Research Article

Nova Biologica Reperta 9(4): 267-278 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.9.4.267

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۹، شماره ۴، صفحات ۲۶۷ الی ۲۷۸ (۱۴۰۱)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

بهینه سازی تخلیص پروتئین لایه S از سویه *Deinococcus radiodurans* R1

مهدی علی‌جانیان‌زاده[۱]، علیرضا جلالوند[۲]، رسول خلیل‌زاده[۳] و مریم عبدلی راد[۳]

[۱]گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، کرج، ایران؛[۲]بخش آنفولانزا و ویروس‌های تنفسی شایع، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران؛[۳]پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: مهدی علی‌جانیان‌زاده، Alijanian@khu.ac.ir

چکیده. پروتئین‌های لایه سطحی *Deinococcus radiodurans* یکی از بهترین سیستم های خودآرایی در بین پروتئین‌های دیگر هستند که نقش اساسی در ساخت نانوسیم ها دارند. بنابراین لازم است این پروتئین‌ها خالص سازی شوند. هدف از این تحقیق بهینه سازی خالص سازی پروتئین لایه سطحی از *D. radiodurans* با روش سطح پاسخ است. ابتدا سه عامل غلظت SDS، زمان انکوباسیون و درصد جرم در پنج سطح در نظر گرفته شد و ۲۰ اجرا با نرم افزار Design-Expert با روش مرکب مرکزی طراحی شد. هر مرحله شامل کشت میکروب، آماده سازی سلول انبوه، انکوباسیون میکروب در غلظت خاص SDS و زمان و درصد جرم، جداسازی باکتری از مواد شوینده با سانتریفیوژ در ۵۰۰۰g، ته نشینی پروتئین‌های لایه سطحی از محلول شوینده با سانتریفیوژ در ۲۰۰۰۰g، تعیین غلظت و خلوص پروتئین به ترتیب با روش برادفورد و SDS-PAGE است. در نهایت داده‌های به دست آمده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد که در سطح اطمینان ۹۵ درصد، تأثیر فاکتور غلظت ماده شوینده بر درصد پروتئین خالص شده بیشتر از سایر عوامل بود. نتایج بهینه سازی فاکتورها بدین صورت بود: غلظت SDS ۵/۶۴ درصد، درصد جرم ۷/۳۳ درصد و ۳ ساعت زمان انکوباسیون. در شرایط بهینه، غلظت پروتئین و درصد خلوص به ترتیب ۰/۵۸۴ mg/ml و ۴۷/۶۱ درصد به دست آمد.

واژه‌های کلیدی. الکتروفورز، پروتئین لایه سطحی، تخلیص، سطح پاسخ، شوینده

Optimization of S-layer protein purification from *Deinococcus radiodurans* strain R1

Mahdi Alijanianzadeh[1], Alireza Jalalvand[2], Rasoul Khalilzadeh[3] & Maryam Abdolirad[3]

[1]Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran; [2]Department of Influenza and Other Respiratory Viruses, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; [3]Department of Bioscience and Biotechnology, Malek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Correspondent author: Mahdi Alijanianzadeh, Alijanian@khu.ac.ir

Abstract. S-layer proteins of *Deinococcus radiodurans* are the best self-assemble systems among other proteins that have an essential role in the fabrication of nanowires. Therefore, the purification of these proteins is necessary. The purpose of this research was to optimize the purification of s-layer protein from *D. radiodurans* with the response surface method. The three factors of SDS concentration, incubation time and mass percent in five levels were considered, and 20 runs were designed by Design-Expert software with a central composite method. Each run includes microbe culture, mass cell preparation, microbe incubation in specific SDS concentration and time and mass percent, separation of the bacteria from detergent with a centrifuge at 5000g, sedimentation of s-layer proteins from detergent solution with a centrifuge at 20000g, determination of protein concentration, and protein purity by Bradford and SDS-PAGE methods, respectively. Finally, the data obtained were analyzed. Analysis of the results demonstrated that at the 95% confidence level, the effect of the detergent concentration factor on the purified protein percent was more than other factors. The optimization results of factors are 5.64% SDS concentration, 7.33% mass percent, and 3 hours incubation time. At optimized conditions the protein concentration and purity percent were obtained 0.584 mg/ml and 47.61% respectively.

Key words. electrophoresis, detergent, purification, response surface, surface layer protein

Received 04.05.2022/ Revised 18.08.2022/ Accepted 02.11.2022/ Published 20.03.2023

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۴/ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۵/۲۷/ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۱/ انتشار: ۱۴۰۱/۱۲/۲۸

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

مقدمه

امروزه نانوتکنولوژی با استفاده از علم زیست شناسی، شیمی و علم مواد توانسته به جایگاهی اساسی در علم مدرن دست یابد و فرصت‌های گوناگونی را ایجاد کند. همیشه، سیستم های خودآرایی در فناوری نانو یکی از زمینه‌های مورد علاقه محققان است. سیستم‌های خودآرایی تحت شرایط خاص تجمعات مولکولی بزرگی را خود به خود ایجاد می‌کنند. یکی از سیستم‌های خودآرایی، پروتئین‌های لایه سطحی (پروتئین‌های لایه S) باکتری‌ها هستند که رویکرد جدیدی را برای ساخت ساختارها و ابزارهای فوق مولکولی با ضخامت حدود ۱۰ نانومتر ایجاد می‌کند. لایه S برخی از باکتری‌ها یک آرایه منظم تولید می‌کند که این آرایه‌ها از بلوک‌های پروتئین ساخته شده‌اند. این پروتئین‌ها پس از جداسازی از باکتری‌ها می‌توانند روی سطوح مختلف با فرم استاندارد در شرایط خاص قرار بگیرند. الگوهای زیستی نانو یکی از کاربردهای پروتئین لایه S هستند که می‌توانند حسگر زیستی، بیوچیپ، نانوسیم و غیره تولید کنند (Farci et al., 2020; Schuster & Sleytr, 2014; Shukla et al., 2022).

