ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷
صفحه ۲۲۳ - ۲۱۵

همسانه‌سازی و بیان توالی کد کننده ABRaA در باکتری اشرشیاکلی

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

فریبا رفیعی[۱]، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری[۱]، هوشنگ علیزاده[*۱]
۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

Rafiei F[1], Shah Nejat Boushehri AA[1], Alizadeh H[*1]

1- 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 ان- 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 میزبان است. در این مطالعه، جداسازی توالی DNA کدکننده زنجیره A ابرین از گیاه *Abrus precatorius* با استفاده از تکنیک PCR انجام و در تی وکتور همسانه‌سازی شد. توالی حاصل به‌طول ۷۵۳ bp به‌عنوان 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

مقدمه

پروتئین‌های بازدارنده‌ی ریبوزومی (RIPs)[1]، خانواده‌ای از آنزیم‌ها با فعالیت ان- گلیکوزیدازی هستند که باعث آزاد شدن یک نوکلئوتید آدنین از زیرواحد ریبوزومی 60S می‌شوند (Stirpe 1992). RIPها بر اساس ساختار اولیه به دو گروه تقسیم می‌شوند. RIPهای نوع I که آنزیم‌های تک واحدی با وزن تقریبا ۳۰ کیلو دالتون و با فعالیت ان- گلیکوزیدازی هستند و هم‌چنین فراوان‌ترین نوع RIPهای موجود در طبیعت‌اند (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 میزبان است. این دو زنجیره توسط یک پیوند دی‌سولفیدی به‌صورت کووالان بهم متصل می‌شوند (Hegde et al. 1991). مهم‌ترین RIPهای گیاهی نوع II عبارتند از: ریسین[2]، ساپورین[3]، گلونین[4]و ابرین[5] (Ferreras et al. 2011). ابرین یک پروتئین سمی است که از گیاه *Abrus precatorius L.* به‌دست می‌آید (Carlini et al. 2002). *A.precatorius* گیاهی است چند ساله و از خانواده‌ی لگوم[6]، 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). تمام بافت‌های گیاه *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 به‌طور اختصاصی به گیرنده‌های سطحی سلول‌های یوکاریوتی متصل می‌شود، این گیرنده‌ها گلیکوپروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای هستند که دارای β- ۱ و ٤ متصل به رزیدوهای گالاکتوز می‌باشند، با اتصال زنجیره B به این گیرندها، زنجیره A ابرین، وارد سلول می‌شود (Olsnes 2004). هنگامی‌که زنجیره A سم ابرین به‌صورت اندوسیتوز وارد سلول می‌شود، اثرات سمی آن برروی ریبوزوم 60S منجر به مهار فاکتورهای طویل‌سازی EF-1 و EF-2 و جلوگیری از سنتز پروتئین شده، و نهایتا 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 ٤٣٢٤ rRNA *28S* زیرواحد 60S ریبوزوم، انجام می‌شود. rRNA پورین‌زدایی شده پس از آن، دیگرقادر نیست به فاکتور طویل سازی پروتئین (EF-2)، متصل شود، این امر منجر به توقف سنتز پروتئین و نهایتا مرگ سلول می‌شود (Karande et al. 2017; Audi et al. 2005). در واقع القاء مرگ سلولی برنامه ریزی شده[7] توسط ابرین می‌تواند نتیجه‌ی فرآیند آسیب به DNA به‌علت 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 (Reyes et al. 2012). بنابراین می‌توان از ابرین به‌عنوان یک القاء کننده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، در از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده نمود. در روش‌های جدید، از پروتئین‌های سمی، در طراحی و ساخت ایمنوتوکسین[8] استفاده می‌شود (Polito et al. 2011; Fuchs and Bachran 2012).

