مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۱۹۳/هفته سوم مردادماه ۱۳۹۱

مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۱۱

بهینه‌سازی تولید و خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز موتاسیون یافته در ناحیه‌ی N666E

دکتر حمید میرمحمدصادقی[۱]، دکتر محمد ربانی[۲]، سمانه عصارزاده[۳]، فاطمه مؤذن[۴]

چکیده

مقدمه: آنزیم Taq پلیمراز به صورت گسترده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) کاربرد دارد. یکی از قسمت‌های مهم دخیل در فعالیت این آنزیم، منطقه‌ی O-helix آنزیم می‌باشد. طی تحقیقات قبلی یک وکتور بیانی شامل موتاسیون Asn-666-Glu بر روی ژن آنزیم طراحی شده است. به منظور بررسی تأثیر این موتاسیون بر روی فعالیت آنزیم در ابتدا باید به خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز پرداخت. هدف از این پروژه، جداسازی و خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز نوترکیب از گونه‌ی باکتری اشرشیاکلی Bl_{21} بود.

روش‌ها: در این مطالعه پس از ترانسفورم کردن سلول‌های پذیرا با پلاسمید حاوی ژن Taq پلیمراز موتانت شده در ناحیه‌ی N666E و القای بیان آنزیم با ایزوپروپیل بتا تیوگالاکتوزید (Isopropyl β-D thiogalactopyranoside یا IPTG) از روش‌های خالص‌سازی Desai، پروتکل Desai بهینه‌سازی شده، رزین- نیکل (Ni-NTA His.Bind Resins)، تری کلرو استیک اسید (Trichloroacetic acid یا TCA) و رفولدینگ (Refolding) به منظور تخلیص آنزیم Taq پلیمراز استفاده گردید و در نهایت به مقایسه‌ی این روش‌ها با یکدیگر پرداخته شد.

یافته‌ها: در مقایسه‌ی نتایج با یکدیگر، استفاده از پروتکل Desai علاوه بر این که باندی شارپ در ناحیه‌ی مورد انتظار (۹۴ کیلودالتون) ایجاد نمود، در سایر نواحی نیز باندهایی دیده شد؛ اما پس از بهینه‌سازی پروتکل Desai تنها باند مورد نظر قابل مشاهده بود. با استفاده از تری کلرو استیک اسید و رزین- نیکل باندهای دیده شده در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون ضعیف بود و گاهی باندهای دیگری در سایر نواحی دیده شد. با رفولدینگ آنزیم، باند ایجاد شده در ناحیه‌ی ۶۶ کیلودالتون مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: روش خالص‌سازی Desai که با استفاده از RNase و DNase بهینه‌سازی شده انجام شد، باعث ایجاد باندی واضح و مناسب در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون گردید. استفاده از تری کلرو استیک اسید به منظور رسوب پروتئین‌هایی که با حرارت از بین نرفته‌اند و استفاده از رزین- نیکل باعث حذف تقریبی باندهای ناخواسته شد، هر چند مقدار آنزیم مورد نظر را نیز در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون کاهش داد. در مورد باند ۶۶ کیلودالتون ایجاد شده در فرایند رفولدینگ آنزیم، این احتمال وجود دارد که در حین جداسازی اینکلوژن بادی‌ها از سلول، باقی ماندن آنزیم پروتئاز باعث شکست آنزیم در این ناحیه شده باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم Taq پلیمراز نوترکیب، خالص‌سازی Desai، O-helix mutation

مقدمه

آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت یکی از آنزیم های بسیار مهم در مطالعات بیولوژیکی- مولکولی (نظیر تکثیر DNA و Sequencing آن) می‌باشد (۲-۱). آنزیم Taq پلیمراز با وزن مولکولی ۹۴ کیلودالتون، یک DNA پلیمراز مقاوم به حرارت است که از باکتری مقاوم به حرارت Thermus aquatiqus جدا شده است (۳) و با آنزیم Ecoli pol I (Escherichia coli polymerase I) در یک گروه جای دارد (۴). این آنزیم در شرایط حرارت بالا، که

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای به شماره‌ی ۳۸۹۳۰۴ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

[۱] استاد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استاد، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] دانشجوی دکترای داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حمید میرمحمدصادقی
Email: h_sadeghi@pharm.mui.ac.ir

به طور معمول طی فرایند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase chain reaction یا PCR) اعمال می‌گردد، پایدار است و به همین دلیل جایگزینی مناسب برای DNA پلیمراز Ecoli محسوب می‌شود (۵).