لایه S در بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، آرکیا و برخی از جلبک‌های سبز وجود دارد (Herrmann et al., 2020; Madhurantakam et al., 2014). لایه S به طور کامل سطح سلول را می پوشاند و نقش‌های کلیدی از جمله ارتباط سلول با محیط، محافظت از سلول، شکل دادن به سلول، تقسیم سلولی، انعطاف پذیری سلول و غیره را دارد (Bharat et al., 2021; Klotz et al., 2020; Pum et al., 1991). طبق مطالعات ساختاری و بیوشیمیایی، لایه S به سه گروه عمده تقسیم می‌شود که عبارتند از: ۱. پوشش سلولی آرکیا باکتری‌ها که لایه S به غشای سلولی متصل است (شکل ۱A)، ۲. پوشش سلولی باکتری‌های گرم مثبت که لایه s به پپتیدوگلیکان ضخیم متصل شده اند (شکل ۱A) و ۳. پوشش سلولی باکتری‌های گرم منفی که لایه S به غشای خارجی چسبیده است (شکل ۱a) (Pum et al., 2013).

تجزیه و تحلیل شیمیایی نشان می‌دهد که ترکیب اصلی لایه S پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۴۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ دالتون هستند (Fagan & Fairweather, 2014; Pum et al., 2021; Sára & Sleytr, 1987). پروتئین‌های لایه S یکی از فراوان ترین بیوپلیمرهای روی زمین هستند. مطالعات اولیه بر روی پروتئین لایه S منجر به شکل گیری بینش گسترده‌ای در مورد ساختار، ژنتیک، شیمی، عملکرد و بازآرایی مجدد آن شده است (Pum et al., 2021; Pum et al., 2013). پروتئین‌های لایه S در آرایه‌های منظم قرار می‌گیرند. این آرایه‌ها شامل مورب (p1,p2)، مربع (p4) و شش ضلعی (p3, p6) (شکل ۱B) است (Pum et al., 2021; Schuster & Sleytr, 2013).

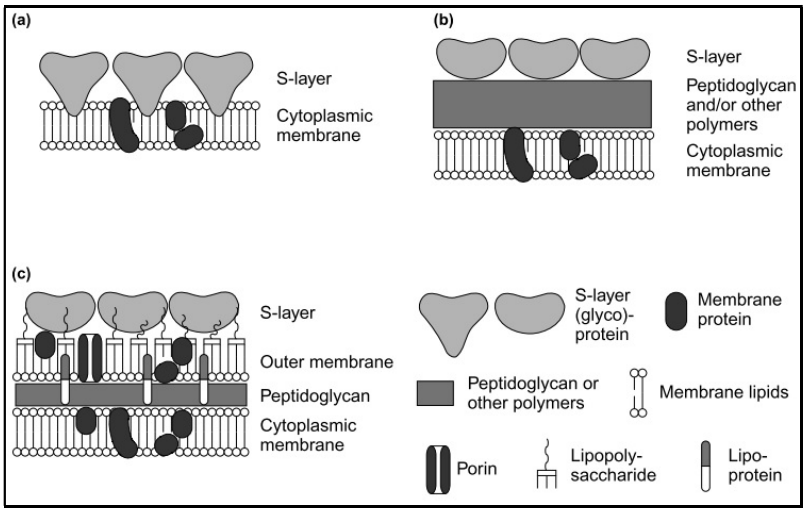
ویژگی قابل توجه این پروتئین‌ها خاصیت خودآرایی است. پروتئین‌های لایه S پس از جداسازی از باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌توانند در سطوح مختلف دوباره جمع شوند (Habibi et al., 2010). امروزه از پروتئین‌های لایه سطحی برای اهداف مختلفی از جمله تولید غشای اولترافیلتراسیون متخلخل با درجه تخلخل یکسان، تهیه ماتریکس برای اتصال مولکول‌ها و نانوذرات کاربردی، تولید واکسن، پوشش لیپوزوم، تصفیه زیستی و غیره استفاده می‌شود (A. Hollmann, 2010; Abdolirad et al., 2019; Cui et al., 2006; Li et al., 2020; Sára & Sleytr, 1987; Schuster, 2018; Schuster & Sleytr, 2013; Sleytr & Beveridge, 1999). برای دستیابی به این اهداف، ابتدا باید این پروتئین‌ها خالص شوند.

پروتئین‌های لایه سطحی *Deinococcus radiodurans* حاوی پروتئین‌های لایه میانی بسته بندی شده شش ضلعی (HPI) هستند که به شکل p6 هستند. سایر ویژگی‌های HPI عبارتند از: اندازه منافذ مرکزی در ۲/۲ نانومتر، فاصله مرکز دو منفذ مجاور ۱۸ نانومتر است و این پروتئین‌ها به برخی از پروتئین‌ها و غشای خارجی با میان‌کنش‌های آبگریز متصل می‌شوند(Rothfuss et al., 2006). بر اساس پایگاه داده UniProt، خواص فیزیکوشیمیایی HPI (P56867) عبارتند از: ۹۳۱ اسید آمینه بدون سیگنال پپتید، وزن مولکولی ۹۹ کیلو دالتون. با استفاده از ابزار ProtParam در سرویس ExPASy، اسیدهای آمینه اصلی ترئونین و گلیسین می‌باشد و pI = ۴/۸۷ است. پروتئین‌های HPI حاوی هفت سیستئین هستند که در بین پروتئین‌های مشابه قابل توجه است. تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی با طیف‌سنجی مادون قرمز بر روی HPI نشان می‌دهد که ۳۰ درصد پروتئین از چرخش و صفحات بتا تشکیل شده است (Abdolirad et al., 2016).

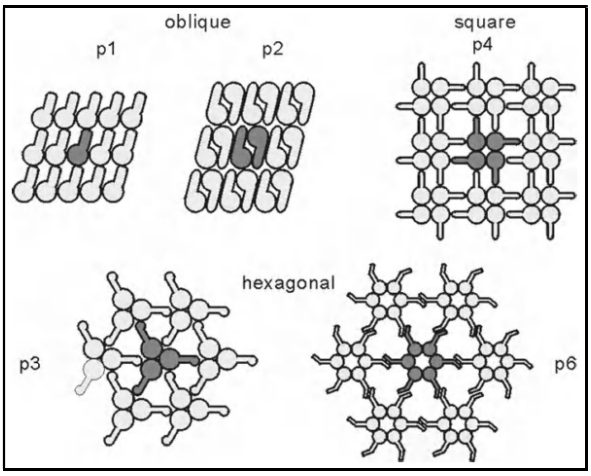
در بسیاری از پروژه‌ها، محققان پروتئین HPI را از سویه‌های R1 و Sark در شرایط خاصی مانند تولید الگوهای زیستی از *D. radiodurans* جدا کرده‌اند (Abdolirad et al., 2016; Baumeister W Fau - Karrenberg et al., 1982; Farci et al., 2016; Mark et al., 2006; Misra et al., 2015; Müller et al., 1996; Rachel et al., 1983; Rothfuss et al., 2006 ; Simonin et al., 2020). با این حال، هیچ مطالعه بهینه سازی قابل توجهی برای خالص سازی پروتئین HPI انجام نشده است. هدف از این تحقیق، بهینه سازی خالص سازی پروتئین‌های HPI از سویه های *D. radiodurans* گونه R1 با طراحی مرکب مرکزی (CCD) به روش سطح پاسخ (RSM) است. در این مطالعه غلظت و درصد خلوص پروتئین‌های HPI به ترتیب با روش برادفورد و روش SDS-PAGE اندازه گیری شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

