

Sequencing, cloning and expression of DnaK chaperone from *Bacillus halodurans* Guj1

Vahdani F.¹ MSc, Ghafoori H.*¹ PhD, Sarikhan S.² MSc

¹Biology Department, Science Faculty, University of Guilan, Rasht, Iran

²Molecular Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

Abstract

Hsp70 family members are central components of the cellular network of molecular chaperones and folding catalysts. The gene encoding a protein related to Hsp70 or DnaK in the domain bacteria is called *dnaK*. DnaK proteins are involved in de novo protein folding, formation, and disassembly of protein complexes and degradation of misfolded proteins. The gene *dnaJ* which codes for Hsp40 in bacteria, modulate the activities of DnaK by acting as co-chaperone. In the present study, we cloned and expressed DnaK from *Bacillus halodurans* Guj1 were identified. The *dnaK* gene of *B. halodurans* was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using pET-28a⁺ expression system. The open reading frame of the cloned gene contained 1839bp and encoded 612 amino acid residues. Calculated molecular weight and pI of the protein were 66.18kDa and 4.55 respectively. The deduced amino acid sequence of *B. halodurans* Guj1 showed about 60% identity with the *E. coli* counterpart. The 3D structure of *dnaK* from *B. halodurans* was constructed using the crystal structure of human HSP70 chaperone BiP as the template, which showed an identity of 88.8% together. Partially purified recombinant DnaK by heat treatment showed a band at approximately 70kDa on SDS-PAGE. Our findings showed that the recombinant DnaK improved the refolding efficiency of the carbonic anhydrase by 27% after 60min at 54°C. According to the results obtained, DnaK from *B. halodurans* can potentially be used for improving the functional properties of enzymes and proteins in various applications.

Keywords

Bacillus halodurans [Not in MeSH]

DnaK [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=DnaK>];

Cloning [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019976>];

Chaperone activity [Not in MeSH]

* Corresponding Author

Tel: +98 (13) 33333647

Fax: +98 (13) 33333647

Post Address: Biology Department, Sciences Faculty, University of Guilan, Namjoo Street, Rasht, Iran.

Postal Code: 4193833697

h.ghafoori@guilan.ac.ir

Received: August 12, 2017

Accepted: November 14, 2017

ePublished: June 20, 2019

تعیین توالی، کلونینگ و بیان چپرون DnaK از باکتری باسیلوس هالودورانس سویه Guj1

فاطمه وحدانی MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

حسین غفوری PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

سجاد صاری‌خان MSc

مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

اعضای خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی ۷۰ (Hsp70) از اجزای مرکزی شبکه سلولی چپرون‌های مولکولی و کاتالیزکننده‌های تاخوردگی هستند. ژن کدکننده یک پروتئین مربوط به Hsp70 یا DnaK در حوزه باکتری‌ها *dnaK* نامیده می‌شود. پروتئین‌های DnaK در تاخوردگی از نو پروتئین، تشکیل و تفکیک کمپلکس‌های پروتئینی و تخریب پروتئین‌های پد تاخوردگی دخیل هستند. ژن *dnaJ* که کدکننده Hsp40 در باکتری‌ها است، با نقش کوچکی در تنظیم‌کننده فعالیت‌های DnaK است. در این مطالعه، *DnaK* از باکتری باسیلوس هالودورانس *Bacillus halodurans* Guj1 را شناسایی، کلون و بیان شد. ژن *dnaK* از باسیلوس هالودورانس Guj1، با استفاده از سیستم بیانی pET-28a+ به‌طور موفقیت‌آمیز در *Escherichia coli* سویه BL21 (DE3) بیان شد. قالب صحیح خوانش ژن کلون شده، دارای ۱۸۳۹ جفت‌باز بوده که کدکننده ۶۱۲ باقی‌مانده آمینواسیدی است. وزن مولکولی و pI محاسبه‌شده پروتئین به ترتیب ۶۶/۱۸ کیلو دالتون و ۴/۵۵ است. توالی آمینواسیدی به‌دست‌آمده باسیلوس هالودورانس Guj1 حدود ۶۰٪ با همتای خود در *E. coli* یکسانی دارد. ساختار سه‌بعدی DnaK در باسیلوس هالودورانس با الگو قراردادن ساختار کریستالی Bip (عضوی از خانواده HSP70 در انسان) ساخته شد، که نشان‌دهنده یکسانی ۸۸/۸٪ با هم است. DnaK نوترکیب که توسط تیمار حرارتی به‌طور جزئی خالص شد، در SDS-PAGE یک باند تقریباً ۷۰ کیلو دالتونی دارد. یافته‌های ما نشان داد که DnaK نوترکیب، بهبوددهنده کارایی ۲۷٪ دوباره تاخوردگی کربونیک‌انهدراز بعد از قرارگیری در ۵۴°C به مدت یک ساعت است. بنابر نتایج به‌دست‌آمده، DnaK از باسیلوس هالودورانس به‌طور ذاتی می‌تواند به‌منظور بهبود ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، در کاربردهای مختلف استفاده شود.

