التنسيل المورثي والتعبير البروتيني عن الشكل ثنائي القسيم من بروتين الأنكسين V البشري المؤشب

آية الطوير * د. عصام قاسم ** د. عبد القادر عبادي ***

(الإيداع: 20 حزيران 2021، القبول: 16 آب 2021)

الملخص:

يستعمل بروتين الأنكسين V المؤشب بصورة شائعة كواسم هام للكشف عن عملية الموت الخلوي المبرمج، حيث يرتبط بألفة عالية بجزيئات الفوسفاتيديل سيرين وذلك بوجود شوارد الكالسيوم. هدفت هذه الدراسة إلى تصميم نظام جديد للتعبير البروتيني عن الأنكسين V بصورة مندمجة مع مجال البلمرة hCH3 من أجل الحصول عليه بشكل ثنائي قسيم. وقد تَضَمّن ذلك بناء بلازميد pRSET-hCH3-ANXV من خلال تنسيل مورثة hCH3 مع واسم سداسي الهستيدين من النهاية الأمينية لمورثة الأنكسين V، وتحت سيطرة المُحَضِض T7. تم التعبير عن بروتين CH3-ANXV في الاشريكية القولونية، ونُقِي من سيتوبلاسما هذه البكتريا باستعمال كروماتوغرافيا الألفة المعدنية، وتم التأكد من ذلك بالرحلان الكهربائي وكذلك بالكشف عنه في اختبارات المقايسة المناعية الإنزيمية والتبصيم النقطي والمناعي باستعمال أضداد نوعية لبروتين الأنكسين V. سيوفر بروتين الأنكسين V ثنائي القسيم وسيلة فعالة لربط الفوسفاتيديل سيرين بألفة عالية، كما يمكن توظيفه بعد وسمه بالفلوريسين كأداة جزيئية سريعة وحساسة للكشف عن الفوسفاتيديل سيرين المعروض إما على أغشية الخلايا الداخلة في الموت الخلوي المبرمج أو الحويصلات الغشائية.

الكلمات المفتاحية: الأنكسين V، hCH3، ثنائي قسيم، التنسيل المورثي، التعبير البروتيني.

*. طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سوريا

** أستاذ دكتور، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سوريا

*** مدير بحوث، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية،

Cloning and protein expression of human Annexin V homo-dimer recombinant protein

Aya Twair* **Issam Kassem**** **Abdul Qader Abbady*****

(**Received: 20 June 2021,Accepted: 16 August 2021**)

Abstract:

Annexin-V (ANXV) is widely used as an excellent probe to mark apoptosis, which can bind with high affinity to phosphatidylserine (PS) in the presence of calcium ions. This study aimed to design a new system for protein expression of ANXV as fusion with hCH3 dimerization domain in order to produce ANXN homo-dimer. This included the construction of the pRSET-hCH3-ANXV plasmid by cloning hCH3 gene with 6×His tag upstream the N-terminal of ANXV gene in the T7 promoter-plasmid pRSET. The expressed CH3-ANXV protein from this plasmid in the cytoplasm of *E. coli* was purified using metal affinity chromatography, as shown after SDS-PAGE separation and blue gel staining and detected by ELISA and immunoblotting using ANXV-specific polyclonal antibodies. ANXV homo-dimer protein will provide an efficient tool for PS binding with high affinity, and can be used after fluorescein labelling as rapid, sensitive and molecular tool for PS detection on membranes of either apoptotic cells or exosomes

Keywords: Annexin V, hCH3, homo-dimer, gene cloning, protein expression.

*PhD student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

** Doctor of philosophy, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

*** Research Director, department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria

1. المقدمة

يتوافر الأنكسين V وهو بروتين وزنه الجزيئي 35 كيلو دالتون بكثرة في جسم الإنسان والحيوان والنبات وهو مهم في مختلف العمليات الخلوية والفيزيولوجية مثل نقل الإشارات الخلوية والالتهابات والنمو والتمايز (Reutelingsperger et al. 1985). كما يرتبط الأنكسين V مع العديد من الأمراض مثل أمراض السكري واضطرابات أخرى (Fatimathas and Moss 2010). ينتمي الأنكسين V إلى عائلة الأنكسينات التي يشتهر معظم أنواعها بقدرتهم على الارتباط مع الفوسفاتيديل سيرين (PS)، وهو أحد الشحوم الفوسفورية المؤلفة للغشاء الخلوي، بألفة عالية وذلك بوجود شوارد الكالسيوم (Lahorte et al. 2004). عادة ما تخضع الخلية المتماوتة لعديد من التغيرات الظاهرية والحيوية الكيميائية المميزة وأهمها تغير تموضع الفوسفاتيديل سيرين على جانبي الغشاء الخلوي ليصبح خارجي التموضع بدلاً من كونه داخلي التموضع في الخلايا السليمة (Vermeulen et al. 2005). من هنا كان توظيف الشكل المؤشب من الأنكسين V خارجي المنشأ في الكشف عن عملية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis وذلك باستخدام مقياس التدفق الخلوي أو المجهر المتفلور (van Engeland et al. 1998). ونظراً للعلاقة الوثيقة بين الموت الخلوي المبرمج والسرطان فلا يبدو مستغرباً وجود ارتباط وثيق لبروتين الأنكسين V ببعض أنواع السرطان، حيث تتجه الكثير من الأبحاث الجديدة نحو دراسة أثر تنشيطه أو تثبيطه على مقاومة الخلايا السرطانية للمعالجات المختلفة (Peng et al. 2014). كما يمكن من خلال بروتين الأنكسين V تتبع مدى استجابة الخلايا السرطانية للمعالجات، لذلك يُعدّ هذا البروتين أداة لتقييم كفاءة علاج مرضى السرطان ومدى انتشار أو تراجع المرض (Yang et al. 2001). وكذلك في معايرة كمية الحويصلات الغشائية Exosomes التي تطلقها الخلايا السرطانية للتواصل فيما بينها والتي قد تعد مؤشراً لنوع السرطان ومرحلته (Arraud et al. 2015)، عدا عن تطبيقاته في ربط الجسيمات الشحمية Liposomes المستخدمة لتوصيل الدواء للخلية السرطانية الهدف (Zhang et al. 2014, Olusanya et al. 2018). من الناحية التطبيقية يتم إنتاج الأنكسين V المؤشب بالاعتماد على طرائق الهندسة الوراثية والبيولوجية الجزيئية ثم تنقيته ووسمه بمركبات التفلور الكيميائية المختلفة، مثل الفلوريسين، واستخدامه في الدراسات الخلوية والنسيجية الخاصة بالتعرف على الخلايا المتماوتة وعدها (Vermes et al. 1995).