PCR تکنیکی است که در تکثیر DNA، کلونینگ آن و دیگر فرایندهای آزمایشگاهی کاربرد دارد. در این میان فعالیت و دقت آنزیم Taq پلیمراز تأثیر زیادی بر نتایج دارد (۶). به نظر می رسد یکی از نواحی فعال آنزیم Taq پلیمراز، ناحیه‌ی O-helix باشد؛ اسید آمینه‌های Asp-785، Glu-786 و Asp-610 در ناحیه‌ی کاتالیتیکی تمام DNA پلیمرازهای گروه یک وجود دارد (۱). طی تحقیقات انجام گرفته نقش اسید آمینه های Arg-659، Lys-663، Phe-667 و Tyr-671 (۶-۷) و Ile-663 (۸) ناحیه‌ی O-helix در کاهش فعالیت و دقت آنزیم Taq پلیمراز مشخص شده است. بنابراین به نظر می‌رسد که ناحیه‌ی O-helix آنزیم Taq پلیمراز نقش مهمی را در فعالیت و دقت آنزیم ایفا کند.

از آن جایی که هیچ اطلاعاتی مبنی بر نقش اسیدآمینه گلوتامیک اسید ۶۶۶ در دسترس نیست، طی تحقیقات قبلی یک وکتور بیانی شامل موتاسیون Asn 666 Glu در ژن آنزیم Taq پلیمراز طراحی شده است (۹). به منظور بررسی اثر این موتاسیون بر روی فعالیت و دقت آنزیم Taq پلیمراز، در ابتدا تخلیص آنزیم ضروری به نظر می رسد. به همین منظور به بررسی انواع روش‌های خالص‌سازی پرداخته شد.

Lawyer و همکاران روشی را برای تخلیص آنزیم Taq پلیمراز ارائه دادند که مبتنی بر ویژگی پایداری حرارتی این آنزیم بود (۱۰). یک سال بعد Engelke و همکاران در ادامه‌ی آن از پلی اتیلن ایمین (PEI) به منظور رسوب آنزیم استفاده کردند و در نهایت به کمک رزین تعویض یونی به تخلیص آنزیم پرداختند (۱۱). Pluthero نیز علاوه بر استفاده از ویژگی های پایداری حرارتی، از آمونیوم سولفات برای تغلیظ آنزیم استفاده نمودند و در نهایت دیالیز کردند (۱۲). Desai و Pfaffle روش ساده شده‌ای از سه روش گذشته برای تخلیص آنزیم پیشنهاد دادند که فقط از ویژگی پایداری حرارتی آنزیم استفاده نمود (۱۳). فرایند ذوب و فریز کردن (۱۴)، کروماتوگرافی میلی (۱۵)، Affibody ligand (۱۶) و DNA aptamer پایدار شده بر روی پرل مغناطیسی (۱۷) از دیگر پروتکل‌های استفاده شده به منظور خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز هستند. در این تحقیق با مقایسه‌ی روش‌های گوناگون، از ساده‌ترین و کارآمدترین روش تخلیص آنزیم Taq پلیمراز استفاده شد.

روش‌ها

پلاسمید نوترکیب pET15b (Invitrogen, USA) برای بیان ژن مورد نظر، طی یک پروژه‌ی تحقیقاتی در دانشکده‌ی داروسازی اصفهان تهیه و استفاده گردید (۹). آنزیم Taq پلیمراز از BioRon (تهران، ایران) خریداری شد.

محیط کشت LB (Luric-Bertani) طبق روش کتاب Sambrook تهیه گردید (۱۸). غربال گری بر اساس مقاومت آنتی بیوتیکی محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (Sigma) انجام گرفت. مابقی مواد شیمیایی از شرکت‌های معتبر خریداری شد.