کلیدواژه‌ها: *Bacillus halodurans*، DnaK، کلونینگ، فعالیت چپرونی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

مقدمه

پروتئین‌ها در همه فرآیندهای زیستی حضور دارند و برای کسب شکل عملکردی خود، باید به‌صورت ساختار سه‌بعدی طبیعی منحصربه‌فردی درآیند [1, 2]. این ماکرومولکول‌ها در محیط شلوع سلولی و تحت وضعیت‌های استرس فیزیولوژیکی و محیطی مثل گرما، استرس اکسیداتیو و تورم در معرض شکل‌گیری میانکس‌های غیرطبیعی قرار گرفته که می‌توانند پروتئین‌های بد شکل و تجمعی را ایجاد کنند. اگر تاخوردگی پروتئین‌ها دچار نقص شود نتیجه آن تولید پروتئین‌هایی بوده که روی هم انباشته شده و منجر به اختلال در کار سلول می‌شود. سلول‌ها با داشتن شبکه کنترل کیفیت پروتئین‌ها در تعادل پروتئین تاخوردگی، پد تاخوردگی، تجمع‌یافته و تخریب آنها نقش‌داشته و در نهایت هومئوستاز پروتئین (پروتئوستاسیس) و عملکرد پروتئوم را حفظ می‌کنند [1]. چپرون‌های مولکولی، پروتئین‌هایی هستند که با یکدیگر منجر به پایداری یا کمک به سایر پروتئین‌ها در کسب فرم طبیعی و عملکردی خود می‌شوند، بدون اینکه در ساختار نهایی آنها حضور

داشته باشند. پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) غالب اعضای خانواده چپرون‌های مولکولی را تشکیل می‌دهند. عموماً چپرون‌ها براساس وزن مولکولی‌شان طبقه‌بندی شده که از جمله آنها HSP100، HSP90، HSP70، HSP60، HSP40، HSP و HSP‌های کوچک هستند. HSP‌ها دارای نقش‌های بسیاری در حفظ پروتئوم بوده که شامل تاخوردن از نو (*de novo*)، تاخوردگی مجدد پروتئین‌های دناتوره شده تحت استرس، تجمع اولیگومری، عبور و مرور پروتئین‌ها و کمک در تخریب پروتئولیتیک است [4].

