

## کلونینگ و تولید فرم مونومر استرپتاویدین نو ترکیب و ارزیابی اتصال آن به بیوتین

الهام دیده‌ورا<sup>۱</sup> (M.Sc)، عبدالرحیم صادقی<sup>۲</sup> (Ph.D)، حمید ابطحي<sup>۳\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه زیست فناوری و پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲- گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳- مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

### چکیده

هدف: استرپتاویدین پروتئینی هموترامر است که تمایل اتصال بالای آن به بیوتین باعث شده در فرآیندهای بیوتکنولوژی و مطالعات سلولی کاربرد فراوانی داشته باشد. اما فرم تترامر آن در بعضی تداخل ایجاد می‌کند. بنابراین در این مطالعه با ایجاد جهش حذفی اقدام به تولید فرم مونومر استرپتاویدین گردید. مواد و روش‌ها: ابتدا توالی نوکلئوتیدی استرپتاویدین از سایت NCBI گرفته شد و بعد از اعمال جهش در توالی ژن مورد نظر به منظور بیان در باکتری E.coli بهینه و سنتز گردید. برای کلون کردن ژن از سویه E.coli DH5 $\alpha$  و برای بیان ژن استرپتاویدین از سویه E.coli BL21 (DE3) pLysS استفاده شد. تخلیص پروتئین با کیت Ni-NTA انجام شد و توسط HABA dye تمایل اتصال استرپتاویدین به بیوتین مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها: فرم مونومر استرپتاویدین در میزبان بیانی E.coli BL21 (DE3) pLysS تولید و تخلیص گردید. استرپتاویدین مونومر نو ترکیب دارای تمایل اتصال مناسب به بیوتین بود. نتیجه‌گیری: با ایجاد جهش در توالی پپتیدی استرپتاویدین می‌توان به فرم مونومر آن دست یافت که دارای تمایل اتصال مناسب به بیوتین باشد.

واژه‌های کلیدی: استرپتاویدین، همانند سازی مولکولی، اشریشیا کلی

### مقدمه

پروتئین استرپتاویدین با وزن مولکولی ۵۶ کیلو دالتون توسط باکتری رشته‌ای استرپتومایسس آویدینی تولید می‌شود. استرپتاویدین کمپلکس غیر کوالانت محکمی با میزان تمایل اتصال بالای ( $10^{-14}$  to  $10^{-15}$  kd) با بیوتین تشکیل می‌دهد [۲،۱]. پروتئین اصلی دارای ۱۵۹ اسید آمینه است که غالباً دو انتهای آن برای دستیابی به هسته اصلی استرپتاویدین برش داده می‌شود، که این کار برای افزایش تمایل اتصال به بیوتین ضروری است [۳]. ساختار ثانویه مونومر استرپتاویدین از هشت زنجیره  $\beta$  ناهمسو تشکیل شده که پیچ خورده و ساختار

سوم که  $\beta$ -Barrel و فتری شکل است را ایجاد می‌کند. در نهایت برای ایجاد ساختار چهارم استرپتاویدین، چهار مونومر یکسان (چهار  $\beta$ -Barrel - یکسان) به یکدیگر متصل می‌شوند. بنابراین جایگاه اتصال بیوتین در انتهای هر  $\beta$ -Barrel قرار گرفته است [۵،۴]. هم‌چنین بر اساس مطالعات کریستالوگرافی که از استرپتاویدین و کمپلکس آن با بیوتین صورت گرفته موتیف‌های اصلی اتصال شناسایی شده‌اند که شامل:

(۱) لوپ پلی‌پپتیدی منعطفی که بین رشته ۳ و ۴ قرار دارد، بیوتین را در داخل پروتئین پنهان می‌کند و زمانی که به بیوتین

سنتز ژن جهش‌یافته استرپتاویدین. ابتدا توالی ژن استرپتاویدین با شماره دسترسی X03591 از سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) دریافت شد. پس از بررسی ناحیه کدکننده ژن استرپتاویدین و حذف کدون تریپتوفان ۱۲۰، توالی مورد نظر با نرم‌افزار Vector NTI جهت بیان در میزبان E.coli بهینه گردید و سایت برش آنزیم‌های BamHI و XhoI در دو انتهای ژن قرار گرفت. سپس توالی مورد نظر توسط شرکت بیوماتیک، کانادا در وکتور pSK سنتز گردید.