سلول‌های پذیرا با استفاده از E.coli $DH_5\alpha$ (سیناژن، تهران، ایران) و E.coli BL_{21} (DE_3)

www.mui.ac.ir

(استراتوژن، La Jolla، Calif) و طبق پروتکل استاندارد $CaCl_2$ تهیه شد (۱۸). سپس سلول‌های پذیرا با وکتور pET15b حاوی توالی Taq پلیمراز موتاسیون‌یافته ترانسفورم گردید (۱۰). جهت انجام ترانسفورماسیون ابتدا باکتری و وکتور به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ نگهداری شد و سپس به مدت ۴۵ ثانیه در معرض شوک حرارتی (۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) قرار گرفت و باکتری ترانسفورم شده در ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت سوسپانسون گردید و به مدت ۴۰ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار داده شد و در نهایت روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین (Sigma, St. Louis, Mo) پخش گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۸).

برای انجام تلقیح محیط کشت و القای بیان آنزیم Taq پلیمراز ۲۵۰ میکرولیتر از محیط کشت شبانه به ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین اضافه شد. ارلن‌ها در شیکر انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. هنگامی که نمودار رشد باکتری‌ها به نیمه‌ی فاز لگاریتمی رسید (OD600 = ۰/۵)، عمل القا صورت گرفت. جهت القا، IPTG (Isopropyl β-D thiogalactopyranoside) با غلظت ۱ میلی مولار افزوده شد. سپس نمونه‌ها دوباره در شیکر انکوباتور به مدت زمان ۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد شیک شدند. در نهایت نمونه‌های القا شده سانتریفیوژ گردید تا سلول‌های باکتری رسوب کند و پلت میکروب ها در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۸).

خالص سازی آنزیم Taq پلیمراز موتانت شده به سه روش انجام شد.

تخلیص آنزیم Taq پلیمراز به روش Desai

پلت باکتری‌ها با ۲۵۰ بافر A (۵۰ Tris-HCl میلی‌مولار، دکستروز ۵۰ میلی‌مولار، ۱ EDTA میلی‌مولار و pH = ۷/۹) که حاوی ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیزوزیم بود، مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس به همان حجم بافر B (۰/۵ Nonidet P-40 درصد، ۰/۵ Tween 20 درصد، ۱ EDTA میلی‌مولار، ۵۰ KCl میلی‌مولار) افزوده شد و به بن ماری ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت منتقل گردید. در خلال این مدت نمونه‌ها مرتب تکان داده شدند.

سپس نمونه‌ها با سرعت g × ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی به یک لوله‌ی اپندروف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و به اندازه‌ی حجم نمونه به آن بافر S (۰/۱ EDTA میلی‌مولار، ۱۰۰ NaCl میلی‌مولار، ۱ Triton X-100 درصد، ۵۰ Tris-HCL میلی‌مولار، ۰/۵ DTT میلی مولار با pH = ۸) حاوی ۷۵ درصد گلیسرول اضافه شد و هموژن گردید و سپس در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری و در نهایت روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد (۱۴). پیرو بهینه سازی روش Desai به منظور حذف آلودگی های نوکلئیک اسیدی، ۲۰۰۰ واحد آنزیم DNase پس از مرحله ی سانتریفوژ به پلت اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس در دمای ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال گردید. این مرحله با آنزیم RNase نیز انجام گرفت (۱۳).

خالص‌سازی پروتئین توسط رزین- نیکل

به مایع رویی حاصل از مرحله ی سوم روش Desai،

۵۰ میکرولیتر رزین Ni-NTA His bind Resin اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت و در حین این مدت مرتب تکان داده شد.

به منظور رسوب رزین نمونه ها به مدت ۱۰ ثانیه و به سرعت g × ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و محلول رویی حاوی پروتئین های غیر متصل به رزین، دور ریخته شد. در مرحله‌ی بعد ۱۰۰ میکرولیتر بافر شستشودهنده (۲۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات و ۳۰۰ نیلی‌مول NaCl با pH = ۸) به رزین اضافه شد و دوباره با سرعت g × ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید؛ سپس مایع رویی با دقت جدا شد و این مرحله تکرار شد.

به رسوب حاصل، ۲۰ میکرولیتر از بافر رقیق‌کننده (۲۵۰ میلی مولار ایمیدازول و ۵۰ میلی مولار سدیم فسفات و ۳۰۰ میلی‌مولار NaCl با pH = ۸) اضافه شد و سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی جدا شد و این مرحله تکرار شد و سانتریفوژ گردید. مایع رویی به ماحصل قبلی اضافه شد و هم حجم آن بافر S حاوی ۷۵ درصد گلیسرول افزوده گردید و سپس در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. در نهایت روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد (۱۹).