ژن *dnaK* موجود در *Escherichia coli* (تولیدکننده آنالوگ پروکاریوتی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتونی (Hsp70)) یوکاریوتی است که در انواع فعالیت‌های سلولی مختلف از جمله زنده‌ماندن باکتری تحت شرایط استرسی مختلف، شروع همانندسازی باکتریوفاژ λ و DNA وابسته به ori-C در *E. coli*، تنظیم تقسیم سلولی، تعدیل پروتئولیز، تاخوردگی پروتئین و جلوگیری از تجمعات پروتئینی شرکت می‌کند [5-7]. پروتئین DnaK مانند سایر Hsp70‌ها از دو دومین اصلی تشکیل شده است [6]، یکی از آنها دومین ATPase ای در انتهای N (۴۵ کیلو دالتونی) و دیگری دومین متصل‌شونده به سوپسترا در انتهای C (۲۵ کیلو دالتونی) است [7, 1]. DnaK با پروتئین‌های شوک حرارتی DnaJ و GrpE همکاری دارد [6]. چپرون‌ها هم در پزشکی و هم در تولیدات بیوتکنولوژیک نیز حائز اهمیت بوده، از این رو ما به شناسایی، توالی‌یابی، کلونینگ و بیان پروتئین DnaK از باکتری باسیلوس هالودورانس (*B. halodurans*) سویه Guj1 پرداخته و به‌علاوه فعالیت آنزیم کربنیک‌انهدراز را در حضور DnaK خالص شده جزئی بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

باکتری، پلازمیدها، محیط کشت، کیت‌ها، آنزیم‌ها و مواد: در مطالعه تجربی حاضر باکتری *B. halodurans* سویه Guj1 از مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه و DNA ژنومی آن توسط کیت QIAamp DNA mini (کیازن؛ آلمان) خالص شد. وکتورهای مورد استفاده در این مطالعه وکتور pTZ57R/T (ترموفیشر؛ ایالات متحده آمریکا) و وکتور pET-28a+ (نوآژن؛ ایالات متحده آمریکا) و میزبان‌های باکتریایی *E. coli* سویه DH5 و *E. coli* سویه BL21 (DE3) هستند. محیط کشت LB (حاوی ۱٪ سدیم کلرید، ۱٪ تریپتون، ۰/۵٪ عصاره مخمر) و محیط کشت جامد LB آگار (حاوی ۱٪ سدیم کلرید، ۱٪ تریپتون، ۰/۵٪ عصاره مخمر و ۱/۵٪ آگار) مورد استفاده قرار گرفت، همچنین ترکیبات X-gal (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، ایزوپروپیل‌بتا-دی-۱-تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) (۱/۱ میلی‌مولار)، آمپی‌سیلین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در محیط کشت استفاده شد. مستر میکس PCR از شرکت تاکارا (RR330) برای انجام PCR و کیت Expin™ (GeneAll) برای استخراج از ژل به کار برده شد. T/A کلون توسط کیت K1214 (ترموفیشر؛ ایالات متحده آمریکا) و استخراج پلازمید توسط کیت iNTRON Biotechnology (کره) صورت گرفت. آنزیم‌های برشگر *BamH1* و *Xho1* (ترموفیشر؛ ایالات متحده آمریکا)، T4 لیگاز (ترموفیشر؛ ایالات متحده آمریکا)، لدر DNA (SMOBIO, DM3100) و مارکر پروتئین از شرکت سیناژن (PR901641) مورد استفاده قرار گرفت.

کلونینگ بود، تنها با این تفاوت که حجم یک میکرولیتر از تک کلونی رقیق شده در ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به عنوان DNA الگو استفاده شد. کلونی مثبت در محیط کشت LB حاوی کانامایسین کشت داده شد و در ۳۷°C به مدت ۱۴ ساعت با دور ۱۶۰rpm، رشد آن صورت پذیرفت. پلازمید آن استخراج و از این پلازمید PCR ای توسط پرایمرهای عمومی T7-promoter و T7-terminator، با شرایط PCR با پرایمرهای کلونینگ گذاشته و باند مورد نظر ملاحظه شد. در نهایت توالی یابی ژن موجود در این وکتور صورت پذیرفت. توالی ژن به دست آمده در پایگاه NCBI ثبت و توسط پایگاه داده های EXPASY و I-TASSER توالی آمینواسیدی پروتئین DnaK بررسی شد.

