۱/۵ درصد. الف) شماره های ۲، ۳ و ۴ مربوط به کلونی PCR برای قطعه ABRaA پلاسمیدهای pETABRaA حاوی قطعه ABRaA و شماره ۱ شاهد منفی (بدون الگو) می باشد. ب) شماره ۱ و ۲ هضم آنزیمی ABRaA با آنزیم های BamHI/XhoI شماره ۳ پلاسمید برش نخورده حاوی قطعه ABRaA نشانگر .(100bp DNA ladder Sinaclon)

مورد تایید قرار گرفتند (شکل ۳). نتیجه حاصل از توالی باسی ABRaA و بررسی هم ردیفی آن نشان داد که قطعه همسانه سازی شده، ژن کد کننده زنجیره A ابرین است (شکل ۴). بنابراین توالی DNA ژنومی کد کننده ABRaA با شماره دسترسی NCBI GenBank MF573784 ثبت برای اولین بار در پایگاه توالی نوکلئوتیدی ۷۵۳ bp بوده و یک پروتئین با ۲۵۱ اسید آمینه شد. طول این توالی ۷۵۳ bp بوده و یک پروتئین با ۲۵۱ اسید آمینه را کد می نماید. بررسی خصوصیات بیوشیمیابی پروتئین به دست آمده نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آبیوالکتریک پیش بینی شده توالی پروتئینی ژن ABRaA با فرمول مولکولی  $C_{1233}H_{1948}N_{356}O_{387}S_4$  به ترتیب برابر ۲۸/۰۷ کیلو دالتون و ۵/۶۶ است. همچنین شاخص ناپایداری این پروتئین در لوله آزمایش ۴۱/۸۳ بود که نشان دهنده ناپایداری این پروتئین است. ضربی آلفاگاتیک پروتئین که بیانگر حجم اشغال شده توسط زنجیره جانبی اسید آمینه های Ala, Val, Ile و Leu می باشد، ۸۷/۸۱ تعیین شد Ikai (1980). شاخص آب گریزی<sup>۱</sup> محاسبه شده نشان داد که توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA به میزان زیادی آب دوست بوده و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۲۹ اسید آمینه دارای بار منفی و ۲۵ اسید آمینه با بار مثبت (Arg+Lys) (Asp+Glu) بودند.

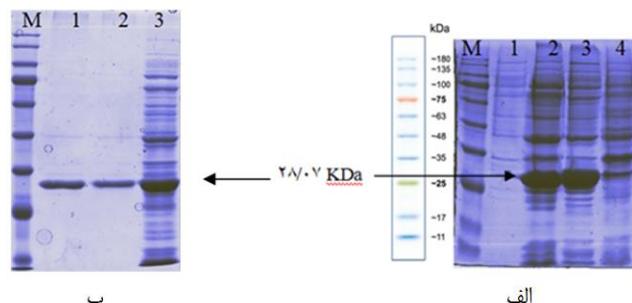


شکل ۳- تائید حضور قطعه ABRaA در تی وکتور و نمایش بر روی ژل آکارز یک درصد. الف) شماره های ۲ و ۳ مربوط به کلونی PCR برای قطعه ABRaA و شماره ۱ شاهد منفی (بدون الگو) می باشد. ب) شماره ۱ هضم آنزیمی تی وکتور حاوی قطعه ABRaA به طول ۷۵۳ جفت یاز با آنزیم های BamHI/XhoI. جهت انتقال قطعات به ناقل pET28a+ و شماره ۲ پلاسمید برش نخورده حاوی قطعه ABRaA نشانگر .(Sinaclon