هناك العديد من الدراسات التي وصفت إنتاج بروتين الأنكسين V المؤشب سواء بشكله الحر أو المندمج مع البروتين الأخضر المتفلور (GFP) وذلك في طليعيات أو حقيقيات النوى (Ernst et al. 1998, Wang et al. 2006, Brumatti et al. 2008, Wang et al. 2015).

شرح هذا العمل مراحل التنسيل المورثي والتعبير البروتيني في الإشريكية القولونية *E. coli* عن بروتين الأنكسين V المؤشب للحصول عليه بشكل ثنائي القسيم Homo-dimer. ومن أجل تحقيق ذلك تم اختيار مجال البلمرة hCH3 المشتق من السلسلة الثقيلة للغلوبولين المناعي البشري IgG (Li et al. 1997). يتميز هذا المجال بعدم توليد استجابة مناعية تجاهه في جسم الإنسان مما يساعد في استخدام البروتين المنتج في التطبيقات السريرية كما يمكننا الاستفادة من هذا المجال كواسم من أجل الكشف والتنقية باستخدام أضداد نوعية له. إن الحصول على بروتين الأنكسين V بالشكل ثنائي القسيم قد يزيد من عمر النصف له في الدورة الدموية في حال استخدامه من أجل التصوير الجزيئي للخلايا داخل الجسم الحي، والذي قد يصل إلى 6-7 ساعات في الدوران عند الجرذ و2.5 ساعة في الإنسان، بالإضافة لذلك قد ترتفع ألفته تجاه الفوسفاتيديل سيرين المعروض على سطح الخلايا المتماوتة مقارنة بالشكل أحادي القسيم (Kuypers et al. 2007).

2. هدف البحث:

هدف هذا البحث إلى إنتاج شكل جديد من بروتين الأنكسين V البشري المؤشب بالاعتماد على أنظمة التنسيل المورثي والتعبير البروتيني في *E. coli*، وباستخدام البلازميد pRSET-CH3-ANXV الذي يتيح لنا الحصول على الأنكسين V

في بنية بروتينية ثنائية القسيم، هذه البنية ستحسن من فعاليته في ربط الفوسفاتيديل سيرين والكشف عن الموت الخلوي المبرمج.

3. مواد وطرائق البحث

3.1. السلالات البكتيرية وشروط النمو

استُخدمت سلالتين من *E. coli* من النوع (TOP10, Invitrogen) والنوع (BL21 GOLD DE3, Novagen) من أجل التنسيل المورثي والتعبير البروتيني على التوالي. استُنبتت هذه الخلايا في وسطٍ مغذٍ (LB, Bio Basic INC) حاوٍ على المضاد الحيوي الأمبسلين (Ampicillin 100 µg/ml, Sigma) في حاضنة رجاجة عند الدرجة 37°م.

3.2. تركيب البلازميد pRSET-hCH3-ANXV

ضُخّمت الشدفة الخاصة بمجال البلمرة hCH3 من بلازميد (pcDNA3-huCH3-m779ECD) الذي زودنا به مشكورا العالم الإيطالي Oscar Burrone، عن طريق تفاعل البلمرة التسلسلي PCR باستخدام شفع من المرئسات (hCH3 F/R) التي صُممت باستخدام برنامج المعلوماتية الحيوية Geneious بحيث تضخم المجال hCH3 وتضيف مواقع التعرف الخاصة بإنزيمي التقييد NdeI/6xHis و NheI للنهايات '3 و'5 على التوالي (الجدول 1). وقد تم التضخيم باستخدام أنزيم عالي الوثوقية (AccuPrim™Taq Polymerase High fidelity, Invitrogen) وذلك لتجنب أي خطأ في تسلسل النكليوتيدات أثناء تضخيم المورثة. تضمن برنامج البلمرة فترة التمسخ الأولية Initial denaturation مدة 3 دقائق عند الدرجة 94°م، أُتبِعت هذه الخطوة بـ 35 دورة تضمنت كل دورة، التمسخ Denaturation عند الدرجة 94°م مدة 30 ثانية، الإلتحام Annealing عند الدرجة 58°م مدة 45 ثانية، والاستطالة Extension عند الدرجة 68°م لمدة دقيقة.