دسترسی محدود برای تهیه پروتئین سمی ابرین، روش‌های پیچیده استخراج، خالص‌سازی این پروتئین از گیاه و مقرون به صرفه نبودن این روش‌ها سبب شد تا در پی بیان این پروتئین دارویی در باکتری به‌منظور 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

[1] Ribosome inactivating protein
[2] Ricin
[3] Saporin
[4] Gelonin
[5] Abrin
[6] Leguminosae
[7] Apoptosis
[8] Immunotoxins

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

به شکل‌گیری ساختار پروتئین، امکان دست‌ورزی ژنتیکی وکتور بیان، صرفه جویی در هزینه و جمع آوری پروتئین‌های ترشح شده در محیط کشت می‌باشند (Li et al. 2007)، در این تحقیق جداسازی توالی کدکننده زنجیره A ابرین از ژنوم گیاه *A. precatorius* و بیان این پروتئین در سیستم پروکاریوتی *E.coli* مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور جداسازی توالی کدکننده زنجیره A پروتئین ابرین[1] (ABRaA)، بذر گیاه *A. precatorius* تهیه 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 ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس بذرها در ژرمیناتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (Prakash et al. 2013). پس از دو هفته بذرهای جوانه زده به محیط کوکوپیت، پیت و پرلیت با نسبت‌های ٤:۲:۱ انتقال داده شدند و بعد از گذشت دو ماه از رشد گیاه (شکل-۱)، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های گیاه به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام گرفت (Doyle and Doyle 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 Prmer3 طراحی شدند:

Forward: 5′-GAATTCGGATCCGAAGATAGGCCCATCAAGTTTTCCACTG-3′

Reverse: 5′-CTCGAGATTTGGCGGATTGCAGACAAAAAGCATC-3′

(در سمت ′۵ آغازگر پیشرو به‌ترتیب از جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Eco*RI- *Bam*HI و در سمت ′۵ آغازگر پیرو از جایگاه برشی آنزیم *Xho*I استفاده شد. آغازگرها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته شدند).

[1] ABRaA :Abrin-a A chain



الف ب

شکل ۱- الف) رشد بذرهای جوانه زده *Abrus precatorius* پس از دو هفته در ژرمیناتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۱٦ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی). ب) رشد گیاه *Abrus precatorius* پس از دو ماه.

برای تکثیر توالی DNA کدکننده ABRaA، واکنش PCR با غلظت نهایی ۱/٤ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۰/٤ میکرومولار آغازگر، ۲ میکرولیتر بافر (10X) و یک واحد آنزیم *Taq* DNA پلی‌مراز برای تکثیر انجام شد. برای دستیابی به دمای بهینه، تکثیر به صورت شیب دمایی از ۵۵ تا ٦۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت تا دمای مناسب آغازگرها تعیین شود. به این منظور واسرشته‌سازی اولیه در دمای ^{o}C ۹٤ به مدت ٤ دقیقه و ۳۳ چرخه حرارتی شامل مرحله واسرشته‌سازی در دمای ^{o}C۹٤ به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ^{o}C ٦۵- ۵۵ به مدت ٤۵ ثانیه و زمان بسط DNA در دمای ^{o}C۷۲ به مدت ٦۰ 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 به‌کار گرفته شد. برای این منظور غلظت نهایی اجزای واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۱/۵ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، یک واحد آنزیم *Pfu* (Bio Basic, Canada) DNAPolymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ٤ دقیقه در دمای ^{o}C۹٤ و ۳۳ چرخه حرارتی شامل مرحله واسرشته‌سازی در دمای ^{o}C۹٤ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ^{o}C۵۸ به مدت ٤۵ ثانیه و زمان بسط DNA در دمای ^{o}C۷۲ به مدت دو دقیقه و هم‌چنین بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد به مدت ٤۵ دقیقه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