کلونینگ ژن و تولید فرم مونومر استرپتاویدین نو ترکیب کلونینگ ژن در باکتری اشریشیاکلی

ناقل پلاسمیدی pSK حاوی ژن جهش‌یافته استرپتاویدین و ناقل پلاسمیدی pET32a با استفاده از آنزیم‌های BamHI و XhoI برش داده شدند. در مرحله بعد واکنش الحاق بین ناقل پلاسمیدی pET32a و قطعه ژنی برش خورده با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 در حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت به منظور تولید پلاسمید نو ترکیب pET32a-strp انجام گرفت. سپس ناقل‌های نو ترکیب از طریق ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی در میزبان کلونینگ E.coli DH5 $\alpha$  مستعد شده با روش کلسیم کلراید (CaCl<sub>2</sub>) وارد شدند [۱۷]. پس از رشد باکتری‌ها، کلنی‌های ترانسفورم شده به وسیله غربالگری بر روی محیط‌های نوترینت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ mg/ml انتخاب شدند. جهت اطمینان از ورود پلاسمیدهای نو ترکیب به داخل سلول‌های مستعد، از سلول‌های انتخاب شده استخراج پلاسمید انجام گرفت. پلاسمیدهای نو ترکیب حاوی ژن جهش‌یافته استرپتاویدین به منظور بیان ژن به میزبان بیانی E.coli BL21(DE3) pLYsS مستعد شده انتقال یافتند [۱۸].

بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب استرپتاویدین. برای بیان پروتئین نو ترکیب، از کلونی‌های E.coli BL21(DE3) pLYsS حاوی پلاسمیدهای pET32a-strp در محیط

متصل می‌شود تحت تاثیر تغییرات کنفورماسیونی از حالت باز به شکل بسته تغییر حالت می‌دهد.

۲) چندین تریپتوفان در اطراف سایت اتصال بیوتین قرار دارند که یکی از آن‌ها به واسطه واکنش‌های هیدروفوبیک غالب است.

۳) اسید آمینه‌های هیدروفیلی که با بیوتین پیوندهای هیدروژنی برقرار می‌کنند.

بنابراین جایگاه اتصال بیوتین در هر  $\beta$ -Barrel شامل یک جزء از بخش درونی هر  $\beta$ -Barrel به علاوه تریپتوفان ۱۲۰ حفاظت شده از زیر واحد مجاور می‌باشد [۷،۶]. اتصال محکم بیوتین به دلیل تشکیل پیوندهای هیدروژنی و هم‌چنین واکنش‌های هیدروفوبیکی (در ناحیه‌ای که در برگیرنده چندین تریپتوفان که زمینه را برای ایجاد پیوندهای واندروالسی فراهم می‌کنند) می‌باشد. در واقع کمپلکس استرپتاویدین-بیوتین دارای قوی‌ترین اتصال در طبیعت است [۹،۸] طوری که اتصال استرپتاویدین به بیوتین یک میلیون بار قوی‌تر از واکنش بین آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می‌باشد [۱۰]. این ویژگی باعث شده استرپتاویدین به طور گسترده‌ای در مطالعات، سنجش‌ها و فرایندهای بیوتکنولوژی همانند تشخیص، تخلیص، جداسازی پروتئین و تشخیص نوکلئیک اسید مورد استفاده قرار گیرد [۱۱-۱۳]. از دیگر ویژگی‌های منحصر به فرد استرپتاویدین مقاومت در برابر گرما، دناورها (تریئون و SDS)، رنج‌های بالا و پایین pH و هم‌چنین فعالیت پروتئولیتیکی برخی آنزیم‌ها می‌باشد [۱۴،۱۵]. با وجود ویژگی‌های مطلوب فرم تترامر استرپتاویدین، این فرم در بعضی از سنجش‌ها به دلیل اندازه بزرگ و تجمع زیرواحدهای آن تداخل ایجاد می‌کند [۱۶]. در نتیجه برای گسترش کاربرد استرپتاویدین تولید فرم مونومر آن مورد توجه می‌باشد. بنابراین در این مطالعه با حذف تریپتوفان ۱۲۰ از توالی پپتیدی استرپتاویدین به بررسی تشکیل ساختار مونومر و تمایل اتصال آن به بیوتین پرداخته شد.