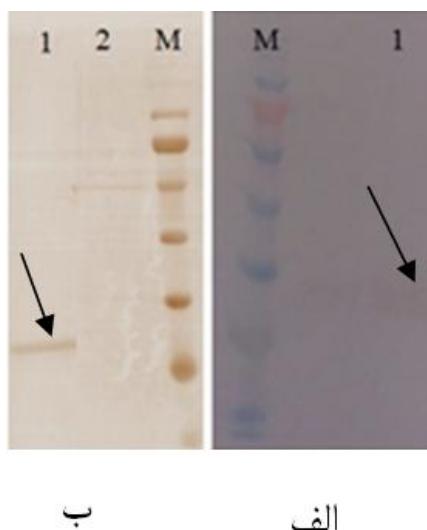
<sup>1</sup> Hydropathy

پروتئین‌های القا شده در سویه (Bl21) DE3 بر روی SDS-PAGE ده درصد تفکیک شدند (شکل ۶). مطابق انتظار پروتئین موردنظر با وزن ۲۸/۰۷ kDa بیان شد. با توجه به شکل ۶ پروتئین نوترکیب حاصل به صورت محلول و همچنین پروتئین بادی به دست آمد. طبق پیش‌بینی برنامه ProtScale و بر اساس آب دوست‌بودن پروتئین، انتظار می‌رود که پروتئین به صورت محلول تولید شود. اما بخش زیادی از پروتئین به صورت پروتئین بادی مشاهده شد که در غلظت بالای پروتئین در *E.coli* امری طبیعی می‌باشد (Wilkinson and Harrison 1991). پروتئین نوترکیب خالص شده با ستون نیکل به روش بردفورد تعیین غلظت شد (Bradford 1976). بیان پروتئین مورد نظر به کمک روش لکه-گذاری و سترن با به کار گیری آنتی‌بادی هیستیدین و همچنین آنتی‌بادی اختصاصی مورد تائید قرار گرفت (Sambrook and Russell 2001) (شکل ۷-ب). نتیجه موقوفیت‌آمیز و سترن نشان می‌دهد که میانکنش اختصاصی بین پروتئین نوترکیب و آنتی‌بادی اختصاصی صورت گرفته است (شکل ۷-ج).

بررسی توالی آمینواسیدی نشان داد که توالی کد کننده ABRaA مانند توالی پروتئینی ژن *Abrin-a A chain* (شماره دسترسی 1ABR\_A) دارای یک اسید‌آمینه Cys در موقعیت حفظ شده Cys247 است این آسید‌آمینه نقشی کلیدی در ایجاد پیوند دی‌سولفیدی بین زنجیره A و زنجیره B ابرین دارد (et al. 1995). همچنین توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA (Tahirov)، همچنین توالی پروتئینی ثابت ۵ اسید‌آمینه Tyr113، Tyr74، Arg167، Glu164، Arg167، Glu164، Arg167، Try198 و ۵ اسید‌آمینه Try198 در موقعیت‌های حفظ شده Asn72، Asn160، Arg124، Gln160، Glu195 و Asn196 است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که ۵ اسید‌آمینه ثابت Tyr113، Tyr74، Arg167، Glu164، Arg167 و Try198 در جایگاه فعال زنجیره A ابرین، در همه RIP‌ها حالت حفاظت‌شده دارند (Kimura et al. 1993; Mlsna et al. 1993). همچنین گزارش شده است که Glu164 و Arg167 این پروتئین مستقیماً در فعالیت کاتالیزوری هیدرولیز کردن پیوند ان-سی گلیکوزیداسیون نقش دارند (et al. 1995) بررسی‌ها نشان می‌دهند که دو اسید‌آمینه Glu164 و Arg167 در ابرین و ریسین، نقش کلیدی در ممانعت از بیوسترز پروتئین ایفا می‌کنند (Hung et al. 1994). پیش‌بینی موقعیت



شکل ۶- نتیجه بیان و خالص سازی ABRaA از القای باکتری (DE3) حاوی سازه pETABRaA و تفکیک بر روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد. الف) شماره ۱ پروتئین نمونه شاهد (پروتئین باکتری بدون سازه)، شماره ۲ نمونه پروتئین کل و اسرشته و نمونه ۳ نمونه پروتئین کل محلول استخراج شده با فرآصوت. ب) شماره‌های او ۲ نمونه‌های پروتئین خالص شده ABRaA با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی Ni-NTA آگارز، شماره ۳ پروتئین کل طبیعی استخراج شده با استفاده از فرآصوت. M نشانگر (marker Sinaclone).