نُسّلت الشدفة hCH3 المضخمة على مرحلتين، بداية ضمن البلازميد pDRIVE ثم قُطع البلازميد الناتج pDRIVE-hCH3 والحاوي على مورثة hCH3 بالإضافة للبلازميد pRSET-ANXV المحضّر من بحث سابق (Abbady et al. 2017) والحاوي على مورثة ANXV بإنزيمي التقييد (NdeI/NheI) ثم لُحمت نواتج القطع باستخدام طاقم لِحام جاهز (Ready-To-Go™ T4 DNA ligase Kit, GE Healthcare). استُخدم ناتج اللحام في تحوير السلالة البكتيرية TOP10 بطريقة الصعق الكهربائي. حصلنا بعد التحوير على العديد من المستعمرات البكتيرية النامية على طبق LB بوجود الأمبسلين. ولانتقاء المستعمرات البكتيرية الإيجابية الحاوية على التراكيب البلازميدية الصحيحة، أُجري تفاعل PCR باستخدام مرئسات نوعية للبلازميد pRSET (T_7F/T_7R) (الجدول 1). استُخلص البلازميد pRSET-hCH3-ANXV من المستعمرات الإيجابية باستخدام طاقم خاص بالتحضير البلازميدي (Miniprep, Qiagen)، ومن أجل التأكد من نوعية الشدف الناتجة، قُطعت باستخدام إنزيمي التقييد (XbaI/HindIII).

الجدول رقم (1):المرئسات المستخدمة في الدراسة

يضم الجدول أسماء وأطوال وتسلسلات المرئسات التي تم استخدامها في تضخيم شدف الدنا لمورثة hCH3 وذلك بتفاعل البلمرة بغية تنسيلها في بلازميد pRSET-ANXV.

نوع المرئسة	اسم المرئسة	طول المرئسة	التسلسل النيكلوتيدي للمرئسة
المرئسات الخاصة بتضخيم مورثة CH3	hCH3F (NdeI+6xHis)	57	5'-ATATCATATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGCTCTGGGGGGCAGCCCCG-3'
	hCH3R (NheI)	31	5'-ATATGCTAGCACCGGAAGATCCTTTACCCGG-3'
المرئسات الخاصة بالبلازميد pDRIVE	FP	24	5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
	RP	22	5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'
المرئسات الخاصة بالبلازميد pRSET	T7F	20	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
	T7R	20	5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3'

3.3.التعبير البروتيني عن البروتين المؤشب

حُوّرت السلالة البكتيرية BL21(DE3) بطريقة الصعق الكهربائي باستخدام البلازميد pRSET-hCH3-ANXV الحامل لمورثة hCH3 بشكل مندمج مع مورثة ANXV ونُمّيت الخلايا بعد التحوير على أطباق LB الحاوية على الأمبسيلين. تم اختيار مستعمرة إيجابية وحيدة من الطبق المزروع وحضنها في وسط زراعة حاوٍ على الأمبسيلين لمدة ليلة كاملة في حاضنة رجاجة عند الدرجة 37°م. في اليوم التالي حُضن حوالي 10 مل من الزراعة السابقة مع 1 ليتر من وسط الزراعة مضافاً إليه الأمبسيلين وعند بلوغ العكارة المطلوبة OD_{600}=0.5-0.7 أُضيف إلى وسط الزراعة مركب (Isopropylthio-D-galactoside, IPTG, Promega) بتركيز نهائي 0.5 mM من أجل تحريض التعبير البروتيني، وحُضن المستنبت ليلة كاملة عند الدرجة 37°م. بعدها رُسّبت الخلايا وأعيد حلُها باستخدام المحلول الموقي (20 mM imidazole, 20 mM Tris-base, 300 mM NaCl) وحُطمت الجدر البكتيرية الخارجية بالأمواج فوق الصوتية باستخدام جهاز (Sonication, Lab Sonic)، ثم ثُفل المعلّق بسرعة 8000 دورة/دقيقة لمدة 8 دقائق. أخيراً تم التخلص من الرسابة والاحتفاظ بالطافي الحاوي على البروتين المؤشب.

3.4. تنقية البروتين المؤشب

نُقّيَ البروتين المؤشب hCH3-ANXV وذلك بتمرير الخلاصة السيتوبلاسمية للخلايا البكتيرية على عمود التنقية المشحون بجزيئات النيكل (Ni-NTA Agarose; Qiagen) باستخدام نظام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء السريع (FPLC AKTA prime, GE Life Science)، حيث شُطفت البروتينات غير المرتبطة Flow-through عن عمود النيكل باستخدام موقي الشطف (16.2 mM Na2HPO4, 3.8 mM NaHPO4, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH:7.4)، وحُرّر البروتين المؤشب النقي من العمود عن طريق تمرير نفس الموقي السابق ولكن بوجود تركيز أعلى من الإيميدازول (500 mM) والذي يعد المنافس القوي للواسم الهستيديني للارتباط بشوارد النيكل. أخيراً تم تركيز البروتين النقي باستخدام أنبوب التركيز (VivaSpin, Vivascience) ذو المسامية 10 كيلو دالتون، ثم قيس تركيزه بطريقة Bradford وعُدل إلى 1 ملغ/مل من أجل التخزين المديد عند الدرجة -20°م.