استرپتاویدین متصل شده و یک کمپلکس زرد رنگ را تولید می‌کند. HABA با میل ترکیبی کمی به استرپتاویدین متصل می‌شود که بیوتین قادر است در این کمپلکس جایگزین HABA شده و منجر به کاهش جذب استرپتاویدین در طول موج ۵۰۰ نانومتر شود. بنابراین تمایل اتصال بر اساس کاهش جذب از طریق Green method ارزیابی گردید [۲۰].

برای تعیین قدرت اتصال استرپتاویدین به بیوتین، نسبت بیوتین به استرپتاویدین باید تعیین شود. برای این منظور از رابطه  $B/P$  (P غلظت استرپتاویدین و B غلظت بیوتین بر اساس مول) استفاده گردید. برای تعیین غلظت بیوتین به روش زیر عمل گردید. در ابتدا باید میزان کاهش جذب با استفاده از فرمول زیر تعیین گردد:

$$\Delta A = (0.9 \times OD_1) + OD_3 - OD_2$$

در این رابطه  $OD_1$  عبارت است از  $OD_{500}$  به دست آمده از ترکیب Streptavidin-HABA در فقدان وجود بیوتین است.  $OD_2$  عبارت است از  $OD_{500}$  از ترکیب Streptavidin-HABA در حضور وجود بیوتین است.  $OD_3$  به عنوان محلول بلانک می‌باشد و شامل استرپتاویدین، HABA و آب است. تعیین مقدار بیوتین بر اساس واحد میکرومول در هر میلی‌لیتر از رابطه  $C = \Delta A / 34$  استفاده می‌گردد. اندازه‌گیری مقدار بیوتین در نمونه آزمایش با استفاده از فرمول  $B = C \times 10$  تعیین می‌گردد. برای تعیین نسبت بیوتین به استرپتاویدین از رابطه  $B/P$  استفاده شد. اتصال قوی بین بیوتین و استرپتاویدین هنگامی مشاهده می‌شود که نسبت مولی (نسبت بیوتین به استرپتاویدین) بالا است.

نوترینت برات حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و کلرآمفنیکل کشت داده شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های کشت داده شده به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط القا اضافه شد و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی انکوباتور شیکردار با ۲۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این‌که تعداد باکتری‌ها به حد مناسب رسید  $(OD_{600} = 0/6)$  سپس از محلول یک مولار IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) به منظور القا بیان پروتئین به سوسپانسیون باکتری اضافه گردید تا غلظت نهایی IPTG به یک میلی‌مولار رسید. چهار ساعت پس از القای تولید پروتئین، رسوب باکتری با استفاده از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه با ۸۰۰۰ rpm) جمع‌آوری شد. برای بررسی نتیجه القاء از روش الکتروفورز پروتئین‌های حاصل از رسوب باکتری بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید (12% SDS-PAGE) استفاده گردید.

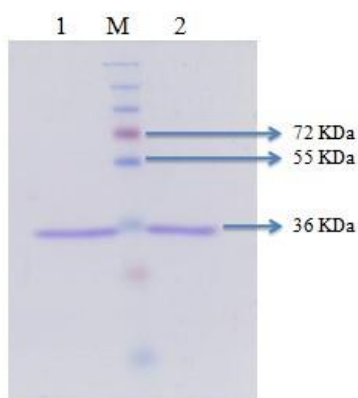
در این مطالعه به علت وجود دنباله هیستیدینی (6His.tag) در پروتئین بیان شده که توسط وکتور بیانی pET-32a اضافه شده است، تخلیص آن توسط کیت Ni-NTA agarose resin طبق دستورالعمل شرکت سازنده (کیازن، آمریکا) بر اساس کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفت. میزان پروتئین خالص شده با استفاده از روش برد فورد اندازه‌گیری گردید و کیفیت آن نیز با استفاده از ژل الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید (12% SDS-PAGE) مورد بررسی قرار گرفت [۱۹].