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *dnaK* از باکتری *B. halodurans*

| پرایمرها | توالی | دمای اتصال |
|----------------------|--|------------|
| پرایمر رفت | 5'-ATGAGTAAAATTATCGGTATTG-3' | ۵۲/۸°C |
| پرایمر برگشت | 5'-TTACTTGTCTTCTTTACTTCTTC-3' | ۵۶/۷°C |
| پرایمر رفت کلونینگ | GAGTCGGATCCATGAGTAAAATTATCGG 5'-TATT-3' | ۶۸/۷°C |
| پرایمر برگشت کلونینگ | GATTACTCGAGCTTGTCTTCTTTACTTC 5'-TTC-3' | ۶۸/۷°C |

بررسی بیان و تخلیص جزئی پروتئین: باکتری BL21 دارای وکتور بیانی pET-28a+ حامل ژن *dnaK*، در محیط کشت LB دارای کانامایسین، به صورت شبانه در ۳۷°C با دور ۱۶۰rpm قرار گرفت. بیان بهینه DnaK پس از رسیدن به OD_{600nm}=۰/۶، در محیط کشت حاوی ۰/۱ میلی مولار IPTG در دمای ۳۰°C به مدت ۲ و ۴ و ۶ ساعت صورت پذیرفت. پس از گرفتن رسوب از باکتری توسط سانتریفیوژ در دمای ۴°C با دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه، توسط بافری با pH=۸ که حاوی ۵۰ میلی مولار باز تریس، ۳۰۰ میلی مولار سدیم کلرید، ۲۰ میلی مولار ایمیدازول و یک میلی مولار PMSF است، مخلوط و توسط دستگاه سونی کیت لیز شد، سپس پروتئین های محلول باکتری با سانتریفیوژی در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۴°C، در محلول رویی باقی ماندند. رسوب باقی مانده از این سانتریفیوژ، توسط بافری مثل بافر قبل (تنها با این تفاوت که این بافر دارای اوره ۶ مولار است) به حالت سوسپانسیون درآمد و تحت سانتریفیوژی با دور ۹۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C قرار گرفت، مایع رویی حاصل از این سانتریفیوژ به عنوان پروتئین های رسوب باکتری روی SDS-PAGE ۱۲/۵% برده شد. به منظور تخلیص جزئی این پروتئین در فرم عملکردی، پروتئین های محلول باکتری تحت تیمار حرارتی در دمای ۷۰°C حدود ۴۰ دقیقه قرار گرفت، و سپس بعد از ۱۰ دقیقه قرارگیری در یخ، سانتریفیوژی با دور ۹۰۰۰rpm در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و محلول رویی آن به عنوان پروتئین جزئی خالص شده DnaK روی ژل SDS-PAGE ۱۲/۵% مورد مطالعه قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیم کربنیک انهدراز در حضور DnaK جزئی تخلیص شده: به این منظور ۲۰ میکرولیتر از آنزیم کربنیک انهدراز با غلظت ۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر به طور جداگانه در حضور ۲۰ میکرولیتر پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر، ۲۰ میکرولیتر DnaK خالص شده جزئی، ۲۰ میکرولیتر از پروتئین های محلول باکتری کنترل (BL21) بدون وکتور (pET-28a+) پس از تیمار حرارتی حدود ۴۰ دقیقه در دمای