3.5. الرحلان الكهربائي للبروتينات والكشف المناعي

رُحّلت عينات البروتين المؤشب النقي بتركيز (0.5-1 µg) على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE باستخدام نظام BioRad mini-Protein II system حسب تعليمات الشركة المنتجة. وحُضّرت الهلامات باستخدام هلامة عليا بتركيز 4 % لتكديس العينات وهلامة سفلى بتركيز 12 % لترحيل العينات. بعد الانتهاء من الرحلان الكهربائي، صُبغت الهلامة بمحلول صبغة أزرق الكوماسي لمدة ساعة مع التحريك ثم نُقلت إلى محلول إزالة الصبغ وتُركت مع التحريك حتى ظهور العصائب. ولإجراء التبصيم المناعي Western Blot نُقلت البروتينات من الهلامة غير المصبوغة إلى غشاء 0.45 µm من النتروسيليلوز (BioRad) باستخدام محلول التبصيم (25 mM Tris-base, 200 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol). بعد الحضن بموقي الإحصار Blocking (3% حليب منزوع الدسم، في TBS × 1)، حُضن الغشاء مع الأضداد النوعية لبروتين الأنكسين V المحضرة في الأرنب بتمديد (1:3000) لمدة ساعة كاملة بدرجة حرارة المخبر. وبعد الغسل عدة مرات بموقي الغسل TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05 % tween20) تم الكشف عن ارتباط الضد مع المستضد النوعي له بالحضن مع مصل الماعز الحاوي على أضداد تجاه بروتينات الأرنب والموسوم بإنزيم بيروكسيداز فجل الخيل (Horseradish peroxidase conjugated goat anti rabbit, BioRad) بتمديد (1:3000) لمدة ساعة أيضاً.

في حين أُجري التبصيم النقطي Dot blot بإضافة 10 µl من بروتين CH3-ANXV إلى غشاء النتروسيليلوز، كما تم استخدام البروتين الأخضر المتفلور عالي الطي sfGFP (Al-Homsi et al. 2012) كشاهد سلبي، وبعد تعبئة فراغات الأغشية بموقي الإحصار، حُضنت الأغشية لمدة ساعة مع أمصال الأرنب الحاوية إما على الأضداد النوعية للأنكسين V بتمديد (1:3000) أو للغلوبولينات المناعية البشرية بتمديد (1:1000) أو النوعية للبروتين الأخضر المتفلور بتمديد (1:3000)، تلى ذلك الكشف باستخدام مصل الماعز الموسوم بإنزيم البيروكسيداز والحاوي على أضداد تجاه بروتينات الأرنب بتمديد (1:3000) وفي نهاية تجربتي التبصيم المناعي والتبصيم النقطي، أُظهرت عصائب البروتينات والنقاط بإضافة مداد ملوّن اللون (AEC 3-amino-9-ethylcarbazole, chromogen substrate) المحلول في موقي الأسيتات بوجود الماء الأكسجيني.

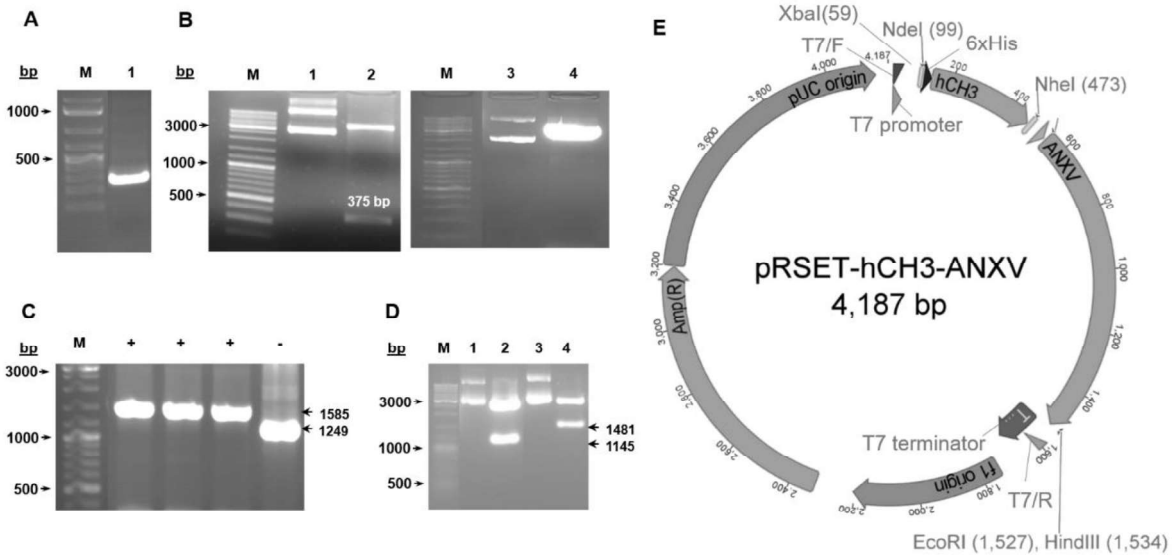
3.6. اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية

تم تطبيق اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية الشطائرية (Sandwich-ELISA) حيث غُلّفت صفيحة ذات 96 بئر (Maxisorb-Nunc) باستخدام أضداد الأنكسين V منحلة ضمن موقي كربونات الصوديوم بتمديد (1:1000) مدة ليلة كاملة عند الدرجة 4°م وفي اليوم التالي غُسلت الصفيحة ثلاث مرات بالموقي TBS-T. في حين تم تعبئة بقية مواقع ارتباط البروتينات على سطح الآبار باستخدام موقي الإحصار لمدة ساعة عند درجة حرارة المخبر. بعد التخلص من موقي الإحصار، غُسلت الصفيحة وحُضنت ساعة أخرى مع البروتينات المؤشبة. بعدها غُسلت الصفيحة ثلاث مرات ثم أُضيفت الأضداد النوعية لواسم سداسي الهستيدين لمدة ساعة كاملة. ومن أجل الكشف عن الارتباط النوعي بين المستضد والضد، أُضيف مصل الماعز الحاوي على أضداد تجاه بروتينات الأرنب والموسوم بأنزيم بيروكسيداز فجل الخيل لمدة ساعة عند درجة حرارة المخبر. وبعد غسل الصفيحة، أُضيف المداد (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine, TMB, Sigma) ثم حمض الكبريت 1 M لإيقاف التفاعل، ثم قيست المطيافية الناتجة عند طول الموجة 450 نانومتر.