سنجش فعالیت پروتئین نو ترکیب. در این مطالعه به منظور ریفولدینگ صحیح و در نتیجه افزایش فعالیت پروتئین استرپتاویدین نو ترکیب، از دیالیز استفاده گردید. دیالیز پروتئین خالص شده در برابر محلول PBS و با استفاده از غشای نیمه تراوا در حضور اسیدهای آمینه گلیسین (با غلظت یک میلی‌مولار) و آرژنین (با غلظت یک میلی‌مولار) انجام گرفت. سپس برای بررسی میزان اتصال آن به بیوتین از روش استاندارد (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) HABA dye استفاده شد. در این روش HABA به

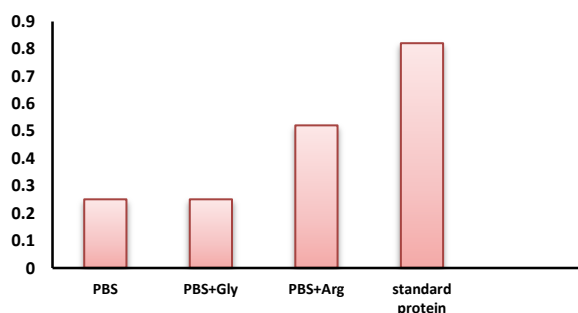
## نتایج

تولید و تخلیص پروتئین استرپتاویدین. تولید پروتئین با استفاده از IPTG بعد از انتقال پلاسمید نو ترکیب pET32a-strp به سلول‌های مستعد E.coli BL21 (DE3) plysS انجام شد (شکل - A1). به علت حضور 6-His tag در هر دو انتهای پروتئین نو ترکیب، تخلیص از طریق کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از کیت Ni-NTA صورت گرفت و باند پروتئین

به این که pH بافر دیالیز در حضور آرژنین قلیایی می شود بنابراین برای بررسی تاثیر pH، دیالیز پروتئین در حضور آرژنین و در pH خنثی نیز انجام شد که مقایسه نتایج حاصل از دیالیز در pH قلیایی و خنثی نشان داد که پروتئین در pH قلیایی ریفلدینگ مناسب خود را به دست می آورد (جدول ۲ و شکل ۳ و ۴).



شکل ۲. آنالیز استرپتاویدین نوترکیب فاقد تریپتوفان ۱۲۰ در حضور و عدم حضور بیوتین M- نشانگر پروتئین، ۱- استرپتاویدین نوترکیب در عدم حضور بیوتین، ۲- استرپتاویدین نوترکیب در حضور بیوتین



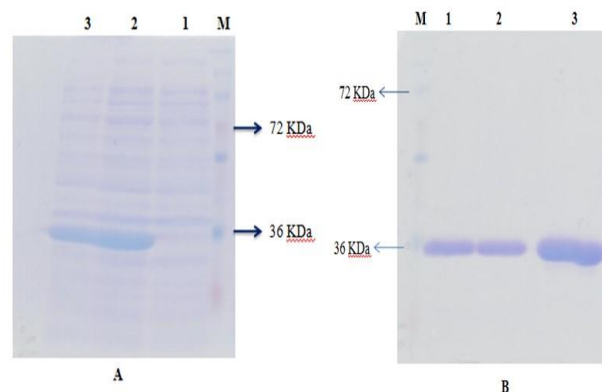
شکل ۳. مقایسه نسبت مولی بیوتین به پروتئین، استرپتاویدین استاندارد با استرپتاویدین نوترکیبی که در بافرهای PBS، PBS+Gly و PBS+Arg دیالیز شده.

جدول ۲. میزان جذب و نسبت مولی بیوتین به پروتئین را در نمونه هایی که در بافر PBS حاوی آرژنین با pH های متفاوت دیالیز شدند را نشان می دهد.

pH	نسبت مولی بیوتین به استرپتاویدین استاندارد	نسبت مولی بیوتین به استرپتاویدین نوترکیب	OD2	OD1	میزان جذب
					شرایط دیالیز
۱۰	۴/۱	۳/۳۳	۱/۱۷۶	۱/۳۱۲	PBS+Arg
۷	۴/۱	۱/۴۱	۰/۵۰۲	۰/۵۷۷	PBS+Arg

تخلیص شده روی ژل 12% SDS-PAGE در ناحیه ۳۶ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل - B1).