A



B



شکل ۱- A) نمایش شماتیک محل قرارگیری پروتئین‌های لایه S در میکروارگانیسم‌های مختلف. a. S.layer در آرکی باکتری‌ها. b. پروتئین‌های لایه S در باکتری‌های گرم مثبت و c. پروتئین‌های لایه S در باکتری‌های گرم منفی. B) نمایش شماتیک پروتئین‌های لایه S در آرایه‌های منظم مختلف.

Figure 1. A) Schematic representaion of s-layer proteins localization in different type microorganisms. a. S.layer in archaea. b.S-layer proteins in gram-positive bacteria c. S-layer proteins in gram- negative bacteria. B) Schematic representation of regular arrays s-layer proteins.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایشات

با بررسی منابع مختلف و بررسی روش‌های مختلف تخلیص لایه HPI، سه فاکتور شامل غلظت SDS، زمان انکوباسیون باکتری‌ها در مواد شوینده و درصد جرم باکتری در مواد شوینده انتخاب شد. طراحی آزمایش‌ها با CCD توسط Design-Expert 7.0.0 انجام شد. جدول ۱ فهرست آزمایش‌ها را در پنج سطح نشان می‌دهد.

تهیه بانک سلولی

سویه *D.radiodurans* گونه R1 از مرکز ملی منابع زیستی و ژنتیکی ایران (IBRC) (شماره سویه: IBRC-M 10806) تهیه شد و بانک سلولی مطابق با پروتکلی که در منابع مربوطه (Abdolirad et al., 2016) توضیح داده شده است تهیه شد.

کشت باکتری‌ها

ابتدا ۸ R1 *D.radiodurans* منجمد در محیط ۸ لیتری TGY (تریپتون، ۰/۵درصد گلوکز، ۰/۵درصد عصاره مخمر، ۰/۵درصد NaCl) تلقیح شد، سپس محیط‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت یک شب در ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شدند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

جمع آوری و جداسازی باکتری‌ها

پس از یک شب، چگالی نوری محیط برابر با ۰/۷۵در طول موج ۶۰۰ نانومتر بود. محیط کشت هشت لیتری به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ ۷۰۰۰g قرار گرفت. رسوب دو بار با آب دیونیزه شسته شد و هر بار مجدداً با ۷۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. وزن مرطوب مایع رویی به‌دست آمده ۱۶/۳۱گرم بود که به قطعات ۰/۶گرم تقسیم شد و ۲۰ عدد از آن برای ۲۰ دوره طراحی آزمایش استفاده شد.

خالص سازی پروتئین‌های لایه S

ابتدا برای هر ۲۰ قسمت تحت شرایط خاص که در جدول ۱ آمده است، سوسپانسیون تهیه شد. سوسپانسیون‌ها در ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی جدا شده حاوی پروتئین به آرامی از رسوبات جدا شد و رسوبات دور ریخته شد. سوپرناتانت در ۲۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت و رسوبات دور ریخته شده در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه شسته شدند. مجدداً سوسپانسیون‌ها در ۲۰۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت دور ریخته شد. رسوبات مجدداً در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه معلق شدند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای سنجش‌های مربوطه نگهداری شدند.

آنالیز SDS-PAGE

برای بررسی خلوص پروتئین سطحی جدا شده، آنالیز SDS-PAGE با سیستم الکتروفورز شرکت BIO-RAD ساخت کشور ایالات متحده آمریکا انجام شد. به این منظور به هر یک از نمونه-های پروتئین لایه سطحی جدا شده ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه اضافه شد (برای شرایط یکسان‌سازی در آزمایش‌ها، مقدار بافر نمونه تغییر می‌کند) و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه جوشانده شد، سپس نمونه‌ها در چاهک‌های ژل اکریل آمید-بیس اکریل آمید ۱۲/۵ درصد بارگذاری شدند. ولتاژ دستگاه الکتروفورز بر روی ۱۱۵ ولت تنظیم شد، بعد از گذشت ۴ ساعت ژل‌ها با کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شده و با محلول رنگ‌بری، رنگ‌بری شد و باندهای پروتئینی مشاهده و بررسی شدند (Farci et al., 2015).

اندازه‌گیری غلظت پروتئین لایه سطحی HPI جداشده با روش برادفورد

برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. به این منظور ابتدا معرف برادفورد از رنگ کوماسی برلیانت بلو G250 تهیه شد. سپس برای رسم منحنی استاندارد غلظت‌های ۰/۰۶، ۰/۱۲، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پروتئین استاندارد آلبومین گاوی (BSA) تهیه شد و ۲۰ µL از عصاره پروتئینی به ۱ mL از محلول برادفورد اضافه شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. نمودار جذب نسبت به غلظت رسم شد و جذب پروتئین HPI همانند مرحله قبل به دست آمده و غلظت آن با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد.

سنجش‌ها

اهداف این پروژه بهینه سازی جداسازی پروتئین‌های لایه S با خلوص و غلظت بالا است. برای اندازه گیری درصد خلوص و غلظت به ترتیب از آزمون‌های SDS-PAGE و برادفورد استفاده شد.