4. النتائج ومناقشتها

4.1.تنسيل مورثة hCH3 داخل البلازميد pRSET-ANXV

أعطى تفاعل PCR باستخدام شفع المرئسات hCH3 F/R شدفة من الدنا الخاصة بمجال البلمرة hCH3 بطول 400 bp (الشكل 1A). نُسّلت الشدفة السابقة في بلازميد pDRIVE. أعطى قطع بلازميد pDRIVE–hCH3 بإنزيمي التقييد (NdeI/NheI) شدفة بطول 375 bp ذات نهايات لزجة جاهزة للالتحام مع البلازميد pRSET–ANXV بعد أن تم قطعه بنفس إنزيمي التقييد (الشكل 1B). استُخدم ناتج الالتحام من أجل تحوير السلالة البكتيرية TOP10 واختيرت المستعمرات الإيجابية بواسطة تفاعل PCR باستخدام مرئسات نوعية للبلازميد pRSET (T_7F/T_7R)، حيث تظهر شدفة بطول 1585 bp إن كانت إيجابية – أي حاوية على البلازميد وبه شدفة CH3 – مقارنة بالشدفة 1249 bp عند غياب CH3 (الشكل 1C). نُمّيت المستعمرات الإيجابية واستُخدمت من أجل تنقية البلازميدات بطريقة Miniprep، وتم التحقق من البنية



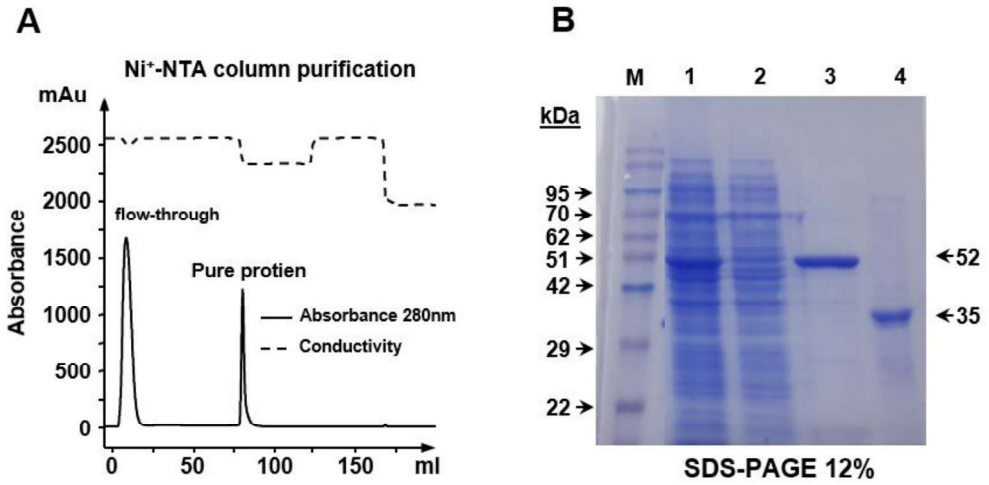
الشكل رقم (1) : مراحل التنسيل المورثي والحصول على البنية البلازميدية pRSET–hCH3–ANXV

الصحيحة للبلازميد الناتج بقطعه بإنزيمي التقييد (XbaI/HindIII)، حيث نلاحظ على هلامة الرحلان أن الشدفة 1481 bp الناتجة عن المعاملة الإنزيمية للبلازميد pRSET–hCH3–ANXV أعلى من الشدفة 1145 bp الناتجة عن معاملة البلازميد الشاهد بنفس الأنزيم (الشكل 1D). يمتاز البلازميد pRSET–hCH3–ANXV بوجود المحضض الفعال T7 الذي يؤدي إلى زيادة مستوى التعبير البروتيني، بالإضافة إلى واسم سداسي الهستيدين الذي تم تنسيله من النهاية الأمينية للبروتين CH3–ANXV (الشكل 1E). عادة ما يتم إضافة هذا الواسم إلى الطرف الأميني أو الكربوكسيلي من البروتينات المؤشبة حيث يُعتبر ضرورياً لخطوات التنقية والكشف عن البروتين المؤشب باستخدام الأضداد النوعية له. كما يحوي البلازميد الشدفة hCH3 والتي نُسّلت من الطرف الأميني لمورثة ANXV، لقد ذكر باحثون في دراسات سابقة أنه يفضل الدمج من الطرف الأميني لبروتين ANXV وإلا سوف يفقده قدرته على الارتباط مع جزيئات الفوسفاتيديل سيرين (Ernst et al. 1998).