خالص‌سازی به کمک تری‌کلرو استیک اسید (TCA)

به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی باقی مانده از مرحله‌ی سوم روش Desai، ۱۰۰ میکرولیتر TCA، ۱۰ V/V اضافه شد و پس از ۱۵ ثانیه ورتکس، به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد.

در مرحله‌ی بعد نمونه‌ها با سرعت g × ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پلت باقی مانده ۲ بار هر بار با ۱۰۰ میکرولیتر استون شسته شد و هر بار به مدت ۵ دقیقه با دور g × ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محتوای ویال در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت خشک شد. در نهایت به اندازه ی حجم نمونه به آن بافر S حاوی ۷۵ درصد گلیسرول افزوده شد و هموژن گردید و در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه داشته شد (۲۰).

رفولدینگ آنزیم Taq پلیمراز موتانت شده

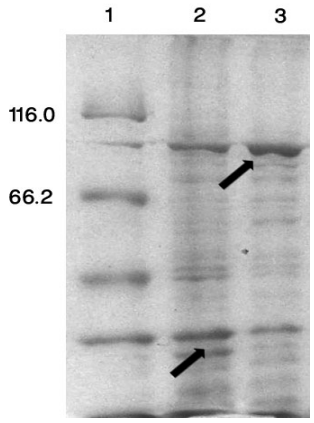
ابتدا به هر کدام از پلت باکتری ها ۵۰۰ میکرولیتر محلول حاوی ۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl و ۵۰۰ میلی مولار NaCl اضافه شد. به هر کدام از نمونه‌ها ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر لیزوزوم اضافه شد و نمونه‌ها ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس سانتریفوژ گردید (با دور g × ۱۰۰۰۰، ۳۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد).

پس از سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد و به هر کدام از نمونه‌ها ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی ۶ مول Guanidin اضافه شد و سوسپانسیون گردید. نمونه ها ۶۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ محلول رویی دور ریخته شد و پلت باقی‌مانده با ۵۰۰ میکرولیتر EDTA ۵ میلی‌مولار، ۰/۰۱ Tween، ۶ مول Guanidin، ۱۰ میلی مولار گلوتاتیون احیا، ۱ میلی مولار گلوتاتیون اکسید، ۰/۷ مول آرژنین و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سرم آلبومین رقیق شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه ی سانتی‌گراد نگهداری گردید. در نهایت نمونه‌ها در یک تیوب اپندروف ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در بافر Tris و EDTA به مدت ۱۶ ساعت، در دمای ۸ درجه‌ی سانتی‌گراد دیالیز گردید. در طی این مدت بافر دیالیز ۳ مرتبه تعویض شد (۲۱).

www.mui.ac.ir

یافته‌ها

در این مطالعه پروتکل‌های مختلفی برای خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز انجام گرفت. شکل ۱ نمایی از ژل SDS-PAGE آنزیم Taq پلیمراز فاقد و حاوی موتاسیون خالص شده با روش Desai و Pfaffle را نشان می‌دهد.



شکل ۱. الکتروفورز نمونه‌های تخلیص شده آنزیم Taq پلیمراز حاوی و فاقد موتاسیون به روش Desai

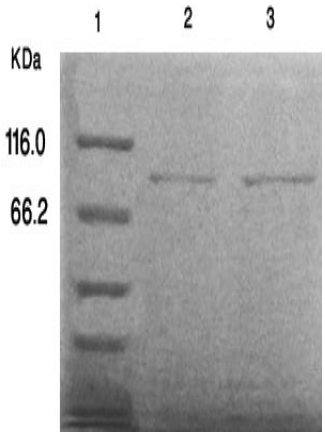
ستون ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین

ستون ۲: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم فاقد موتاسیون با روش Desai

ستون ۳: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم حاوی موتاسیون با روش Desai

باند مورد انتظار در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون در هر دو ستون مربوط به آنزیم Taq پلیمراز فاقد موتاسیون (ستون ۲) و حاوی موتاسیون (ستون ۳) مشاهده می‌شود. علاوه بر باندهای مد نظر باندهای دیگری در سایر نواحی قابل مشاهده است.

شکل ۲ ژل SDS-PAGE آنزیم Taq پلیمراز فاقد و حاوی موتاسیون خالص شده با روش Desai را نشان می‌دهد که با اضافه کردن آنزیم DNase بهینه سازی شده است. در هر دو ستون مربوط به آنزیم فاقد موتاسیون (ستون ۲) و حاوی موتاسیون (ستون ۳) باند مورد انتظار در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون دیده شد و سایر باندهای اضافی حذف شدند.