نتایج

سنجش SDS-PAGE

پس از جداسازی پروتئین‌ها در شرایط خاص در طراحی آزمایش‌ها، SDS-PAGE انجام شد. الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های لایه S مطابق با مطالعات قبلی است (Abdolirad et al., 2016; Baumeister W Fau - Karrenberg et al.; Rachel et al., 1983). علت تفاوت ضخامت باندها با مطالعات قبلی، وزن باکتری‌های جرمی است که برای هر اجرا استفاده می‌شود. وزن مولکولی باندها ۱۰۰، ۹۱، ۸۴، ۶۵، ۵۳ و ۱۴ کیلو دالتون است (شکل ۲). پس از آزمون SDS-PAGE، تصویر ژل با نرم افزار ImageJ آنالیز و درصد خلوص آن تعیین شد. نتایج خالص سازی پروتئین با شرایط هر اجرا در جدول ۲ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج، درصد خلوص در شرایط مختلف آزمایشی از ۱۷/۰۴ درصد تا ۵۱/۴۳ درصد متغیر است. برای یافتن بهترین مدل، این نتایج توسط نرم افزار متخصص طراحی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از بررسی و ارزیابی عدم تناسب در مدل‌های مختلف، نرم افزار یک مدل درجه دوم پیشنهاد شد. (مدل درجه دوم در جدول ۳ ANOVAنتایج تحلیل واریانس (F-Value برابر با ۰/۰۰۱۳ و P-Valueنشان داده شده است. برابر با ۷/۶۱ نشان می‌دهد که مدل به ترتیب معنی‌دار و ضروری)، دو عبارت درجه A, Bاست. این مدل شامل دو عبارت خطی (AB^2 و A^2B, A^2C) و سایر اصطلاحات از جمله A^2, B^2دوم (است. معادله این مدل برای درصد خلوص در زیر ارائه شده است:

$$= +41.44 - 2.32\ (A) + 6.95\ (B) - 6.73\ (A^2) - 2.16\ (B^2) - 4.91\ (A^2.B) + 3.53\ (A^2.C) + 10.81(A.B^2)$$

سایر پارامترهای آماری عبارتند از:

R-Squared = 0.0.8162، Adj R-Squared= 0.7089، Pred R-Squared= -1.6138 و Adeq precision= 7.967.

نمودارهای تشخیصی برای این مدل در شکل ۳A نشان داده شده

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

است. تمام نمودارها دقت مدل را تایید می کنند. مطابق جدول ۳ پارامترهای غلظت و زمان بیشترین تأثیر را دارند و درصد جرمی کمترین اثر را در درصد خلوص دارند. به همین دلیل فقط تعامل بین تمرکز و زمان قابل توجه است که در شکل ۳B ارائه شده است.

سنجش برادفورد

برای تعیین غلظت پروتئین‌های لایه S جدا شده، آزمون برادفورد برای ۲۰ اجرا انجام شد. جدول ۴ نتایج این سنجش را نشان می‌دهد. با توجه به این نتایج، حداکثر و حداقل غلظت پروتئین لایه S در شرایط مختلف آزمایشی به ترتیب mg/ml ۰/۰۱ و mg/ml ۰/۶۳ است. برای یافتن بهترین مدل، این نتایج توسط نرم افزار متخصص طراحی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از بررسی عدم تناسب در مدل های مختلف، نرم افزار مدل درجه دوم پیشنهاد شد. نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم در جدول ۵ نشان داده شده است. P-Value برابر ۰/۰۰۰۱ و F-Value برابر ۱۲/۸۲ به ترتیب نشان می‌دهد که مدل دارای اهمیت است. این مدل شامل سه عبارت خطی (A, B, ABC)، سه عبارت درجه دوم (A^2, B^2, C^2) و سایر اصطلاحات از جمله A^2B و AB^2 است. معادله این مدل برای درصد خلوص در زیر ارائه شده است:

غلظت پروتئین= $+0.53 - 0.096\ (A) + 0.12\ (B) - 0.13\ (A^2) - 0.075\ (B^2) - 0.082\ (C^2) - 0.061\ (A.B.C) - 0.18\ (A^2.B) + 0.20\ (A.B^2)$

سایر پارامترهای آماری عبارتند از:

R-Squared = 0.0.9031، Adj R-Squared= 0.8327، Pred R-Squared= 0.7164 و Adeq precision= 9.949.

نمودارهای تشخیصی برای این مدل در شکل ۴A نشان داده شده است. تمام نمودارها دقت مدل را تایید می کنند. مطابق جدول ۵، پارامترهای غلظت و زمان بیشترین تأثیر و درصد جرمی کمترین تأثیر را در غلظت پروتئین لایه S دارند. به همین دلیل، فقط تعامل بین تمرکز و زمان قابل توجه است که در شکل ۴B ارائه شده است.

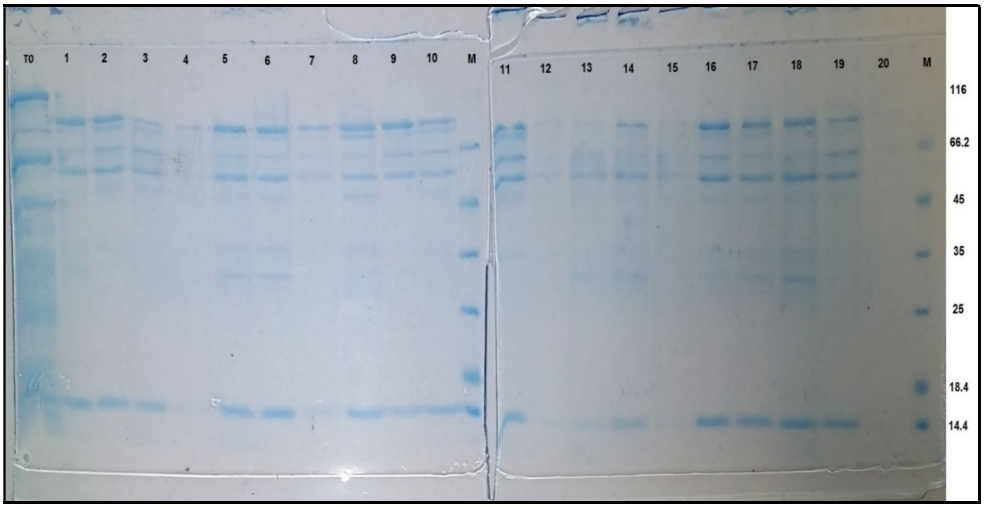
جدول ۱- آزمایش های طراحی شده با CCD در روش های RSM.

Table 1. Experiments Designed with CCD in RSM methods.

RUN	SDS CONCENTRATION (%)	TIME (HOUR)	MASS PERCENT (%)
1	5	2	7.5
2	5	2	3.3
3	7.5	1	10
4	2.5	3	10
5	5	2	7.5
6	5	2	7.5
7	2.5	3	5
8	0.8	2	7.5
9	5	0.32	7.5
10	7.5	1	5
11	7.5	3	10
12	9.2	2	7.5
13	5	2	7.5
14	5	2	7.5
15	2.5	1	10
16	5	3.68	7.5
17	5	2	11.7
18	5	2	7.5
19	5	0.32	7.5
20	2.5	1	5

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های لایه سطحی *D.radiodurans* R1. اعداد ۱-۲۰ تعداد اجراها در طراحی آزمایش‌ها هستند.T0: الگوی پلی پپتیدی *D.radiodurans* R1 M = مارکر.