تفکیک شد و سپس با استفاده از کیت تخلیص از ژل Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) استخراج شد. قطعه حاصل پس از افزودن تک نوکلئوتید A در تی‌وکتور pTG19 (Vivantis, Malaysia) طبق دستورالعمل آن شرکت همسانه‌سازی شد. واکنش الحاق با استفاده از آنزیم *T4* DNA Ligase (Takara, 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). برای غربال سلول‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، ازمحیط کشت حاوی آنتی بیوتیک 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 قلیایی انجام شد (Sambrook and Russell 2001) و هضم آنزیمی طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز، 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 *Bam*HI/*Xho*I در ناقل بیانی (pETABRaA) pET28a+ قرار گرفت. سپس انتقال pETABRaA به میزبان بیانی Bl21 (DE3) مطابق دستورالعمل (Sambrook and Russell 2001) صورت گرفت. تک کلون‌ها از سویه Bl21 (DE3) حاوی سازه مورد نظر به‌صورت کشت شبانه در محیط کشت LB حاوی کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. روز بعد کشت شبانه با محیط تازه به نسبت ۱:۲۰رقیق شد و پس از رسیدن به OD_{600} ۰/۳ تا ۰/۵، به محیط کشت باکتری IPTG[1] با غلظت ۰/۸ میلی‌مولار اضافه شد. نمونه‌ها در دمای۳۷ 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 ٤٠٠٠×g به مدت ۷ دقیقه رسوب داده شدند. استخراج پروتئین کل از باکتری با استفاده از دستگاه فراصوت با امواج صوتیw ۹۰ (سه سیکل ۱۵ ثانیه‌ای) انجام شد و پروتئین‌های حاصل با استفاده از ۱۰SDS-PAGE درصد بررسی شدند. تخلیص پروتئین نوترکیب با استفاده از کیت Ni-NTA Agaros (Qiagen, Germany) انجام شد. برای تأیید پروتئین مورد نظر روش وسترن بلات با استفاده از آنتی بادی هیستیدین در رقت ۱:۳۰۰۰ و آنتی بادی اختصاصی با رقت ۱:٦۰۰ انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از برنامه Expasy مورد ترجمه قرار گرفته و خصوصیات بیوشیمیایی توالی اسیدآمینه به‌دست آمده، شامل شاخص‌های آلیفاتیک، آب‌گریزی و ناپایداری با استفاده از برنامه‌های ProtParam و ProtScale به روش Doolittle (1982) and Kyte مورد بررسی قرار گرفت (Gasteiger et al. 2005). همچنین پیش‌بینی موقعیت درون‌سلولی پروتئین کد شده توسط توالی ABRaA با استفاده از برنامه YLOC (Briesemeister et al. 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. هم‌ردیفی چندگانه توالی پروتئینی ABRaA با استفاده از نرم‌افزار Clustal Omega انجام شد. بررسی وجود سیگنال پپتید، با کمک برنامه SignalP 4.1 انجام شد.

نتایج و بحث

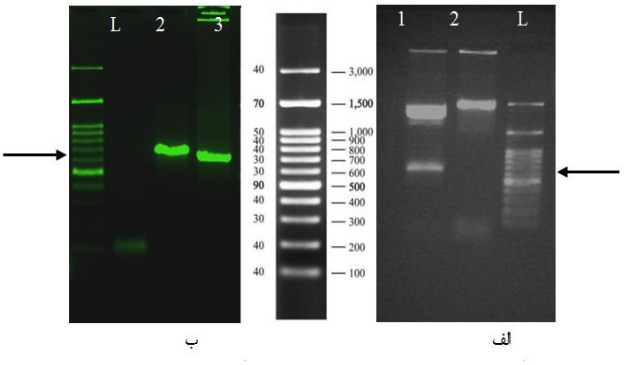
طبق نتیجه حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که به صورت شیب دمایی ۵۵ تا ٦۵ درجه سانتی‌گراد، و با آنزیم *Taq* DNA پلی‌مراز انجام شد، قطعه ABRaA در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد تکثیر شد (شکل۲- الف). به‌منظور تکثیر با آنزیم *Pfu* پلی‌مراز دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای تکثیر انتخاب شد. قطعه مورد استفاده ABRaA برای همسانه‌سازی در تی وکتور pTG19 در حضور آنزیم *Pfu* پلی‌مراز تکثیر شد (شکل۲- ب).