سنجش اتصال استرپتاویدین نوترکیب به بیوتین. به منظور بهبود در ریفلدینگ پروتئین از اسید آمینه های آرژنین و گلايسین در بافر دیالیز استفاده گردید که اسید آمینه آرژنین در ریفلدینگ پروتئین موثر بود و باعث کاهش جذب آن شد (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱. تولید و تخلیص استرپتاویدین نوترکیب، A: M نشانگر پروتئین، چاهک ۱ نمونه قبل از القا، چاهک ۲ و ۳ به ترتیب نمونه های که بعد از ۲ و ۴ ساعت القا شده اند. B: M نشانگر پروتئین، ۱، ۲ و ۳ نمونه های تخلیص شده استرپتاویدین

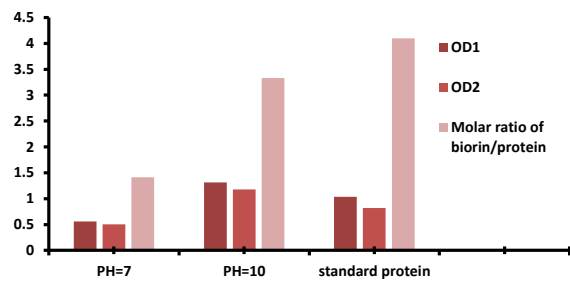
جدول ۱. میزان جذب و نسبت مولی بیوتین به پروتئین را در نمونه های دیالیز شده نشان می دهد.

میزان جذب	نسبت مولی بیوتین به استرپتاویدین نوترکیب	نسبت مولی بیوتین به استرپتاویدین استاندارد	نسبت مولی بیوتین به استرپتاویدین نوترکیب	
			OD1	OD2
PBS	۰/۲۸۲	۰/۲۳۹	۰/۲۵	۰/۸۲
PBS+Arg 0.1M	۰/۸۲۳	۰/۷۳۶	۰/۵۲	
PBS+Gly 0.1M	۰/۲۷۹	۰/۲۴۰	۰/۲۵	

به منظور بررسی ساختار استرپتاویدین نوترکیب نمونه های دیالیز شده روی ژل 12% SDS-PAGE آنالیز شدند. باند استرپتاویدین در حضور و عدم حضور بیوتین در ناحیه ۳۶ کیلو دالتون ظاهر شد که نشان دهنده ساختار مونومر می باشد (شکل ۲).

از آن جایی که اسید آمینه آرژنین در بهبود ریفلدینگ پروتئین استرپتاویدین نوترکیب موثر بود و از طرفی با توجه

بازهای ناحیه ۱۲۱-۵۰ سیگنال پپتید را کد می‌کنند در ژن طراحی شده حذف گردیدند. در ژن استرپتاویدین ناحیه ۵۹۸-۱۲۲ پروتئین بالغ (پروتئین فاقد سیگنال پپتید) را کد می‌کند [۲۶]. در نتیجه این توالی برای طراحی ژن به منظور تولید استرپتاویدین نوترکیب انتخاب شد. در این مطالعه جهت کلونینگ از باکتری *E. coli* سویه‌های DH5 $\alpha$  و BL21(DE3)pLysS استفاده شد. این دو سویه بیماریزا نیستند و برای کارهای کلونینگ بهینه شده‌اند. سویه DH5 $\alpha$  کارآیی بالایی برای ترانسفورماسیون به واسطه چندین جهش پیدا کرده است. و به عنوان میزبان کلونی مطرح می‌باشد. اما این سویه به دلیل دارا بودن پروتاز، باعث شکسته شدن پروتئین نوترکیب می‌شود و نمی‌توان از آن برای بیان پروتئین نوترکیب استفاده کرد بنابراین سویه BL21(DE3)pLysS به عنوان میزبان بیانی جهت القا پروتئین‌های نوترکیب استفاده گردید سویه BL21(DE3)pLysS فاقد پروتازهای متصل به غشاء از جمله HtpR, DegP, OmpT, Lon می‌باشد، بنابراین تخریب پروتئین نوترکیب در آن صورت نمی‌گیرد [۲۷، ۲۸]. با توجه به این‌که بیان ژن هدف در سیستم pET تحت کنترل پروموتور قوی باکتریوفاژ T7 است و کنترل این پروموتور توسط RNA پلی‌مراز باکتریوفاژ T7 که در کروموزوم باکتری کلون شده، صورت می‌گیرد، بنابراین سیستم رونویسی pET مستقل از سلول میزبان عمل می‌کند در نتیجه میزان بیان پروتئین در این سیستم بالا می‌باشد. از طرفی دیگر مترادف ویژه مربوط به ۶ اسید آمینه هیستیدین (6His.Tag) که در ناحیه ۵ مکان کلونینگ ژن قرار گرفته به انتهای آمینی پروتئین اضافه می‌شود و خالص‌سازی پروتئین تولید شده را از طریق کروماتوگرافی تمایلی میسر می‌کند [۲۹]. بنابراین توالی ژن طراحی شده در pET 32a بیان و تخلیص گردید. پروتئین استرپتاویدین تخلیص شده که تقریباً ۱۶/۵ کیلو دالتون وزن دارد با اضافه شدن توالی pET-32a وزن پروتئین نوترکیب تا ۳۶ کیلو دالتون افزایش پیدا می‌کند [۳۰] که در واقع این نتیجه‌گیری روی 12% SDS-PAGE تایید شد.