(**A**) الرحلان الكهربائي لناتج تضخيم مورثة hCH3 باستخدام المرئسات hCH3 F/R (المسار 1). (**B**) ناتج قطع البنى البلازميدية بإنزيمات التقييد (NdeI/NheI)، يحتوي (المسارين 1 و2) البلازميد pDRIVE قبل وبعد القطع، في حين يحتوي (المسارين 3 و4) الشدف الخاصة بالبلازميد pRSET-ANXV قبل وبعد القطع على التوالي. (**C**) نواتج تفاعل البلمرة الذي أُجري على المستعمرات البكتيرية للتأكد من دخول البنى البلازميدية pRSET-hCH3-ANXV باستخدام المرئسات (T_7F/T_7R). (**D**) التأكد من صحة البنية البلازميدية الناتجة عن عملية التنسيل من خلال قطعها بإنزيمي التقييد XbaI/HindIII وفصل نواتج القطع: يحتوي (المسارين 1 و2) الشاهد السلبي وهو البلازميد pRSET-ANXV قبل وبعد عملية القطع على التوالي، بينما يحتوي (المسارين 3 و4) البلازميد pRSET-hCH3-ANXV قبل وبعد عملية القطع. فُصلت الشدف على هلامات من الأغاروز بتركيز 1.5% ويمثل (المسار M) سلم الدنا الجزيئي المعياري في كافة الأشكال. (**E**) ترسيم دائري لبنية البلازميد pRSET-hCH3-ANXV تظهر فيها أهم المكونات المميزة له مثل المحضض T_7، التسلسل المرمز لواسم سداسي الهستيدين 6x His tag، مورثتي مجال البلمرة hCH3 وبروتين ANXV، التسلسل المسؤول عن تضاعف البلازميد f1 origin ضمن السلالة *E. coli* والمورثة المقاومة للأمبسلين Amp، بالإضافة لمواقع التحام المرئسات النوعية (T_7F/T_7R) وأنزيمات التقييد المستخدمة في التنسيل.

4.2. تحضير بروتين ANXV-CH3 المؤشب

بعد نهاية مراحل التعبير البروتيني عن hCH3-ANXV، نُقّي البروتين المؤشب بالاعتماد على وجود واسم سداسي الهستيدين ذو الألفة العالية لشوارد النيكل المنتشرة على ملاط عمود التنقية. سمح جهاز الكروماتوغرافيا ذات الألفة المعدنية بمتابعة عملية التنقية المباشرة، حيث لوحظ ظهور قمة عالية نسبياً في منحنى الامتصاصية بطول الموجة 280 نانومتر النوعية للبروتينات مما يشير إلى كمية جيدة من البروتين النقي (الشكل 2A). تم الكشف عن البروتين المؤشب النقي باستخدام الرحلان الكهربائي عبر هلامة الأكريلاميد الملونة بأزرق الكوماسي حيث ظهرت عصابة بوزن جزيئي يقارب 52 كيلو دالتون مقارنة مع بروتين ANXV بوزن 35 كيلو دالتون (الشكل 2B). بالمقارنة مع دراسات سابقة، تم استخدام طرائق مختلفة ومتعبة من أجل تنقية بروتين ANXV معتمدين بذلك على ألفة هذا البروتين لجزيئات الفوسفاتيديل سيرين بوجود شوارد الكالسيوم، حيث تمت تنقية ANXV لفترة طويلة بهذه الطريقة (Ernst et al. 1998). في هذه الدراسة قمنا بإضافة واسم سداسي الهستيدين من الطرف الأميني واستخدام عمود مشحون بالنيكل كطريقة بديلة وجيدة لتنقية البروتين. أثبت هذا النوع من التنقية فعاليته في دراسات سابقة جرت في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية حيث تم إنتاج العديد من البروتينات المؤشبة وتنقيتها بهذه الطريقة (Abo Assali et al. 2011, Abo Assali et al. 2012, Al-Homsi et al. 2012, Al-Homsi et al. 2012). ونظراً لصغر حجمه (~2 كيلو دالتون)، فإن واسم سداسي الهستيدين لا يسبب مشكلة تتعلق بالوزن الجزيئي الأكبر للبروتينات المندمجة معه، كما أنه من غير المرجح أن تثبط عملية التنقية من خلال هذا الواسم وظيفة البروتين المندمج معه. بالإضافة إلى ذلك، فإن درجة حموضة الموقي المستخدم أثناء عملية التنقية الخاصة به تتراوح بشكل عام بين 7 و8، وهو مناسب لفعالية بروتين الأنكسينV (Logue et al. 2009). أخيراً تم الحصول على بروتين بنقاوة حوالي 90% وبقياس تركيز البروتين بطريقة Bradford كانت مردوديته بحدود 50 ملغ من كل ليتر من الوسط البكتيري المحضر.