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

[1] Isopropyl B-D-thiogalactopyranoside

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

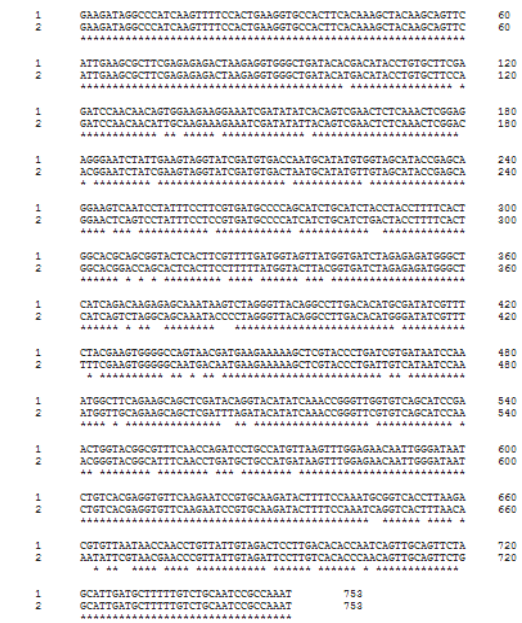
مورد تایید قرار گرفتند (شکل۳). نتیجه حاصل از توالی‌یابی ABRaA و بررسی هم‌ردیفی آن نشان داد که قطعه همسانه‌سازی شده، ژن کدکننده زنجیره A ابرین است (شکل٤). بنابراین توالی DNA ژنومی کد کننده ABRaA با شماره دسترسی MF573784 برای اولین بار در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank ثبت شد. طول این توالی bp ۷۵۳ بوده و یک پروتئین با ۲۵۱ اسید آمینه را کد می‌نماید. بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین به‌دست آمده نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده توالی پروتئینی ژن ABRaA با فرمول مولکولی $C_{1233}H_{1948}N_{356}O_{387}S_4$ به‌ترتیب برابر ۲۸/۰۷ کیلو دالتون و ۵/٦٦ است. همچنین شاخص ناپایداری این پروتئین در لوله آزمایش ٤١/٨٣ بود که نشان دهنده‌ی ناپایداری این پروتئین است. ضریب آلیفاتیک پروتئین که بیانگر حجم اشغال شده توسط زنجیره جانبی اسیدآمینه های Ala، Val، Leu و Ile می باشد، ۸۷/۸۱ تعیین شد که نشان‌دهنده مقاومت حرارتی بالای این پروتئین است (Ikai 1980). شاخص آب‌گریزی[1] محاسبه شده نشان داد که توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA به‌میزان زیادی آب دوست بوده و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۲۹ اسید آمینه دارای بار منفی (Asp+Glu) و ۲۵ اسید آمینه با بار مثبت (Arg+Lys) بودند.



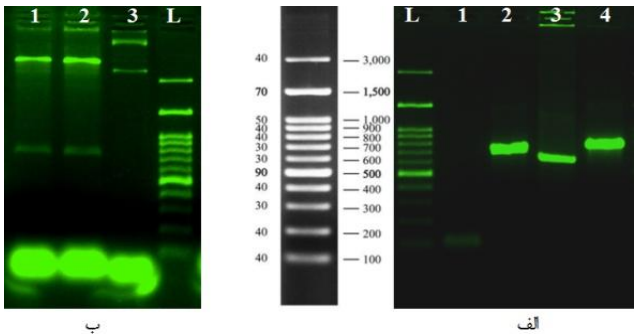
شکل ۳- تائید حضور قطعه ABRaA در تی وکتور و نمایش بر روی ژل آگارز یک درصد. الف) شماره‌های ۲ و ۳ مربوط به کلونی PCR برای قطعه ABRaA و شماره ۱ شاهد منفی (بدون الگو) می‌باشد. ب) شماره ۱ هضم آنزیمی تی‌وکتور حاوی قطعه ABRaA به‌طول ۷۵۳ جفت‌باز با آنزیم‌های *Bam*HI/*Xho*I. جهت انتقال قطعات به ناقل pET28a+ و شماره ۲ پلاسمید برش نخورده حاوی قطعه ABRaA. L نشانگر (100 bpPlus DNA Ladder Sinaclon).