شکل ۴. مقایسه بین میزان جذب و نسبت مولی بیوتین به پروتئین، استرپتاویدین نوترکیب دیالیز شده در دو pH متفاوت با استرپتاویدین استاندارد.

## بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به کاربردهای پروتئین استرپتاویدین در علوم مولکولی و از طرفی محدودیت‌های استفاده از فرم تترامر، بنابراین به منظور گسترش تکنولوژی استفاده از استرپتاویدین تولید فرم مونومر آن مطرح می‌باشد [۱۶]. مطالعات پیشین نشان داده است اسید آمینه تریتوفان ۱۲۰ استرپتاویدین زیرواحد مجاور متصل می‌گردد و در تشکیل ساختار تترامر استرپتاویدین موثر است [۲۱، ۲۲]. در این مطالعه با حذف تریتوفان ۱۲۰ در توالی پپتیدی استرپتاویدین، ساختار مونومری با تمایل اتصال به بیوتین تشکیل شد. در مطالعات قبلی با ایجاد جهش‌های W120F [۲۳] و W120A/F [۲۴] استرپتاویدین ساختار آن دچار تغییر نشده و تمایل اتصال آن‌ها به بیوتین به طور چشمگیری کاهش داشته است. در صورتی که در این مطالعه با ایجاد جهش علاوه بر تشکیل فرم مونومر استرپتاویدین، تمایل این استرپتاویدین با بیوتین نیز کاهش نیافت.

امروزه برای بررسی ساختار پروتئین از روش کلونینگ استفاده می‌گردد. از مزیت‌های روش کلونینگ علاوه بر فراهم کردن بررسی تغییرات ساختاری پروتئین‌ها، تولید بالای پروتئین می‌باشد [۲۵]. در این مطالعه میزان تولید استرپتاویدین نوترکیب در محیط NB1.5X به مقدار ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید قابل ذکر است میزان تولید پروتئین در محیط NB1.5X بیش‌تر از محیط‌های NB2X و LB بود. ژن استرپتاویدین دارای ۶۳۸ جفت باز می‌باشد که ناحیه CDS آن از باز ۶۰۱-۵۰ را شامل می‌شود. با توجه به این‌که

پژوهش حاضر در بردارنده بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم الهام دیده‌ورا در دانشگاه علوم پزشکی اراک بوده که هزینه آن به‌وسیله معاونت تحقیقات و فناوری تأمین گردیده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و آزمایشگاه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی اراک اعلان می‌دارند.