Figure 2. The electrophpretic pattern of S-layer proteins D.radiodurans R1. The numbers of 1-20 are numbers of runs in design of experiments.T0. polypeptides pattern of D.radiodurans R1. M. marker

جدول ۲- نتایج درصد خلوص در شرایط مختلف.

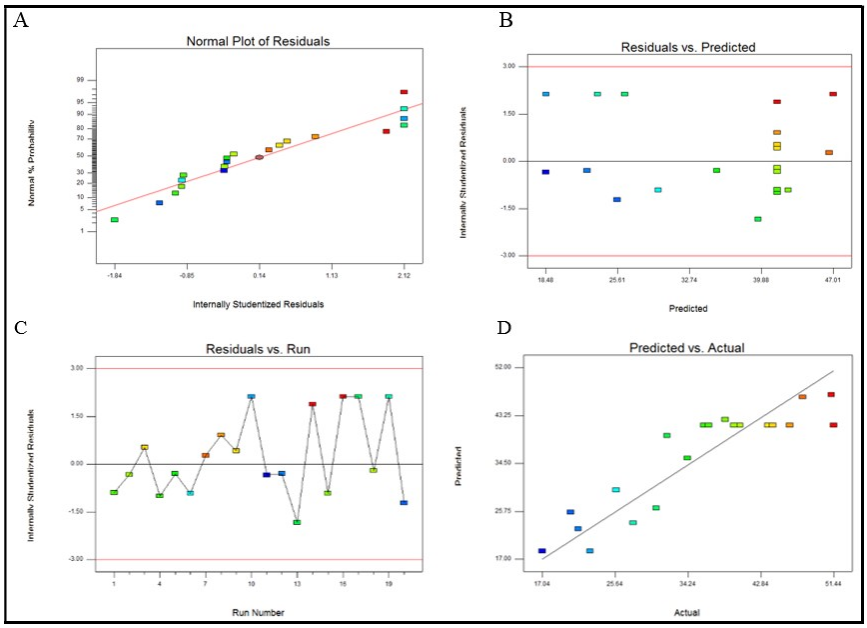
Table 2. Results of purity percent under different conditions.

RUN	SDS CONCENTRATION (%)	TIME (HOUR)	MASS PERCENT (%)	PURITY PERCENT (%)
1	5	2	7.5	36.68
2	5	2	3.3	46.26
3	7.5	1	10	38.63
4	2.5	3	10	25.75
5	5	2	7.5	39.67
6	5	2	7.5	44.22
7	2.5	3	5	21.28
8	0.8	2	7.5	30.47
9	5	0.32	7.5	27.79
10	7.5	1	5	34.17
11	7.5	3	10	47.77
12	9.2	2	7.5	22.66
13	5	2	7.5	36.10
14	5	2	7.5	51.43
15	2.5	1	10	20.38
16	5	3.68	7.5	51.16
17	5	2	11.7	43.65
18	5	2	7.5	40.35
19	5	0.32	7.5	31.76
20	2.5	1	5	17.04

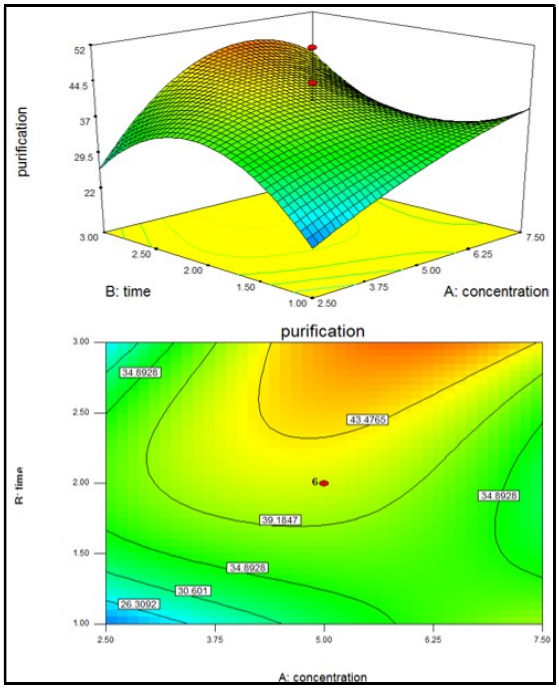
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

a)



b)



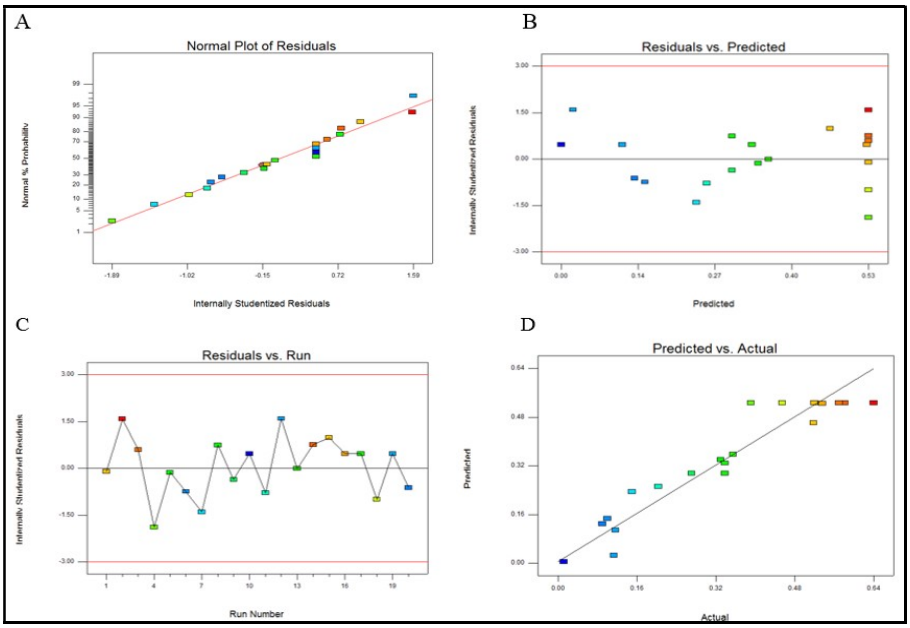
شکل ۳- a) نمودارهای تشخیصی برای دقت مدل ها. A. نمودارهای معمولی. B. باقی مانده در مقابل پیش بینی شده. C. باقیمانده ها در مقابل اجرا. D. پیش بینی شده در مقابل واقعی. توجه داشته باشید. نقاط رنگی در نمودار A باید نزدیک به خط قرمز باشند. در نمودارهای B و C باید بین دو خط قرمز باشد. در نمودار D به شناسایی یک مقدار یا گروهی از مقادیر کمک می‌کند که به راحتی توسط مدل پیش بینی نمی‌شوند. b) تعامل بین دو عامل تمرکز و زمان. بالا نمودار سطح سه بعدی پایین. نمودار کانتور. توجه داشته باشید. ناحیه قرمز و آبی در هر دو نمودار به ترتیب بیشترین و کمترین درصد خلوص را نشان می دهند.