کلونینگ ژن *dnaK* از باکتری *B. halodurans* سویه Guj1: DNA ژنومی از باکتری *B. halodurans* سویه Guj1 توسط کیت استخراج DNA، تخلیص شد. پرایمرها با استفاده از توالی ژن *dnaK* در باکتری های *B. halodurans* سویه FORC-005، *Bacillus sp.* MYBT18246 و CP009686.1 (به ترتیب دارای شماره دسترسی های CP016285.1 و CP015350.1) به کمک نرم افزار Gene Runner طراحی شدند (جدول ۱). به منظور تکثیر این ژن، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR، یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت به غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر و ۱/۴ میکرولیتر DNA ژنومی استفاده شد که در نهایت با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) دیز مورد استفاده قرار گرفت که شامل مرحله قبل از دناتوریشن در دمای ۹۴°C به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دناتوریشن در دمای ۹۴°C به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۷۲°C به مدت ۴۶/۵ ثانیه، مرحله طولیل شدن در دمای ۷۲°C به مدت ۸۰ ثانیه، ۳ مرحله آخر ۳۰ بار تکرار شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه طولیل شدن نهایی در ۷۲°C PCR خاتمه یافت. محصول PCR در ژل آگاروز ۱% تحت نور UV، با رنگ آمیزی اتیدیوم پروماید مشاهده شد. باند DNA مورد نظر توسط کیت استخراج از ژل، تخلیص و با استفاده از کیت T/A کلون به وکتور pTZ57R/T متصل شد. این وکتور حامل ژن، به باکتری *E. coli* (DH5α)، انتقال و در نهایت روی محیط کشت LB آگار حاوی آمپی سیلین، IPTG و X-gal در ۳۷°C حدود ۱۶ تا ۱۷ ساعت رشد یافت. از کلونی های سفید، PCR گذاشته شد (مطابق PCR قبل، تنها با این تفاوت که به جای DNA ژنومی، حجم یک میکرولیتر از تک کلونی رقیق شده در ۱۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استفاده شد). کلونی مثبت در محیط کشت LB در دمای ۳۷°C به مدت ۱۵ ساعت رشد یافت و سپس توسط کیت استخراج پلازمید، پلازمید آن تخلیص و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن فرستاده شد (خوانش توسط پرایمرهای عمومی M13 رفت و M13 برگشت). با استفاده از توالی به دست آمده، پرایمرهای رفت و برگشتی طراحی شد که به ترتیب دارای جایگاه برش برای آنزیم های برشگر *BamH1* و *Xho1* هستند (جدول ۱). حجم یک میکرولیتر از وکتور pTZ57R/T حامل ژن ۳۰ بار رقیق شده در آب دوبار تقطیر به عنوان DNA الگو، ۱/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای کلونینگ به غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس PCR که در نهایت این مخلوط با آب دوبار تقطیر به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید، برنامه PCR مانند PCR ابتدایی (تفاوت فقط در مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۶°C است) گذاشته شد. قطعه تکثیر یافته از ژل تخلیص شد، این قطعه خالص شده و وکتور pET-28a+ توسط آنزیم های برشگر *BamH1* و *Xho1* به مدت ۱ ساعت هضم شد، قبل از انجام اتصال این دو قطعه به هم، وکتور و ژن برش خورده از ژل تخلیص و برای محاسبه میزان به کاررفته برای اتصال روی ژل آگاروز برده شدند تا غلظت مناسب از وکتور و ژن با نسبت ۲:۱، توسط آنزیم T4 لیگاز به هم اتصال یابند. هم اکنون وکتور pET-28a+ حاوی ژن *dnaK* بوده که کدکننده پروتئین DnaK حاوی دم هیسیدینی در انتهای C خود است. در نهایت این وکتور به باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) انتقال و روی LB آگار حاوی کانامایسین رشد یافت. از تک کلونی های آن، کلونی PCR گذاشته شد (همه شرایط آن مانند PCR با پرایمرهای

وکتور برای اتصال مورد استفاده قرار گیرد (شکل ۱-ت). پس از اتصال ژن و وکتور به هم و انتقال آن به BL21، رشد باکتری روی محیط کشت LB آگار حاوی کانامایسین صورت گرفت، در نهایت از آن تک‌کلونی برداشته و کلونی PCR انجام شد. وجود باندی در ناحیه ۱۸۰۰ جفت‌باز، موید درستی فرآیندهای انجام‌شده است (شکل ۱-ج). پلازمید این باکتری استخراج و به‌عنوان DNA الگو برای انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت و باند حدود ۱۸۰۰ جفت‌باز آن مشخص شد (شکل ۱-چ).

توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی DnaK

براساس توالی به‌دست‌آمده، ژن *dnaK* دارای ۱۸۳۹ نوکلئوتید بوده که توالی این ژن به پایگاه داده NCBI برای ثبت ژن فرستاده شد. پس از بلاست‌کردن این توالی در پایگاه NCBI مشاهده شد که این توالی با توالی‌های *dnaK* باکتری‌های *باسیلوس هالودورانس* C-125 DNA، *باسیلوس کلوسی* سویه ENTPro، *باسیلوس کلوسی* سویه KSM-K16 DNA، *باسیلوس سودوفیرموس* OF4 و *Bacillus lehensis* G1 به ترتیب ۹۹٪، ۷۷٪، ۷۷٪، ۷۷٪، ۷۸٪ یکسانی داشت (شکل ۲).