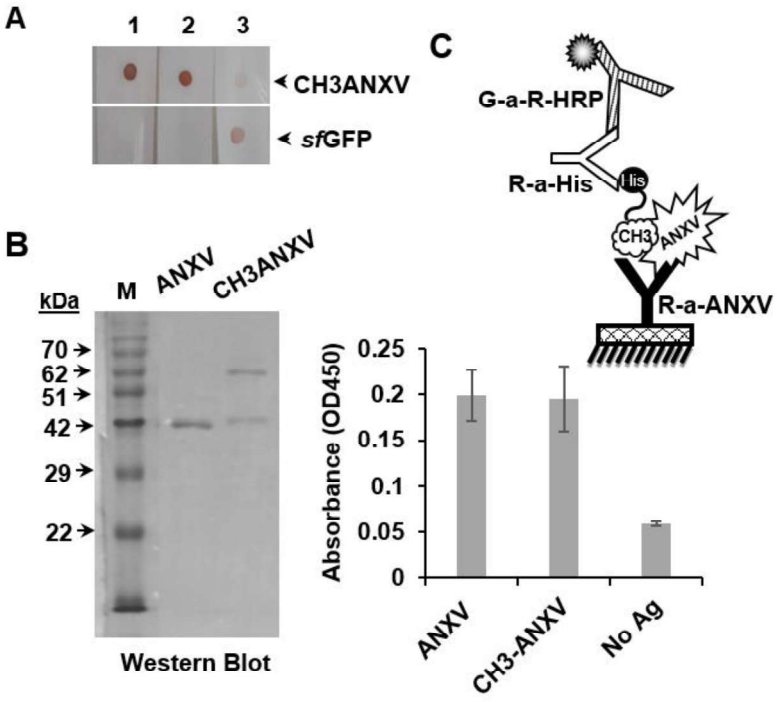


الشكل رقم (2): مراحل التعبير البروتيني عن البروتين CH3–ANXV وتنقيته

(**A**) رسم تخطيطي يوضح عملية تنقية البروتين المؤشب باستخدام عمود النيكل Ni^{+}–NTA المثبت على جهاز كروماتوغرافيا الألفة المعدنية، يمثل الخط المستمر امتصاصية الطور الخارج من العمود، كما تمت الإشارة للمنحنيات الخاصة بالجزء المغسول عن العمود (flow–through) بالإضافة لعينة البروتين النقي، أما الخط المنقط فيمثل الناقلية الكهربائية للجزء المشطوف عن العمود. (**B**) هلامة عديد الأكريلاميد 12% المصبوغة بأزرق الكوماسي بعد ترحيل الخلاصة البروتينية المحضرة من البكتيريا المحورة ببلازميد pRSET–hCH3–ANXV و ذلك بعد تحريض التعبير البروتيني فيها، حيث يمثل المسار1: طافي التحطيم بالأمواج فوق الصوتية، والمسار2: راشح العمود خلال التنقية والمسار3: يمثل بروتين CH3–ANXV المؤشب النقي يمثل المسار4: الشاهد وهو بروتين ANXV المؤشب النقي ، كما يظهر في المسار M سلم الأوزان الجزيئية مقدراً بالكيلو دالتون.

4.3.الكشف المناعي عن بروتين CH3–ANXV

تم الكشف عن بروتين CH3–ANXV من خلال تقانات حيوية مختلفة. أكدت نتائج التبصيم النقطي احتواء البروتين المنتج على مجال البلمرة CH3 من خلال تفاعله مع الأضداد النوعية للغلوبولينات المناعية، كما ثبت وجود ANXV في البروتين من خلال تفاعله مع الأضداد النوعية لبروتين الأنكسين V متعددة النسيلة والمحضرة في الأرنب وذلك في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية، في حين أن البروتين CH3–ANXV لم يبد تفاعلاً مع الضد النوعي للبروتين الأخضر المتفلور والذي استُخدم كشاهد وكان قادراً على التفاعل مع المستضد الخاص به (sfGFP) فقط (الشكل 3A). وبشكل مماثل أكدت تجربة التبصيم المناعي قدرة أضداد الأنكسين V في الكشف عن بروتين CH3–ANXV حتى بعد فقدانه البنية الثلاثية إثر الرحلان الكهربائي (الشكل 3B). وبالاعتماد على طريقة المقايسة المناعية الإنزيمية الشطائرية، غُلّفت الصفيحة بأضداد الأنكسين V التي استُخدمت هنا لربط بروتينات ANXV وليس للكشف عنها. بعدها أضيف البروتينات المؤشبة ANXV أو CH3– ANXV حيث استطاعت الأضداد النوعية لواسم سداسي الهستيدين الكشف عنها مقارنة بغياب المستضد (No Ag) (الشكل 3C).



الشكل رقم (3) : الكشف المناعي عن بروتين CH3–ANXV

(**A**) التبصيم النقطي باستخدام ثلاثة أنواع من الأضداد النوعية: الضد النوعي للغلوبيلينات المناعية البشرية (1) والضد النوعي للأنكسين V (2) والضد النوعي للبروتين الأخضر المتفلور(3) من أجل الكشف عن البروتينات المؤشبة: CH3–ANXV و sfGFP كشاهد سلبي. (**B**) التبصيم المناعي للبروتينات المؤشبة: تم تثبيت (0.5 ميكروغرام/بئر) من CH3–ANXV و ANXV على غشاء النتروسيليلوز وذلك بعد ترحيلها على هلامة عديد الأكريلاميد 12% واستخدام أضداد الأنكسين V للكشف عنها، وبوجود سلم الأوزان الجزيئية الخاص بالبروتينات في المسار M. (**C**) تم إجراء اختبار المقايسة المناعية الإنزيمية الشطائرية وذلك بتغليف الصفيحة بأضداد الأرنب الموجهة للأنكسين V التي استخدمت كضد لاقط للكشف عن بروتين الأنكسين V، بعدها تم الكشف عن ارتباط المستضد بواسطة أضداد واسم الهستيدين كما تم اختبار غياب المستضد كشاهد سلبي للتجربة.

الاستنتاجات والتوصيات

يعد نظام التعبير عن البروتينات المؤشبة أداة هامة للأبحاث البيولوجية الأساسية والتطبيقية الطبية بالإضافة للأهداف التجارية (Khan 2013). يعد بروتين CH3–ANXV المنتج أداة هامة تسمح بإمكانية إجراء جملة من الدراسات بهدف تقييم فعاليته وكفاءته في ربط الفوسفاتيديل سيرين بالمقارنة مع بروتين ANXV، حيث نوصي بوسمه بمركبات التفلور واختباره في الكشف عن الموت الخلوي المبرمج في الزجاج وجسم الكائن الحي.