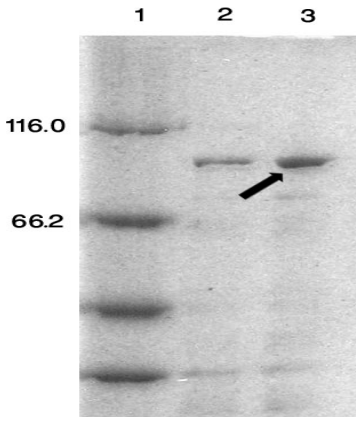
شکل ۲. آنزیم خالص شده به روش Desai با کمک DNase

ستون ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین.

ستون ۲: نمونه‌های خالص شده‌ی آنزیم فاقد موتاسیون به روش Desai با استفاده از آنزیم DNase

ستون ۳: نمونه‌های خالص شده‌ی آنزیم حاوی موتاسیون به روش Desai با استفاده از آنزیم DNase

شکل ۳ ژل SDS-PAGE آنزیم Taq پلیمراز فاقد و حاوی موتاسیون خالص شده با روش Desai را نشان می‌دهد که این بار با اضافه کردن آنزیم RNase بهینه‌سازی شده است.



شکل ۳. آنزیم خالص شده به روش Desai با کمک RNase

ستون ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین

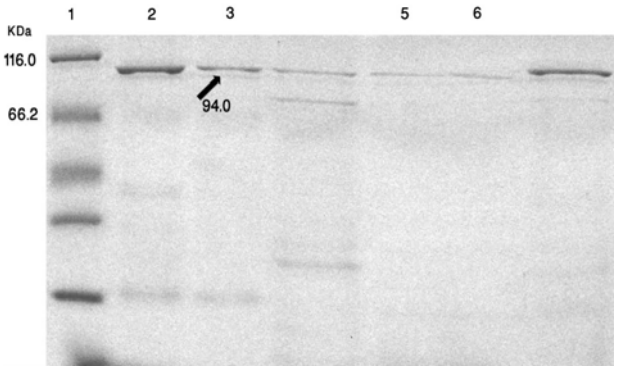
ستون ۲: نمونه‌های خالص شده‌ی آنزیم فاقد موتاسیون به روش Desai با استفاده از آنزیم RNase

ستون ۳: نمونه‌های خالص شده‌ی آنزیم حاوی موتاسیون به روش Desai با استفاده از آنزیم RNase

در هر دو ستون مربوط به آنزیم فاقد موتاسیون (ستون ۲) و حاوی موتاسیون (ستون ۳) باندی شارپ در ناحیه‌ی مورد انتظار (۹۴ کیلودالتون) دیده شد و سایر باندهای اضافی حذف شدند.

شکل ۴ ژل SDS-PAGE آنزیم Taq پلیمراز فاقد و حاوی موتاسیون خالص شده با روش Desa الحاق یافته با روش‌های Ni-NTA His bind Resin و TCA را نشان می‌دهد.

در این شکل باند مورد انتظار در ناحیه‌ی ۹۴ کیلو دالتون در هر دو ستون مربوط به Taq پلیمراز فاقد موتاسیون (ستون ۲ و ۵) و حاوی موتاسیون (ستون ۳ شده بسیار ضعیف است باندهایی با وزن مولکولی کمتر نیز در سایر نواحی به چشم می‌خورد.



شکل ۴. نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم فاقد و حاوی موتاسیون، با استفاده از رزین Ni- NTA His bind Resin و TCA

ستون ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین

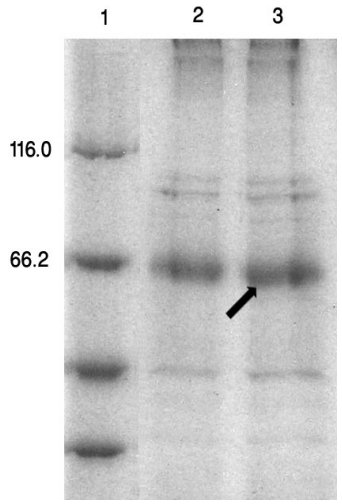
ستون ۲: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم فاقد موتاسیون، با استفاده از رزین Ni- NTA His bind Resin