شکل ۷- نتیجه بیان ABRaA از القای باکتری BL21 حاوی سازه pETABRaA و آزمون و سترن بلاست برای تایید پروتئین مورد نظر. الف) نتیجه و سترن بلاست با آنتی‌بادی آنتی‌هیستیدین‌تگ. ب) شماره ۱ نتیجه و سترن بلاست با آنتی‌بادی آنتی‌اختصاصی ABRaA، شماره ۲ پروتئین شاهد (باکتری بدون سازه). M نشانگر (Prestained Protein marker Sinaclone).

به منظور بررسی بیان پروتئین مورد نظر، قطعه‌ی ABRaA در ناقل pET28a+ (pETABRaA) الحاق شد، با انجام کلونی PCR و هضم آنزیمی ناقل pETABRaA با دو آنزیم *BamHI/XhoI* حضور قطعه تایید شد (شکل ۵).

## همسانه‌سازی و بیان توالی کد کننده ABRaA در...

نتایج بررسی توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA با تعدادی از توالی‌های پروتئینی زنجیره A نشان داد که بالاترین تشابه را با ژن Abrin-a A chain به میزان ۸۴ درصد یکسانی دارد (شکل ۹). با بررسی تشابه ساختار دوم زنجیره A ابرین کد شده توسط توالی ABRaA مشخص شد که این پروتئین دارای ۹۶ اسیدآمینه در مارپیچ  $\alpha$  (۳۸/۲۵ درصد)، ۶ اسیدآمینه در پیچ  $\beta$  (۲/۳۹ درصد) و ۹۸ آمینو اسید در مارپیچ تصادفی (۳۹/۰۴ درصد) است.

(شکل ۱۰)

درون‌سلولی این پروتئین نیز نشان داد محل فعالیت آن مشابه سایر زنجیره‌های A موجود در ساختار RIP‌های نوع II، ستوفلاسم می‌باشد (Pascal et al. 2001).

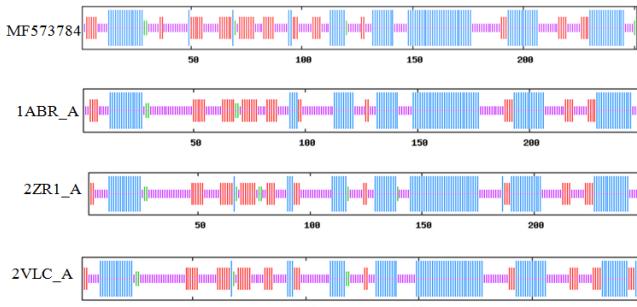
نتایج حاصل از BLASTp توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA با توالی‌های پروتئینی مشابه موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، جهت بررسی همردیف‌سازی چندگانه در جدول ۱ آمده است.



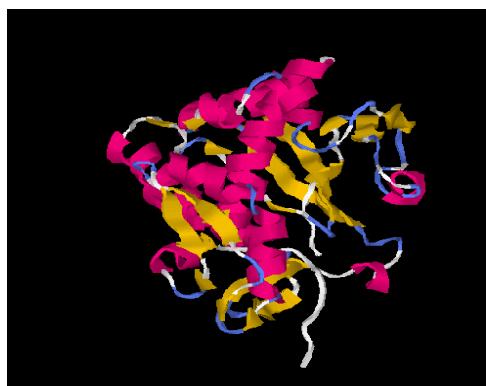
شکل ۹- همردیف‌سازی چندگانه توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA با توالی‌های پروتئینی مشابه با میزان شباهت بالاتر از ۵۰ درصد (ذکر شده در جدول ۱) با استفاده از نرم افزار ClustalX.

جدول ۱- مشخصات توالی‌های پروتئینی مورد استفاده برای تهیه همردیفی چندگانه بهمراه شماره دسترسی موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

ردیف	نام علمی گیاه	میزان	میزان	نماینده	شماره دسترسی
۱	<i>Abrus precatorius</i>	4e-158	٪۸۴	<i>Abrin-a A chain</i>	1ABR_A
۲	<i>Abrus precatorius</i>	2e-125	٪۶۹	<i>Chain A, Agglutinin</i>	2ZR1_A
۳	<i>Abrus precatorius</i>	2e-125	٪۶۹	<i>Chain A, Agglutinin(Apa-I)</i>	2Q3N_A
۴	<i>Abrus precatorius</i>	5e-68	٪۵۰	<i>Chain A, Crystall Structure Of Natural Cinnamomin</i>	2VLC_A



شکل ۱۰- ساختار دوم توالی پروتئینی کد شده توسط ژن ABRAA با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با توالی‌های پیتیدی مشابه. مارپیچ‌های  $\alpha$ ، صفحات  $\beta$  و مارپیچ‌های تصادفی به ترتیب با خطوط آبی، قرمز، سیز و بنفش نشان داده شده‌اند.