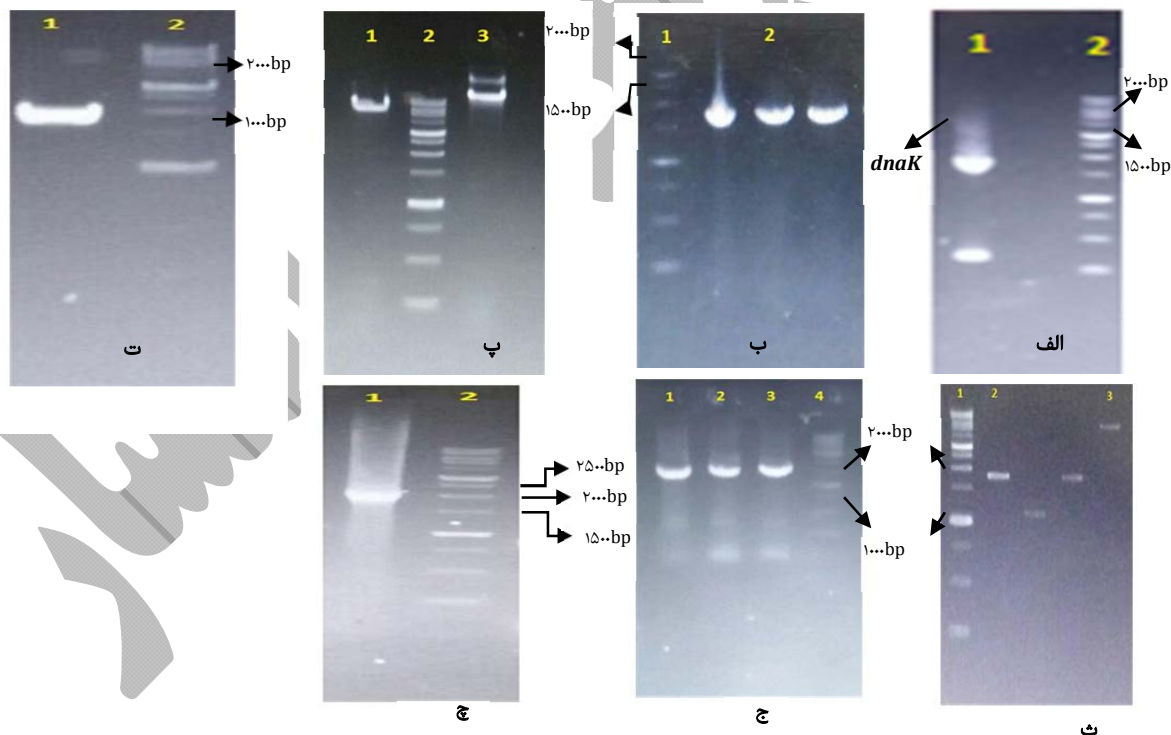
سپس توالی نوکلئوتیدی این ژن توسط سرور EXPASY translate به توالی آمینواسیدی ترجمه شد که در شکل ۳ این توالی موجود است. این پروتئین از ۶۰۵ اسیدآمینو تشکیل شده است.