[1] Hydropathy

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 پپتید نشانه است، چون برای وجود پپتید نشانه باید نمره‌ی D از ۰/٤٥ بیش‌تر باشد که برای پروتئین فوق عدد ۰/۰۹۹ ثبت شد که بر عدم حضور پپتید نشانه دلالت دارد (Bendtsen et al. 2004).

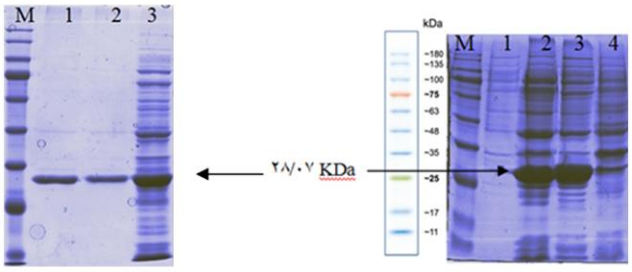


شکل ٤- بررسی هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی ژن ABRaA با توالی نوکلئوتیدی cDNA کدکننده زنجیره A ابرین با شماره دسترسی X76720

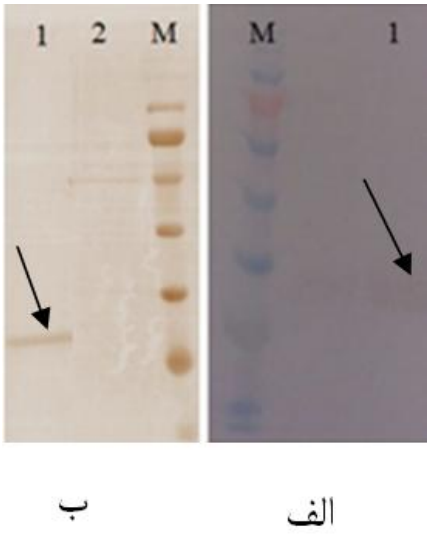


شکل ۵- تائید حضور قطعه ABRaA در ناقل pET28a+ و نمایش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. الف) شماره‌های ۲، ۳ و ٤ مربوط به کلونی PCR پلاسمیدهای pETABRaA حاوی قطعه ABRaA و شماره ۱ شاهد منفی (بدون الگو) می‌باشد. ب) شماره ۱ و ۲ هضم آنزیمی pETABRaA با آنزیم‌های *Bam*HI/*Xho*I. شماره ۳ پلاسمید برش نخورده حاوی قطعه ABRaA. L نشانگر (100bp DNA ladder Sinaclon).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]



شکل ٦- نتیجه بیان و خالص سازی ABRaA از القای باکتری BL21 (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 واسرشته و نمونه ۳ نمونه پروتئین کل محلول استخراج شده با فراصوت. ب) شماره‌های ۱و 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 فراصوت. M نشانگر (Prestained Protein marker Sinaclone).



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

به‌منظور 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 *Bam*HI/*Xho*I، حضور قطعه تایید شد (شکل۵).

پروتئین‌های القا شده در سویه Bl21 (DE3) بر روی SDS-PAGE ده درصد تفکیک شدند (شکل ٦). مطابق انتظار پروتئین موردنظر با وزن ۲۸/۰۷ kDa بیان شد. با توجه به شکل ٦ پروتئین نوترکیب حاصل به‌صورت محلول و همچنین پروتئین بادی به‌دست آمد. طبق پیش بینی برنامه ProtScale و بر اساس آب دوست‌بودن پروتئین، انتظار می‌رود که پروتئین به‌صورت محلول تولید شود. اما بخش زیادی از پروتئین به‌صورت 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 وسترن با به کار گیری آنتی‌بادی هیستیدین و هم‌چنین آنتی‌بادی اختصاصی مورد تائید قرار گرفت (Sambrook and Russell 2001) (شکل۷- ب). نتیجه موفقیت‌آمیز وسترن نشان می‌دهد که میانکنش اختصاصی بین پروتئین نوترکیب و آنتی‌بادی اختصاصی صورت گرفته است (شکل ۷- ج).