ستون ۳: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم حاوی موتاسیون، با استفاده از رزین Ni- NTA His bind Resin

ستون ۵: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم فاقد موتاسیون، با استفاده از TCA

ستون ۶: نمونه خالص شده‌ی آنزیم حاوی موتاسیون، با استفاده از TCA

به منظور حذف اینکلوژن بادی‌ها، فرایند رفولدینگ انجام گرفت. شکل ۵ ژل SDS-PAGE آنزیم Taq پلیمراز فاقد و حاوی موتاسیون حاصل از آن را نشان می‌دهد. در این عکس نه تنها در ناحیه‌ی مورد انتظار (۹۴ کیلودالتون) باند دیده شده بسیار ضعیف است، بلکه در ناحیه‌ی ۶۶ کیلودالتون باند واضحی دیده می‌شود.



شکل ۵. نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم فاقد و حاوی موتاسیون پس از رفولدینگ آنزیم

ستون ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین

ستون ۲: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم فاقد موتاسیون با استفاده از رفولدینگ آنزیم

ستون۳: نمونه‌ی خالص شده‌ی آنزیم حاوی موتاسیون با استفاده از رفولدینگ آنزیم

بحث

هدف از این مطالعه جداسازی و خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز موتاسیون یافته بود. در تحقیقات قبلی در ژن آنزیم Taq پلیمراز با جایگزینی گلوتامیک اسید به جای اسید آمینه آسپارژین ۶۶۶ در ناحیه‌ی O-helix موتاسیون ایجاد شد (۹). به نظر می‌رسد این ناحیه از

www.mui.ac.ir

آنزیم Taq پلیمراز نقش مهمی در فعالیت و دقت آنزیم ایفا می‌کند.

در مقدمه اشاره شد که به منظور خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز پروتکل‌های مختلفی در دسترس است که در بعضی از این روش‌ها مانند روش Oktem و همکاران (۱۷) از پرل مغناطیسی و یا مانند روش Nord و همکاران (۱۶) از Affibody ligand استفاده شده است که روش‌هایی هزینه‌بر و زمان‌بر هستند. در روش Engelke و همکاران استفاده از پلی‌اتیلن ایمین (PEI) هر چند به تخلیص بهتر آنزیم کمک می‌کند (۱۱)، اما باقی ماندن تنها مقداری PEI در محصول نهایی با فعالیت آنزیم Taq پلیمراز تداخل می‌کند. از ستون Bio-Rex70 نیز استفاده می‌شود که به آسانی در دسترس نیست (۱).

در این تحقیق از روش خالص‌سازی Desai و Pfaffle استفاده شد (۱۳). با استفاده از پروتکل ساده‌ی Desai، یک باند در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون مشاهده شد (شکل ۱) که با سایز مورد انتظار هم‌خوانی داشت (۲۰، ۲).

دیگر باندهای دیده شده در سایر نواحی با وزن مولکولی کمتر نشان‌دهنده‌ی حضور ناخالصی‌های پروتئینی است. اضافه کردن DNase (شکل ۲) و RNase (شکل ۳) به پروتکل Desai باعث حذف باندهای اضافی در هر دو آنزیم فاقد و حاوی موتاسیون شد و در میزان آنزیم Taq پلیمراز در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون تغییری ایجاد نشد. با اضافه کردن RNase و DNase این انتظار می‌رود که RNA و DNA تک یا دو رشته‌ای کاهش یابند. به طور متداول DNase به فرایند لیز سلولی اضافه شد تا ویسکوزیته‌ی ایجاد شده توسط محتویات DNA حاصل از لیز سلولی را کاهش دهد و DNAهای الگوی باقی‌مانده را از محصولات RNA حین فرایند همانندسازی آزمایشگاهی حذف کند.