## منابع

- [1] Han SH, Kim HM, Lim MW, Kim JK. Functional expression of soluble streptavidin in escherichia coli. *J Life Sci* 2015; 25: 631-637.
- [2] Dundas CM, Demonte D, Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 9343-9353.
- [3] Sano T, Pandori MW, Chen X, Smith CL, Cantor CR. Recombinant core streptavidins a minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. *J Biol Chem* 1995; 270: 28204-28209.
- [4] Weber PC, Ohlendorf D, Wendoloski J, Salemme F. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 1989; 243: 85-88.
- [5] Livnah O, Bayer EA, Wilchek M, Sussman JL. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5076-5080.
- [6] Freitag S, Le Trong I, Klumb LA, Chu V, Chilkoti A, Stayton PS, Stenkamp RE. X-ray crystallographic studies of streptavidin mutants binding to biotin. *Biomol Eng* 1999; 16: 13-19.
- [7] Song J, Li Y, Ji C, Zhang JZ. Functional Loop Dynamics of the Streptavidin-Biotin Complex. *Sci Rep* 2015; 5: 7906.
- [8] Chu V, Stayton PS, Freitag S, Le Trong I, Stenkamp RE. Thermodynamic and structural consequences of flexible loop deletion by circular permutation in the streptavidin- biotin system. *Protein Sci* 1998; 7: 848-859.
- [9] Klumb LA, Chu V, Stayton PS. Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin- biotin complex. *Biochemistry* 1998; 37: 7657-7663.
- [10] Zhang Z, Zhu H, Tang Y et al. Preparation and application of streptavidin magnetic particles. *Science in China Series B: Chemistry* 2007; 50: 127-134.
- [11] Schettters H. Avidin and streptavidin in clinical diagnostics. *Biomol Eng* 1999; 16: 73-78.
- [12] Laitinen OH, Nordlund HR, Hytönen VP, Kulomaa MS. Brave new (strept) avidins in biotechnology. *Trends Biotechnol* 2007; 25: 269-277.
- [13] Taylor SK, Wang J, Kostic N, Stojanovic MN. Monovalent streptavidin that senses oligonucleotides. *Angew Chem Int Ed Engl* 2013; 125: 5619-5622.
- [14] González Mn, Argaraña CE, Fidelio GD. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol Eng* 1999; 16: 67-72.
- [15] Ellison D, Beynon RJ, Hinton J, Hubbard SJ. Limited proteolysis of native proteins: the interaction

با توجه به تولید پروتئین به صورت انکلوژن بادی، برای تهیه پروتئین دناتورده، از دناتورهای شیمیایی مانند اوره و گوانیدینوم هیدروکلراید استفاده شد. بنابراین برای ریفلدینگ پروتئین باید غلظت دناتورها کاهش یابد [۳۱]. که این امر توسط دیالیز صورت گرفت. با توجه به این‌که بافر PBS به تنهایی در ریفلدینگ استرپتاویدین نوترکیب موثر نبود طوری که در طی سنجش ما شاهد کاهش جذب چندانی نبودیم بنابراین برای کمک به ریفلدینگ و اتصال استرپتاویدین به بیوتین از اسید آمینه‌های گلیسین و آرژنین استفاده شد. اسید آمینه آرژنین در بهبود ریفلدینگ پروتئین موثر واقع بود و در طی سنجش باعث کاهش جذب شد و نسبت مولی بیوتین به پروتئین اختلاف کمی با پروتئین استاندارد داشت در واقع آرژنین با زنجیره جانبی اکثر اسید آمینه‌ها واکنش داده ولی اتصال محدود آن به سطح پروتئین نقش مهمی در جلوگیری از تجمع ایفا می‌کند. به عبارتی برهمکنش بین گروه گوانیدینوم آرژنین و زنجیره جانبی تریتوفان احتمالاً مسئول مهار تجمع پروتئین می‌باشد و به ریفلدینگ پروتئین کمک می‌کند [۳۲] در این مطالعه دنباله‌های پروتئینی مربوط به پلاسمید pET32a از استرپتاویدین تولید شده حذف نگردید. وجود این دنباله‌ها میتواند در واکنش بین بیوتین و استرپتاویدین موثر باشد. در این مطالعه نشان داده شد که pH مناسب محیط دیالیز جهت به دست آوردن ریفلدینگ صحیح استرپتاویدین نوترکیب pH قلیایی می‌باشد. در نهایت با به‌دست آوردن ریفلدینگ صحیح استرپتاویدین نوترکیب ما شاهد ساختار مونومر استرپتاویدین بودیم.

در این مطالعه با حذف تریتوفان ۱۲۰ فرم مونومر استرپتاویدین تشکیل شد و با فراهم کردن شرایط مناسب ریفلدینگ برای استرپتاویدین نوترکیب، فرم مونومر آن دارای تمایل اتصال مناسب به بیوتین بود. بنابراین با ایجاد شرایط بهینه برای به‌دست آوردن ریفلدینگ صحیح پروتئین نوترکیب از انکلوژن بادی می‌توان به پروتئین فعال رسید.