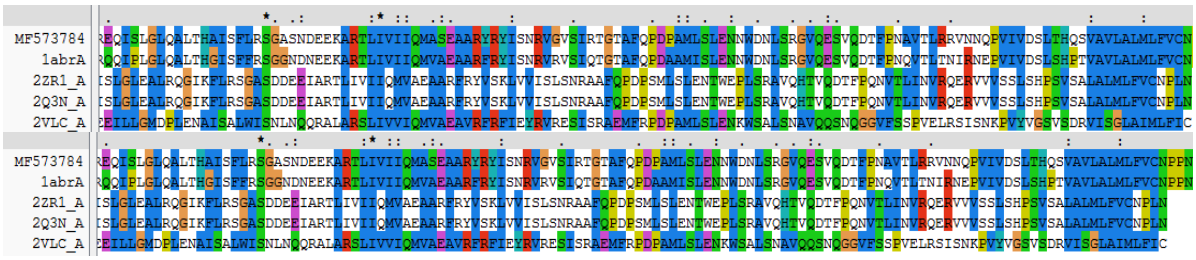
بررسی توالی آمینواسیدی نشان داد که توالی کدکننده ABRaA مانند توالی پروتئینی ژن *Abrin-a A chain* (شماره دسترسی 1ABR_A) دارای یک اسیدآمینه Cys در موقعیت حفظ شده Cys247 است این آسیدمینه نقشی کلیدی در ایجاد پیوند دی‌سولفیدی بین زنجیره A و زنجیره B ابرین دارد (Tahirov et al. 1995)، هم‌چنین توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA دارای یک جایگاه فعال با ۵ اسیدآمینه ثابت Tyr74، Tyr113، Glu164، Arg167، Try198 و ۵ اسیدآمینه در موقعیت‌های حفظ شده Asn72، Arg124، Gln160، Glu195 و Asn196 است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که ۵ اسیدآمینه ثابت Tyr74، Tyr113، 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 شده‌است که Glu164 و Arg167 این پروتئین مستقیما در فعالیت کاتالیزوری هیدرولیز کردن پیوند ان – سی گلیکوزیداسیون نقش دارند (Tahirov et al. 1995) بررسی‌ها نشان می‌دهند که دو اسیدآمینه Glu164 و Arg167 در ابرین و ریسین، نقش کلیدی در ممانعت از بیوسنتز پروتئین ایفا می‌کنند (Hung et al. 1994). پیش‌بینی موقعیت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

درون‌سلولی این پروتئین نیز نشان داد محل فعالیت آن مشابه سایر زنجیره‌های A موجود در ساختار RIPهای نوع II، ستوپلاسم 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.

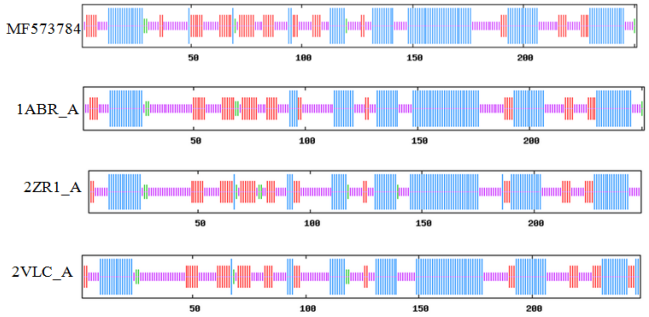
نتایج بررسی توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA با تعدادی از توالی‌های پروتئینی زنجیره A نشان داد که بالاترین تشابه را با ژن *Abrin-a A chain* به میزان ۸٤ درصد یکسانی دارد (شکل ۹). با بررسی تشابه ساختار دوم زنجیره A ابرین کد شده توسط توالی ABRaA مشخص شد که این پروتئین دارای ۹٦ اسیدآمینه در مارپیچ α (۳۸/۲۵ درصد)، ٦ اسیدآمینه در پیچ β (۲/۳۹ درصد) و ۹۸ آمینو اسید در مارپیچ تصادفی (۳۹/۰٤ درصد) است (شکل ۱۰).



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 نرم‌افزار ClustalX.