Figure 3. a) Diagnostic diagrams for accuracy of models. A. Normal plots. B. Residual vs. Predicted. C. Residuals vs. Run. D. Predicted vs. Actual. Note. Color dots in diagram A should in near red line; in diagrams B and C must be between two red line; in diagram D helps to detect a value, or group of values, that are not easily predicted by the model. b) Interaction between two factors of concentration and time. Up. 3D surface diagram. Down. Contour diagram. Note. Red and blue region in both of the two diagrams indicates to most and lowest purity percent, respectively.

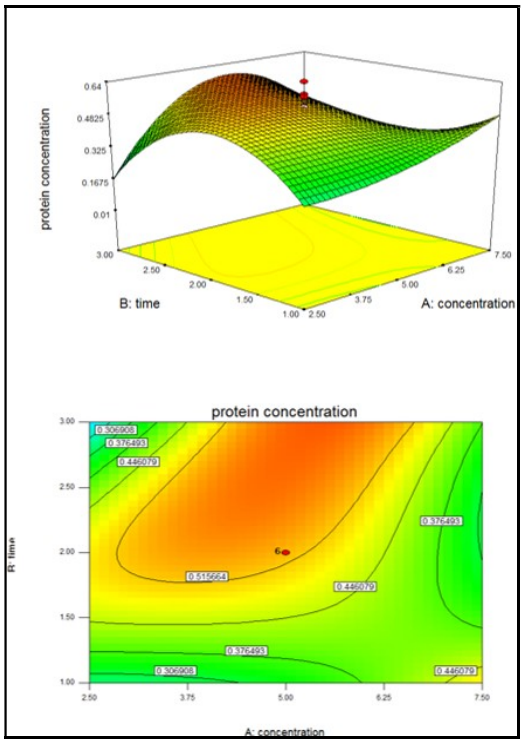
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

a)



b)



شکل ۴– a) نمودارهای تشخیصی برای دقت مدل ها. A. نمودارهای معمولی. B. باقی مانده در مقابل پیش بینی شده. C. باقیمانده ها در مقابل اجرا. D. پیش بینی شده در مقابل واقعی. توجه داشته باشید. نقاط رنگی در نمودار A باید نزدیک به خط قرمز باشند. در نمودارهای B و C باید بین دو خط قرمز باشد. در نمودار D به شناسایی یک مقدار یا گروهی از مقادیر کمک می‌کند که به راحتی توسط مدل پیش بینی نمی‌شوند. b) تعامل بین دو عامل تمرکز و زمان. بالا نمودار سطح سه بعدی پایین. نمودار کانتور. توجه داشته باشید. ناحیه قرمز و آبی در هر دو نمودار به ترتیب بیشترین و کمترین غلظت پروتئین لایه S را نشان می‌دهد.

Figure 4. a) Diagnostic diagrams for accuracy of models. A. Normal plots. B. Residual vs. Predicted. C. Residuals vs. Run. D. Predicted vs. Actual. Note. Color dots in diagram A should in near red line; in diagrams B and C must be between two red line; in diagram D helps to detect a value, or group of values, that are not easily predicted by the model. b) Interaction between two factors of concentration and time. Up. 3D surface diagram. Down. Contour diagram. Note. Red and blue region in both of the two diagrams indicates the most and lowest S-layer protein concentration, respectively.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

جدول ۳- نتایج ANOVA مدل درجه دوم برای درصد خلوص پروتئین لایه S.

Table 3. The results of ANOVA of quadratic model for purity percent of S-layer protein.

SOURCE	SUM OF SQUARES	DF	MEAN SQUARE	F-VALUE	P-VALUE	
MODEL	1707.33	7	243.90	7.61	0.0013	Significant
A- CONCENTRATION	30.53	1	30.50	0.95	0.3486	
B- TIME	273.29	1	273.29	8.53	0.0128	
A^2	658.67	1	658.67	20.55	0.0007	
B^2	68.16	1	68.16	2.13	0.1704	
A^2B	79.78	1	79.78	2.49	0.1406	
AB^2	387.00	1	0.387	12.08	0.0046	
RESIDUAL	384.58	12	32.05			
LACK OF FIT	221.58	7	31.65	0.97	0.5323	Not significant
PURE ERROR	163.00	5	32.60			

جدول ۴- نتایج غلظت لایه S جدا شده در شرایط مختلف.

Table 4. Results of isolated S-layer concentration under different conditions.

RUN	SDS CONCENTRATION (%)	TIME (HOUR)	MASS PERCENT (%)	CONCENTRATION (MG/ML)
1	5	2	7.5	0.52
2	5	2	3.3	0.21
3	7.5	1	10	0.51
4	2.5	3	10	0.10
5	5	2	7.5	0.63
6	5	2	7.5	0.56
7	2.5	3	5	0.11
8	0.8	2	7.5	0.34
9	5	0.32	7.5	0.11
10	7.5	1	5	0.33
11	7.5	3	10	0.15
12	9.2	2	7.5	0.01
13	5	2	7.5	0.39
14	5	2	7.5	0.58
15	2.5	1	10	0.09
16	5	3.68	7.5	0.53
17	5	2	11.7	0.27
18	5	2	7.5	0.45
19	5	0.32	7.5	0.35
20	2.5	1	5	0.20

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

جدول ۵- نتایج ANOVA مدل درجه دوم برای غلظت پروتئین لایه S پروتئین لایه S.

Table 5. The results of ANOVA of quadratic model for S-layer protein concentration of S-layer protein.