استفاده از TCA به منظور رسوب پروتئین‌های ناخواسته‌ای که تحت تأثیر حرارت ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تخریب نشده‌اند، باعث حذف باندهای ناخواسته گردید، اما مقدار آنزیم Taq پلیمراز را نیز کاهش داد. برای بررسی دقیق فعالیت و دقت آنزیم Taq پلیمراز موتانت شده و نیز در برخی از تکنیک‌های PCR مانند RAPD، باید آنزیم عاری از هر نوع آلودگی باشد و در برخی موارد حتی بعد از حرارت دادن (۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت) هنوز تعدادی از پروتئین‌های باکتری میزبان (Ecoli) باقی مانده‌اند. بدین منظور از رزین تعویض یونی یا استخراج دو فازی می‌توان استفاده نمود. بنابراین یکی دیگر از راه‌های استفاده شده جهت تخلیص آنزیم Taq پلیمراز موتاسیون یافته استفاده از رزین‌های تعویض یونی می‌باشد که هر چند خلوص آنزیم ما را افزایش می‌دهد، اما حذف ناقص ایمیدازول و تداخل آن در PCR عدم استفاده از این روش را منطقی جلوه می‌دهد.

یکی از نکات قابل توجه این است که فعالیت پروتئین‌ها به شکل و ساختار سه بعدی آن‌ها بستگی دارد و تغییر در ساختار سه بعدی آنزیم در فعالیت آن حین PCR مؤثر می‌باشد. تنش‌ها و استرس‌هایی مانند شوک گرمایی (in vivo) می‌تواند این ساختار سه بعدی را تحت تأثیر قرار دهد و پروتئین‌ها را وادار به تشکیل ساختار غیر طبیعی و یا اینکلوژن بادی کند. به منظور عدم تشکیل اینکلوژن بادی می‌توان از کنترل سرعت بیان و متابولیسم میزبان، مهندسی پروتئین‌های

هدف و راه‌های دیگر استفاده نمود و برای تخریب اینکلوژن بادی تشکیل یافته می‌توان از پروتئازها، دترجنت‌ها و یا روش رفولدینگ استفاده کرد (۲۲).

در این تحقیق با توجه به احتمال تشکیل اینکلوژن بادی و در نتیجه عدم فعالیت آنزیم Taq پلیمراز موتاسیون یافته در PCR از فرایند رفولدینگ به منظور نوآرایی آنزیم استفاده شد. پس از بررسی ژل SDS-PAGE باند ضعیفی در ناحیه‌ی ۹۴ کیلودالتون دیده شد و بالعکس در ناحیه‌ی ۶۶-۶۰ کیلودالتون (ناحیه‌ای دور از انتظار) باندهایی قوی و شارپ وجود داشت. باند دیده شده در این ناحیه ما را به سوی قطعه‌ی کلنوی آنزیم Taq پلیمراز با وزن مولکولی ۶۲/۵ کیلودالتون سوق می‌دهد (۲۳).

این احتمال وجود دارد که هنگام جداسازی اینکلوژن بادی، سایر آنزیم‌ها و پروتئین‌ها مثل پروتئاز نیز جداسازی شده باشند و باعث شکست آنزیم در این ناحیه شوند (۲۴).

در نهایت بررسی نتایج استفاده از آنزیم های RNase و DNase در خالص‌سازی آنزیم Taq پلیمراز باعث می‌شود که سایر باندهای اضافی یا به عبارتی ناخالصی‌های موجود حذف شوند و آنزیمی خالص به منظور بررسی فعالیت آنزیم نوترکیب و مقایسه‌ی آن با نوع Wild در تحقیقات آتی، در اختیار ما قرار دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های همه جانبه‌ی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Scinece 1988; 239(4839): 487-91.
2. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(24): 9436-40.
3. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus. J Bacteriol 1976; 127(3): 1550-7.
4. Suzuki M, Avicola AK, Hood L, Loeb LA. Low fidelity mutants in the O-helix of Thermus aquaticus DNA polymerase I. J Biol Chem 1997; 272(17): 11228-35.
5. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 1985; 230(4732): 1350-4.
6. Li Y, Kong Y, Korolev S, Waksman G. Crystal structures of the Klenow fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I complexed with deoxyribonucleoside triphosphates. Protein Sci 1998; 7(5): 1116-23.
7. Li Y, Korolev S, Waksman G. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. EMBO J 1998; 17(24): 7514-25.
8. Suzuki M, Yoshida S, Adman ET, Blank A, Loeb LA. Thermus aquaticus DNA polymerase I mutants with altered fidelity. Interacting mutations in the O-helix. J Biol Chem 2000; 275(42): 32728-35.
9. Sadeghi HM, Rajaei R, Moazen F, Rabbani M, Jafarian-Dehkordi A. Mutating Asn-666 to Glu in the O-helix region of the taq DNA polymerase gene. Res Pharm Sci 2010; 5(1): 15-9.
10. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. J Biol Chem 1989; 264(11): 6427-37.
11. Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D. Purification of Thermus aquaticus DNA polymerase expressed in Escherichia coli.. Anal Biochem 1990; 191(2): 396-400.
12. Pluthero FG. Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. Nucleic Acids Res 1993; 21(20): 4850-1.
13. Desai UJ, Pfaffle PK. Single-step purification of

a thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. Biotechniques 1995; 19(5): 780-2, 784.