## تشکر و قدردانی

- association of streptavidin. *Proc Nat Acad Sci* 1995; 92: 3180-3184.
- [24] Chilkoti A, Tan PH, Stayton PS. Site-directed mutagenesis studies of the high-affinity streptavidin-biotin complex: contributions of tryptophan residues 79, 108, and 120. *Proc Nat Acad Sci* 1995; 92: 1754-1758.
- [25] Alibolandi M, Mirzahoseini H. Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int* 2011; 2011: 631607.
- [26] Argarana CE, Kuntz ID, Birken S, Axel R, Cantor CR. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 1871-1882.
- [27] Khoo O, Suntrarachun S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012; 2: 159-162.
- [28] Sugimura K, Higashi N. A novel outer-membrane-associated protease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1988; 170: 3650-3654.
- [29] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1989.
- [30] Farhangnia L, Ghaznavi-Rad E, Mollaei N, Abtahi H. Cloning, expression, and purification of recombinant Lysostaphin from *Staphylococcus simulans*. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7. (Persian).
- [31] Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 437-443.
- [32] Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y, Timasheff SN. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophys Chem* 2007; 127: 1-8.
- between avidin and proteinase K. *Protein Sci* 1995; 4: 1337-1345.
- [16] Demonte D, Dundas CM, Park S. Expression and purification of soluble monomeric streptavidin in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 6285-6295.
- [17] Abbasian S, Soufian S, Nejad A, Abtahi H. Investigating the possibility of recombination the predicted antigenic fragment of *Streptococcus pyogenes* hyaluronidase by bioinformatics softwares. *Koomesh* 2015; 17: 77-83.
- [18] Mirjamali NA-S, Soufian S, Mollaei N, Abbasian SS, Abtahi H. Cloning and expression of the enzymatic region of *Streptococcal hyaluronidase*. *Iranian J Basic Med Sci* 2014; 17: 667.
- [19] Abbasian SS, Abtahi H, Zolfaghari MR, Soufian S, Ghaznavi-Rad E. Cloning, expression, purification and antigenic evaluation of hyaluronidase antigenic fragments recombinant protein of *streptococcus pyogenes*. *African J Biotechnol* 2012; 11: 2376-2380.
- [20] Weber P, Wendoloski J, Pantoliano M, Salemme F. Crystallographic and thermodynamic comparison of natural and synthetic ligands bound to streptavidin. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 3197-3200.
- [21] Laitinen O, Hytönen V, Nordlund H, Kulomaa M. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2992-3017.
- [22] Bayer EA, Ben-Hur H, Hiller Y, Wilchek M. Postsecretory modifications of streptavidin. *Bioch J* 1989; 259: 369-376.
- [23] Sano T, Cantor CR. Intersubunit contacts made by tryptophan 120 with biotin are essential for both strong biotin binding and biotin-induced tighter subunit

## Cloning and production of the monomer form of recombinant streptavidin and appraisal of its binding affinity to biotin

Elham Didevara (M.Sc)<sup>1</sup>, Abdo alrahim Sadeghi (Ph.D)<sup>2</sup>, Hamid Abtahi (Ph.D)<sup>\*3</sup>

1. Dept. of Biotechnology and Molecular Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2. Dept. of Biochemistry and Genetics, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 16 Jan 2017; Accepted: 15 Nov 2017)

**Introduction:** Streptavidine is a homo tetrameric protein that has a high biotin tendency to use in biotechnology and cellular studies. But its tetramer form interferes in some Measurements. Therefore, in this study, with a deletion mutation, a form of Streptavidine monomer was produced.

**Materials and Methods:** Firstly, the streptavidin nucleotide sequence was taken from NCBI site and after mutation in the sequence of the gene was optimized for expression in E.coli bacteria. Correspondingly, in order to clone the gene, E. coli DH5 $\alpha$  strain and to express the streptavidin gene E. coli BL21 (DE3) pLysS were used. Purification of protein was performed with Ni-NTA kit and by HABA dye, the tendency of binding of streptavidin to biotin was measured.

**Results:** Streptavidine monomer form was produced and purified in E.coli BL21 (DE3) pLysS expression host. The recombinant Streptavidine monomer has a tendency for binding to biotin.

**Conclusion:** By creating a mutation in the streptavidin peptide sequence, it can be obtained in the form of a monomer that has a tendency for binding to the biotin.

**Keywords:** Streptavidin, Cloning, Molecular, Escherichia coli.

---

\* Corresponding author. Tel: +98 86-34173502

abtahi@arakmu.ac.ir