SUM OF SQUARES	SOURCE		P-VALUE	F-VALUE	MEAN SQUARE	DF	SUM OF SQUARES	SOURCE
0.63	MODEL	Significant	0.0001	12.82	0.079	8	0.63	MODEL
0.053	CONCENTRATION		0.0137	8.58	0.053	1	0.053	CONCENTRATION
0.087	TIME		00.32	14.13	0.087	1	0.087	TIME
0.23	A^2		<0.0001	38.18	0.23	1	0.23	A^2
0.080	B^2		0.0041	13.08	0.080	1	0.080	B^2
0.097	C^2		0.0022	15.80	0.097	1	0.097	C^2
0.030	ABC		0.0492	4.88	0.030	1	0.030	ABC
0.10	A^2B		0.0018	16.77	0.10	1	0.10	A^2B
0.13	AB^2		0.0007	21.92	0.13	1	0.13	AB^2
0.067	RESIDUAL				6.132E-003	11	0.067	RESIDUAL
0.027	LACK OF FIT	Not significant	0.7587	0.55	4.452E-003	6	0.027	LACK OF FIT
0.041	PURE ERROR				8.148E-003	5	0.041	PURE ERROR

جدول ۶- شرایط بهینه سازی برای متغیرها و اهمیت آن در پاسخ به غلظت و درصد خلوص پروتئین های لایه S.

Table 6. Optimization conditions for variables and its importance in response to concentration and purity percent S-layer proteins

PARAMETER	GOAL	LOWER LIMIT	UPPER LIMIT	IMPORTANCE
SDS CONCENTRATION	is in range	2.5%	7.5%	+++
TIME	is in range	1h	3h	+++
MASS PERCENT	IS IN RANGE	5	10	+++

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه شناسایی، استخراج و استفاده از ساختارهای منظم و قابل تکرار در مقیاس نانو در بین نانوبیوتکنولوژیست‌ها رایج است. یکی از این ساختارها که کاندیدای مناسب برای ساخت نانوذرات است، پروتئین لایه S به نام HPI است که روی *D.radiodurans* R1 قرار دارد. از این رو، در این مطالعه، بهینه سازی خالص سازی پروتئین لایه S در مدل مطلوبی به دست آمد. برای ارائه این مدل، سه عامل شامل غلظت SDS، زمان و درصد جرمی در پنج سطح انتخاب شد. با استفاده از نرم افزار Design-Expert به روش سطح پاسخ و طراحی مرکب مرکزی، ۲۰ آزمایش تعیین شد. پس از انجام ۲۰ آزمایش در شرایط مختلف، نتایج توسط نرم افزار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل جداول واریانس، و نمودارهای تشخیصی کفایت آماری مدل را تایید می‌کند. از آنجایی که هنوز مدلی برای پیش‌بینی غلظت و درصد خلوص پروتئین لایه S جدا شده از *D. radiodurans* ارائه نشده است، می‌توان ادعا کرد که این کمبود در این مطالعه برطرف شده و سعی گردید مدلی با قابلیت اطمینان بالا گزارش شود.

تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که از بین فاکتورهای انتخاب شده، ضریب غلظت SDS بیشترین تأثیر را بر هر دو واکنش و درصد جرمی باکتری موجود در ماده شوینده ناچیزترین اثر را دارد. در مطالعات قبلی اثر فاکتورهای مختلف در محیط کشت بر میزان تولید پروتئین لایه سطحی باکتری بررسی شده بود (Ebadi Sharaf Abad et al., 2017). در آن‌جا نشان داده شد که با تغییر اجزای محیط کشت می‌توان به میزان ۲ برابر پروتئین لایه سطحی بیشتری تولید کرد. اما بحث فاکتورهای مختلف بر روش خالص‌سازی هم مطرح است که در این مطالعه انجام شده است. با توجه به این‌که SDS خاصیت شویندگی دارد می‌تواند غشای موجود را در خود حل کند و به تخلیص پروتئین کمک کند از طرفی غلظت زیاد SDS باعث دناتوره شده پروتئین‌ها

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

می‌شود (Bhuyan, 2010) که در این مطالعه غلظت بهینه SDS به دست آمد. از طرفی درصد جرمی باکتری کمترین تاثیر را دارد که البته شاید به خاطر انتخاب بازه کم بوده و اگر شاید بازه بیشتری انتخاب می‌شد اثر بیشتری داشت. در مقایسه با سایر مطالعات، واضح است که عوامل دیگر تأثیری بر پروتئین‌های لایه S از *D. radiodurans* ندارند (Abdolirad et al., 2016; Baumeister W Fau - Karrenberg et al., 1982; Mark et al., 2006; Müller et al., 1996; Rachel et al., 1983; Rothfuss et al., 2006).

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات خانم دکتر مریم عبدلی راد در کل فرایند انجام این تحقیق، تشکر می نماییم.

REFERENCES

Abdolirad, M., Khalilzadeh R. & Alijanianzadeh, M. 2016. Isolation and study of s-layer nanostructure of *Deinococcus radiodurans* R1. Biomacromolecular Journal 2: 126-134.

Abdolirad, M., khalilzadeh, R. & Alijanianzadeh, M. 2019. Self-assembly of gold nanoparticles using HPI s-layer proteins biotemplate. Biomacromolecular Journal 5: 152-160.

Baumeister W Fau - Karrenberg, F., Karrenberg F Fau - Rachel, R., Rachel R Fau - Engel, A., Engel A Fau - ten Heggeler, B., ten Heggeler B Fau - Saxton, W.O. & Saxton, W.O. 1982. The major cell envelope protein of *Micrococcus radiodurans* (R1). Structural and chemical characterization. European Journal of Biochemistry 125: 535-544.

Bharat, T.A.M., von Kügelgen, A. & Alva, V. 2021. Molecular logic of prokaryotic surface layer structures. Trends in Microbiology 29: 405-415.

Bhuyan, A.K. 2010. On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. Biopolymers 93: 186-199.

Cui, H.-F., Ye, J.-S., Leitmannova Liu, A., & Ti Tien, H. 2006. Chapter 1: Lipid Microvesicles: On the Four Decades of Liposome Research. In A. L. Liu (Ed.), Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes (Vol. 4, pp. 1-48). Academic Press.

Ebadi Sharaf Abad, B., Khalilzadeh, R., Alijanianzadeh, M., & Abdolirad, M. 2017. Investigation of effective factors on the optimization of surface layer protein production in the *Deinococcus radiodurans* R1 strain using response surface method. Iranian Jouornal of Medical Microbiology 11: 59-70.