شکل ۱۱-  
مدلهای

سه بعدی توالی پروتئینی کد شده توسط توالی ABRaA با استفاده از برنامه I-TASSER

### نتیجه‌گیری کلی

در این بررسی توالی DNA کد کننده زنجیره A ابرین جداسازی و پس از تایید توالی یابی و بررسی خصوصیات ساختاری و بیوشیمیابی با استفاده از نرم افزارهای مختلف و تایید نهایی با استفاده از آنتی بادی اختصاصی، این توالی برای اولین بار در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شد. در این پروتئین شباهت بالایی در ساختار دوم با پروتئین‌های بازدارنده ریبوzومی نوع II مشاهده شد، این پروتئین مشابه با ریسین و سایر پروتئین‌های بازدارنده ریبوzومی نوع II دارای ۵ اسیدآمینه ثابت در جایگاه فعال و ۵ اسیدآمینه در موقعیت‌های حفاظت شده بود.

یکی از کاربردهای پروتئین سمی ابرین، استفاده هدفمند از این پروتئین در درمان سلول‌های سرطانی می‌باشد که به منظور دریافت اختصاصی سم توسط سلول‌های سرطانی، نیاز به استفاده از توالی‌های اختصاصی یا بخش‌های برای هدفمندی و ارسال سم به دورن سلول می‌باشد (Fuchs et al. 2012).

این نتایج با ساختار دوم توالی پپتیدی سایر ژن‌ها نشان داد که پروتئین Abrin-a A chain (با شماره دسترسی 1ABR\_A) دارای ۹۸ اسیدآمینه در مارپیچ  $\alpha$  (۳۹/۰۴ درصد)، ۶ آمینو اسید در پیچ  $\beta$  (۲/۳۹ درصد) و ۱۰۳ آمینو اسید در مارپیچ تصادفی (۴۱/۰۴ درصد)، پروتئین گلوتنین Chain A (با شماره دسترسی 2ZRI\_A) دارای ۹۸ اسیدآمینه در مارپیچ  $\alpha$  (۳۹/۵۲ درصد)، ۷ اسیدآمینه در پیچ  $\beta$  (۳/۸۲ درصد) و ۱۰۱ اسیدآمینه در مارپیچ تصادفی (۴۰/۷۳ درصد) و پروتئین Natural Cinnamomin a-chain (با شماره دسترسی 2VLC\_A) نیز دارای ۹۴ اسیدآمینه در مارپیچ  $\alpha$  (۳۷/۹ درصد)، ۵ اسیدآمینه در پیچ  $\beta$  (۲/۰۲ درصد) و ۱۰۴ اسیدآمینه در مارپیچ تصادفی (۴۱/۹۴ درصد)، دارای بالاترین تشابه بودند.

پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین توالی پروتئینی کد شده توسط ABRAA نشان داد که ساختار سه بعدی این پروتئین مشابه با ساختار سه بعدی پروتئین abrin a-chain شناسایی شده توسط abrin a-chain (Tahirov et al. 1995) می‌باشد. این پروتئین شامل اسیدآمینه‌های ۱ تا ۱۰۹ بوده و از ۶ صفحه  $\beta$  و ۲ مارپیچ  $\alpha$  تشکیل شده‌است، دو مین ۲ نیز شامل اسیدآمینه‌های ۱۱۰ تا ۱۹۷ بوده و از ۵ مارپیچ  $\alpha$  تشکیل شده‌است، بررسی‌ها نشان می‌دهند توالی اسیدآمینه‌ای دمین ۲ در زنجیره A ابرین و ریسین به شدت حفاظت شده‌است که توالی این دمین با توالی دمین ۲ کد شده توسط ABRAA کاملاً مطابقت داشت (Tahirov et al. 1995). دو مین سوم که شامل اسیدآمینه‌های ۱۹۸ تا ۲۵۱ می‌شود و از ۲ صفحه  $\beta$ ، ۲ مارپیچ  $\alpha$  و یک مارپیچ تصادفی تشکیل شده‌است (شکل ۱۱).