الشكر

يتقدم معدّي الورقة بجزيل الشكر للسادة المدير العام لهيئة الطاقة الذرية السورية ورئيس قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية لدعمهما المتواصل أثناء هذا العمل.

المراجع

1- Abbady, A. Q., A. Twair, B. Ali and H. Murad, (2017). Characterization of Annexin V Fusion with the Superfolder GFP in Liposomes Binding and Apoptosis Detection. Front Physiol, **8**: 317.

2- Abo Assali, L., A. Al Mariri, E. Hamad and A. Q. Abbady, (2011). Cloning and protein expression of Yersinia GroEL using pHEN6 plasmid. Damascus Univ J Basic Sci, **00**(00): 00-00.

3- Abo Assali, L., H. Masoud, A. Al Mariri, E. Hamad and A. Q. Abbady, (2012). Cloning and expression of recombinant Brucella GroEL using pHEN6 plasmid. Mansoura J Biol, **38**(1): 00-00.

4- Al-Homsi, L., J. M. Al-Assad, M. Kweider, S. Al-Okla and A. Q. Abbady, (2012). Construction of pRSET-sfGFP plasmid for fusion-protein expression, purification and detection. Jordan J Biol Sci, **5**(4): 279-288.

5- Al-Homsi, L., S. Al-Okla and A. Q. Abbady, (2012). Cloning of Mutacin gene from Streptococcus mutans and its protein expression using pT7-his plasmid. J Agricult Chem Biotech, **3**(1): 19-28.

6- Arraud, N., C. Gounou, R. Linares and A. R. Brisson, (2015). A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. J Thromb Haemost, **13**(2): 237-247.

7- Brumatti, G., C. Sheridan and S. J. Martin, (2008). Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. Methods, **44**(3): 235-240.

8- Ernst, J. D., L. Yang, J. L. Rosales and V. C. Broaddus, (1998). Preparation and Characterization of an Endogenously Fluorescent Annexin for Detection of Apoptotic Cells. Anal Biochem, **260**(1): 18-23.

9- Fatimathas, L. and S. E. Moss, (2010). Annexins as disease modifiers. Histol Histopathol, **25**(4): 527-532.

10- Khan, K. H., (2013). Gene expression in Mammalian cells and its applications. Adv Pharm Bull, **3**(2): 257-263.

11- Kuypers, F. A., S. K. Larkin, J. J. Emeis and A. C. Allison, (2007). Interaction of an annexin V homodimer (Diannexin) with phosphatidylserine on cell surfaces and consequent antithrombotic activity. Thromb Haemost, **97**(3): 478-486.

12- Lahorte, C. M., J. L. Vanderheyden, N. Steinmetz, C. Van de Wiele, R. A. Dierckx and G. Slegers, (2004). Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. Eur J Nucl Med Mol Imaging, **31**(6): 887-919.

13- Li, E., A. Pedraza, M. Bestagno, S. Mancardi, R. Sanchez and O. Burrone, (1997). Mammalian cell expression of dimeric small immune proteins (SIP). Protein Eng, **10**(6): 731-736.

14- Logue, S. E., M. Elgendy and S. J. Martin, (2009). Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. Nat Protoc, **4**(9): 1383-1395.

15- Olusanya, T. O. B., R. R. Haj Ahmad, D. M. Ibegbu, J. R. Smith and A. A. Elkordy, (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. Molecules, **23**(4).

16- Peng, B., C. Guo, H. Guan, S. Liu and M. Z. Sun, (2014). Annexin A5 as a potential marker in tumors. Clin Chim Acta, **427**: 42-48.

17- Reutelingsperger, C. P., G. Hornstra and H. C. Hemker, (1985). Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. Eur J Biochem, **151**(3): 625-629.

18- van Engeland, M., L. J. Nieland, F. C. Ramaekers, B. Schutte and C. P. Reutelingsperger, (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry, **31**(1): 1-9.

19- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken and C. Reutelingsperger, (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods, **184**(1): 39-51.

20- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman, (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. Ann Hematol, **84**(10): 627-639.

21- Wang, F., X. W. He, H. L. Yan, J. J. Huang, Y. Zhang, L. Jiang, Y. J. Gao and S. H. Sun, (2006). Non-fusion expression in Escherichia coli: Single-step purification of recombinant human annexin A5 for detection of apoptosis. Protein Expr Purif, **45**(1): 80-87.

22- Wang, J., L. He, D. Chen, Y. Pi, W. Zhou, X. Xiong, Y. Ren, Y. Lai and Z. Hua, (2015). Quantitative analysis of annexin V-membrane interaction by flow cytometry. Eur Biophys J, **44**(5): 325-336.

23- Yang, D. J., A. Azhdarinia, P. Wu, D. F. Yu, W. Tansey, S. K. Kalimi, E. E. Kim and D. A. Podoloff, (2001). In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using 99mTc-EC-annexin V. Cancer Biother Radiopharm, **16**(1): 73-83.

24- Zhang, L., H. Zhou, O. Belzile, P. Thorpe and D. Zhao, (2014). Phosphatidylserine-targeted bimodal liposomal nanoparticles for in vivo imaging of breast cancer in mice. J Control Release, **183**: 114-123.