Fagan, R. P., & Fairweather, N. F. 2014. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. Nature Reviews Microbiology 12: 211-222 .

Farci, D., Aksoyoglu, M.A., Farci, S.F., Bafna, J.A., Bodrenko, I., Ceccarelli, M. & Piano, D. 2020. Structural insights into the main S-layer unit of *Deinococcus radiodurans* reveal a massive protein complex with porin-like features. J Biol Chem 295: 4224-4236.

Farci, D., Bowler, M.W., Esposito, F., McSweeney, S., Tramontano, E. & Piano, D. 2015. Purification and characterization of (DR_2577) (SlpA) a major S-layer protein from *Deinococcus radiodurans*. Frontiers in Microbiology 6: 414-419.

Farci, D., Slavov, C., Tramontano, E. & Piano, D. 2016. The S-layer Protein DR_2577 Binds Deinoxanthin and under Desiccation Conditions Protects against UV-Radiation in *Deinococcus radiodurans*. Frontiers in Microbiology 7: 155-163.

Habibi, N., Caneva Soumetz, F., Giulianelli, M., Pastorino, L., Herrera, O., Sbrana, F. & Ruggiero, C. 2010. Self-assembly and recrystallization of bacterial S-layer proteins of Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis on silicone, mica and quartz crystal supports. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc 37: 3742-3749.

Herrmann, J., Li, P.-N., Jabbarpour, F., Chan, A.C., Rajkovic, I., Matsui, T. & Murphy, M. E. 2020. A bacterial surface layer protein exploits multistep crystallization for rapid self-assembly .Proceedings of the National Academy of Sciences 117: 388-394 .

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]

Hollmann, L.D. & Miyoshi, A. 2010. S-layer proteins from lactobacilli as vaccine delivery systems. International Journal of Microbiology Research 2: 30-43.

Klotz, C., Goh, Y.J., O'Flaherty, S. & Barrangou, R. 2020. S-layer associated proteins contribute to the adhesive and immunomodulatory properties of Lacto bacillus acidophilus NCFM. BMC Microbiology 20: 248-253.

Li, F., Wang, D., Zhou, J., Men, D. & Zhan, X.E. 2020. Design and biosynthesis of functional protein nanostructures. Science China Life Sciences 63: 1142-1158.

Madhurantakam, C., Howorka, S. & Remaut, H. 2014. S-layer Structure in Bacteria and Archaea. In L.L. Barton, D.A. Bazylinski, & H. Xu (Eds.), Nanomicrobiology: Physiological and Environmental Characteristics (pp. 11-37). Springer New York.

Mark, S.S., Bergkvist M Fau - Yang, X., Yang X Fau - Teixeira, L.M., Teixeira Lm Fau - Bhatnagar, P., Bhatnagar P Fau - Angert, E.R., Angert Er Fau Batt, C.A. & Batt, C.A. 2006. Bionanofabrication of metallic and semiconductor nanoparticle arrays using S-layer protein lattices with different lateral spacings and geometries. Langmuir 22: 3763-3774.

Misra, C.S., Basu, B. & Apte, S.K. 2015. Surface (S)-layer proteins of *Deinococcus radiodurans* and their utility as vehicles for surface localization of functional proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1848: 3181-3187

Müller, D.J., Baumeister W Fau - Engel, A. & Engel, A. 1996. Conformational change of the hexagonally packed intermediate layer of *Deinococcus radiodurans* monitored by atomic force microscopy. Journal of Bacteriology 178: 3025-3030.

Pum, D., Breitwieser, A. & Sleytr, U.B. 2021. Patterns in Nature S-Layer Lattices of Bacterial and Archaeal Cells. Crystals 11: 869-874.

Pum, D., Messner, P. & Sleytr ,U.B. 1991. Role of the S layer in morphogenesis and cell division of the archaebacterium Methanocorpusculum sinense. Journal of bacteriology 173: 6865-6873.

Pum, D., Toca-Herrera, J.L. & Sleytr, U.B. 2013. S-layer protein self-assembly. International Journal of Molecular Sciences 14: 2484-2501.

Rachel, R., Engel, A. & Baumeister, W. 1983. Proteolysis of the major cell envelope protein of *Deinococcus radiodurans* remains morphologically latent. FEMS Microbiology Letters 17: 115-119.

Rothfuss, H., Lara, J.C., Schmid, A.K. & Lidstrom, M.E. 2006. Involvement of the S-layer proteins Hpi and SlpA in the maintenance of cell envelope integrity in *Deinococcus radiodurans* R1. Microbiology (Reading) 152: 2779-2787.

Sára, M. & Sleytr, U.B. 1987. Molecular sieving through S layers of Bacillus stearothermophilus strains. Journal of Bacteriology 169: 4098-4102.

Schuster, B. 2018. S-Layer Protein-Based Biosensors. Biosensors 82: 40-47.

Schuster, B. & Sleytr, U.B. 2013. Nanotechnology with S-Layer Proteins. In J .A. Gerrard (Ed.), Protein Nanotechnology: Protocols, Instrumentation, and Applications, Second Edition (pp. 153-175). Humana Press.

Schuster, B. & Sleytr, U.B. 2014. Biomimetic interfaces based on S-layer proteins, lipid membranes and functional biomolecules. Journal of the Royal Society, Interface 11: 20140232-20140232.

Shukla, S.K., Manobala, T. & Rao, T.S. 2022. The role of S-layer protein (SlpA) in biofilm-formation of Deinococcus. Journal of Applied Microbiology 133: 796-807.

Simonin, P., Lombard, C., Huguet, A. & Kish, A. 2020. Improved Isolation of SlaA and SlaB S-layer proteins in Sulfolobus acidocaldarius. Extremophiles 24: 673-680.

Sleytr, U.B. & Beveridge, T.J. 1999. Bacterial S-layers. Trends in Microbiology 7: 253-260.

*****

How to cite this article:

Alijanianzadeh, M., Jalalvand, A., Khalilzadeh, R. & Abdolirad, M. 2023. Optimization of S-layer protein purification from *Deinococcus radiodurans* strain R1. Nova Biologica Reperta 9: 267-278. (In Persian).

علی‌جانیان‌زاده، م. جلالوند، ع.، خلیل‌زاده، ر. و عبدلی‌راد، م. ۱۴۰۱. بهینه سازی تخلیص پروتئین لایه S از سویه R1 *Deinococcus radiodurans*. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۲۷۸-۲۶۷.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.4.3.5]