### منابع

- Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J (2005) Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA The Journal of the American* 294:2342-51.  
 Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F (1993) Ribosome inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta* 1154:237-82.  
 Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides. *SignalP 3.0. Journal of Molecular Biology* 340:783-95.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Briesemeister S, Rahnenführer J, Kohlbacher O (2010) Going from where to why interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics* 26:1232-8.

- Carlini CR, Grossi MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15.
- Ferreras JM, Cidores L, Iglesias R, Jiménez P, Girbe's T (2011) Use of ribosome-inactivating proteins from sambucus for the construction of immunotoxins and conjugates for cancer therapy. *Toxins* 3:420-41.
- Fuchs H, Bachran C (2012) Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Press, Berlin, Germany, 1443-1487.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM (Ed.) The proteomics protocols handbook. Humana Press, New York 571-607.
- Hedge R, Maiti, TK, Podder SK (1991) Purification and characterization of three toxins and two agglutinins from *A. precatorius* seed by using lactamyl-sepharose affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 194:101-109.
- Hung CH, Lee MC, Chen JK, Lin JY (1994) Cloning and expression of three abrin A-chains and their mutants derived by site-specific mutagenesis in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* 219:83-7.
- Ikai A (1980) Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. *The Journal of Biochemistry* 88:1895-8.
- Karande AA, Bagaria K, Tiwari V (2017) A chimeric protein of abrin and *Abrus precatorius* agglutinin that neutralizes abrin mediated lethality in mice. *Toxicon* 127:122-129.
- Kimura M, Sumizawa T, Funatsu G (1993) The complete amino acid sequences of the B-chains of abrin-a and abrin-b, toxic proteins from the seeds of *Abrus precatorius*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57:166-169.
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.
- Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüne N, enugopalakrishnan V(2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry Biotechnology* 142:105-124.
- Mahmoodi A, Bezhan zadeh E, Shekari M (2014) Different methods of breaking seed dormancy on germination of forest plants *Acacia victoriae* and *Prsopis juliflora*. *Desert Ecosystem Engineering Journal* 4:35-42. (In Farsi).
- Mlsna D, Monzingo AF, Katzin BJ, Ernst S, Robertus JD (1993) Structure of recombinant ricin A chain at 2.3 Å. *Protein Science* 2:429-35.
- Nwodo NJ, Nwodo OFC (2012) Antitrypanosomal potentials of the extract and fractions of *Abrus precatorius* seeds. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 5:857-861.
- Olsnes S (2004) The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* 44:361-70.
- Pascal JM, Day PJ, Monzingo AF, Ernst SR, Robertus JD, Iglesias R, Pérez Y, Férreras JM, Cidores L, Girbés T (2001) 2.8-Å crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin 1. *Proteins* 43:319-326.
- Polito L, Bortolotti M, Pedrazzi M, Bolognesi A (2011) Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. *Toxins* 3:697-720.
- Prakash V, Nainwal A (2013) Enhancement Of Germination In *Abrus Precatorius L.* Seeds By Specific Pre-Sowing Treatments. *International Journal of Conservation Science* 4:237-242.
- Reyes AG, Anne J, Mejia A (2012) Ribosome – inactivating proteins with an emphasis on bacterial RIPs and their potential medical applications. *Future Microbiol* 7:705-717.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10:405-12.
- Tahirov TH, Lu TH, Liar YC, Chen YL, Lin JY (1995) Crystal structure of abrin-A at 2.14 Å. *Journal Molecular Biology* 250:354-357.
- Taur DJ, Patil RN, Patil RY (2017) Antiasthmatic related properties of *Abrus precatorius* leaves on various models. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 7:428-432.
- Wilkinson DL, Harrison RG (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* 9:443-8.