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

ردیف	نام علمی گیاه	میزان E-value	میزان شباهت	نام ژن	شماره دسترسی
۱	*Abrus precatorius*	4e-158	٪۸٤	*Abrin-a A chain*	1ABR_A
۲	*Abrus precatorius*	2e-125	٪٦۹	*Chain A, Agglutinin*	2ZR1_A
۳	*Abrus precatorius*	2e-125	٪٦۹	*Chain A, Agglutinin(Apa-I)*	2Q3N_A
٤	*Abrus precatorius*	5e-68	٪۵۰	*Chain A, Crystal Structure Of Natural Cinnamomin*	2VLC_A



شکل ۱۰- ساختار دوم توالی پروتئینی کد شده توسط ژن ABRaA با استفاده از برنامه SOPMA و مقایسه آن با توالی‌های پپتیدی مشابه. مارپیچ‌های α، صفحات β، پیچ‌های β و مارپیچ‌های تصادفی به‌ترتیب با خطوط آبی، قرمز، سبز و بنفش نشان داده شده‌اند.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

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 α (۳۹/۰٤ درصد)، ٦ آمینو اسید در پیچ β (۲/۳۹ درصد) و ۱۰۳ آمینو اسید در مارپیچ تصادفی (٤۱/۰٤ درصد)، پروتئین Chain A گلوتنین (با شماره دسترسی 2ZR1_A) دارای ۹۸ اسیدآمینه در مارپیچ α (۳۹/۵۲ درصد)، ۷ اسیدآمینه در پیچ β (۳/۸۲ درصد) و ۱۰۱ اسیدآمینه در مارپیچ تصادفی (٤۰/۷۳ درصد) و پروتئین a-chain گیاه *Natural Cinnamomin* (با شماره دسترسی 2VLC_A) نیز دارای ۹٤ اسیدآمینه در مارپیچ α (۳۷/۹ درصد)، ۵ اسیدآمینه در پیچ β (۲/۰۲ درصد) و ۱۰٤ اسیدآمینه در مارپیچ تصادفی (٤۱/۹٤ درصد)، دارای بالاترین تشابه بودند.

پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین توالی پروتئینی کد شده توسط ABRaA نشان داد که ساختار سه‌بعدی این پروتئین مشابه با ساختار سه بعدی پروتئین abrin a a-chain شناسایی شده توسط (Tahirov et al. 1995) می‌باشد. این پروتئین abrin a a-chain از سه دمین تشکیل شده‌است که دمین ۱ شامل اسیدآمینه‌های ۱ تا ۱۰۹ بوده و از ٦ صفحه β و ۲ مارپیچ α تشکیل شده‌است، دومین ۲ نیز شامل اسیدآمینه‌های ۱۱۰ تا ۱۹۷ بوده و از ۵ مارپیچ α تشکیل شده‌است، بررسی‌ها نشان می‌دهند توالی اسیدآمینه‌ای دمین ۲ در زنجیره A ابرین و ریسین به‌شدت حفاظت شده‌است که توالی این دمین با توالی دمین ۲ کد شده توسط ABRaA کاملا مطابقت داشت (Tahirov et al. 1995). دومین سوم که شامل اسیدآمینه‌های ۱۹۸ تا ۲۵۱ می‌شود و از ۲ صفحه β، ۲ مارپیچ α و یک مارپیچ تصادفی تشکیل شده‌است (شکل۱۱).



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 کدکننده زنجیره A ابرین جداسازی و پس از تایید توالی‌یابی و بررسی خصوصیات ساختاری و بیوشیمیایی با استفاده از نرم‌افزارهای 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 ریبوزومی نوع II مشاهده شد، این پروتئین مشابه با ریسین و سایر پروتئین‌های بازدارنده ریبوزومی 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 به‌منظور 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).

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]

Carlini CR, Grossi MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon 40:515-1539.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19:11-15.

Ferreras JM, Citores L, Iglesias R, Jime´nez P, Girbe´ sT (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 R D, 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* 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 hydropathic 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 *Prspopis 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 A. 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, Citores L, Girbés T (2001) 2.8-A crystal structure of a nontoxic type-II ribosome-inactivating protein, ebulin l. 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 – inactiveating 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 A. 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.2.5.4]