14. Grimm E, Arbuthnot P. Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. Nucleic Acids Res 1995; 23(21): 4518-9.

15. Dabrowski S, Kur J. Recombinant His-tagged DNA polymerase. II. Cloning and purification of Thermus aquaticus recombinant DNA polymerase (Stoffel fragment). Acta Biochim Pol 1998; 45(3): 661-7.

16. Nord K, Gunneriusson E, Uhlen M, Nygren PA. Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. J Biotechnol 2000; 80(1): 45-54.

17. Oktem HA, Bayramoglu G, Ozalp VC, Arica MY. Single-step purification of recombinant Thermus aquaticus DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic beads. Biotechnol Prog 2007; 23(1): 146-54.

18. Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 2001.

19. López E, Deive FJ, Longo MA, Sanromán MA. Culture Conditions and Investigation of Bioreactor Configurations for Lipase Production by Rhizopus oryzae. Chemical Engineering & Technology 2010; 33(6): 1023-8.

20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

21. Hwang HS, Chung HS. Preparation of active recombinant cathepsin K expressed in bacteria as inclusion body. Protein Expr Purif 2002; 25(3): 541-6.

22. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol 2005; 115(2): 113-28.

23. Datta K, LiCata VJ. Salt dependence of DNA binding by Thermus aquaticus and Escherichia coli DNA polymerases. J Biol Chem 2003; 278(8): 5694-701.

24. Georgiou G, Valax P. Isolating inclusion bodies from bacteria. Methods Enzymol 1999; 309: 48-58.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 193, 3rd week, August 2012 Received: 27.3.2012 Accepted: 1.7.2012

Optimization of the Production and Purification of Taq Polymerase Enzyme Containing N666E Mutation in its O-Helix Region

Hamid Mirmohammad Sadeghi PhD[1], Mohammed Rabbani PhD[2], Samaneh Assarzadeh[3], Fatemeh Moazen MSc[4]

Abstract

Background: The aim of this project was to isolate and purify the highly active recombinant Taq DNA polymerase from the strain of *Escherichia coli BL21*. This enzyme, with a molecular weight of about 94 kDa, is widely used in polymerase chain reaction (PCR). In PCR, the activity and fidelity of Taq polymerase can significantly influence the results. One of the active regions of Taq polymerase has been suggested to be the O-helix region. In previous studies, an expression vector containing mutated Asn 666 Glu Taq polymerase gene was designed. In order to investigate the effects of this mutation on the function of the enzyme, Taq polymerase needs to be purified first.

Methods: In this study, after transformation of competent cells, enzyme expression was induced by isopropyl β D thiogalactopyranoside (IPTG) method. Modified Desai protocol with DNase and RNase, nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin, trichloroacetic acid (TCA), and refolding protocols were subsequently used for purification of this enzyme. These protocols were finally compared.

Findings: Using Desai protocol resulted in the production of a sharp band in the expected region (94 kDa) and several other visible bands. After further modification of Desai protocol, only the desirable band was observed. In protocols using TCA and Ni-NTA resin, the expected bands were weak. Refolding protocol caused a band in an undesirable region (66 kDa).

Conclusion: From the different purification techniques that were used in this study, the modified method of Desai containing RNase and DNase worked best. Addition of TCA can precipitate proteins that had not been affected by heat. Using Ni-NTA resin resulted in elimination of unwanted bands. However, the amount of Taq polymerase was also decreased. The extra band that was observed in refolding protocol was probably due to the presence of proteases that were isolated with inclusion body and could digest Taq polymerase.

Keywords: Taq polymerase recombinant, Purification, Desai protocol, O-helix mutation.

* This paper is derived from a PharmD thesis No. 389304 in Isfahan University of Medical Sciences.

[1] Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] PharmD Candidate, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences And Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[4] Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
Corresponding Author: Hamid Mirmohammad Sadeghi PhD, Email: h_sadeghi@pharm.mui.ac.ir