۷۰°C و بدون حضور هیچ پروتئین دیگر، در دمای ۵۴°C به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از آن با به‌کاربردن بافر تریس-سولفات (pH=۷/۷، ۵۰ میلی‌مولار) و سوسترای آن (پارانیتروفیل استات ۵ میلی‌مولار حل‌شده در استونیتریل) در ۴۰۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه جذب آن توسط اسپکتروفوتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

کلونینگ ژن *dnaK*

پس از PCR ژن *dnaK* از DNA ژنومی باکتری *B. halodurans* دیده شد که قطعه تکثیرشده در ناحیه بین ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت‌باز لدر DNA قرار دارد (شکل ۱-الف). پس از استخراج از ژل این قطعه و T/A کلون آن، از کلونی‌های سفید PCR گذاشته شد، این کار تاییدکننده اتصال ژن مورد نظر در وکتور pTZ57R/T است. به‌منظور تولید قطعه ژن *dnaK* همراه جایگاه‌های برشی، به کمک پرایمرهای کلونینگ، از این وکتور PCR انجام شد (شکل ۱-ب). در ابتدا توسط آنزیم‌های برشگر برش وکتور صورت گرفت، تفاوت باند پلازمید برش‌خورده و برش‌نخورده کاملاً مبرهن است، با به‌دست‌آوردن زمان مورد نیاز برای برش، ژن خالص‌شده نیز به همین صورت هضم شد (شکل ۱-پ و ت)، بعد از تخلیص و وکتور و ژن بریده‌شده، روی ژل آگاروز برده شدند تا غلظت مناسب از ژن و

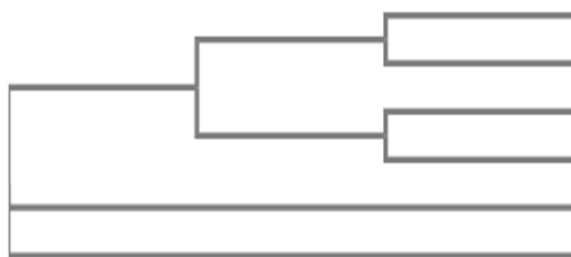


شکل ۱ مراحل کلونینگ ژن *dnaK* باکتری *باسیلوس هالودورانس* الف) PCR از DNA ژنومی باکتری *B. halodurans*. ستون ۱: محصول PCR. ستون ۲: لدر DNA (SMOBIO; DM3100). ب) PCR از وکتور pTZ57R/T حاوی ژن *dnaK* از *B. halodurans*. ستون ۱: لدر DNA (SMOBIO; DM3100)، ستون ۲: محصول PCR. پ) هضم وکتور pET-28a+ توسط آنزیم‌های برشگر *BamH1* و *Xho1*. ستون ۱: وکتور هضم‌شده، ستون ۲: لدر DNA (DNASMOBIO; DM3100) ستون ۳: وکتور هضم‌نشده. ت) هضم ژن *dnaK* توسط آنزیم‌های برشگر *BamH1* و *Xho1*. ستون ۱: ژن هضم‌شده، ستون ۲: لدر DNA (SMOBIO; DM3100). ث) ژن *dnaK* و وکتور pET-28a+ برش‌خورده پس از استخراج از ژل. ستون ۱: لدر DNA (SMOBIO; DM3100)، ستون ۲: ژن *dnaK*، ستون ۳: وکتور pET-28a+ حاصل از تک‌کلونی‌های بعد از انتقال وکتور pET-28a+ به BL21. ستون ۱، ۲ و ۳: محصول PCR حاصل از تک‌کلونی‌های ۱، ۲ و ۳ پلید حاوی باکتری BL21 دارای pET-28a+ حامل ژن *dnaK*. ستون ۴: لدر DNA (SMOBIO; DM3100). چ) PCR حاصل از وکتور pET-28a+ حاوی ژن *dnaK*. ستون ۱: محصول PCR. ستون ۲: لدر DNA (SMOBIO; DM3100).

> *Bacillus halodurans* strain Guj1 chaperone protein DnaK gene

ATGAGTAAAATATTCGGTATTGACCTTGGAAACAACAACTCATGTGTAGCCGTTATGGAGGGTGGCGAAGCGACGGTTATTCGGAATCCAGAA
GGAAACCGTACTACCCCTTCTGTTGTGGCATTAAAGATGGGGAACGCCAAGTAGGGGAAAGTGGCAAAGCGACAAGCGATCACGAACCCCTAAC
ACCGTGATTTCAAGCGTACATGGGGAACGAAACCAAAAGAAACATTTGAAAGGAAAAAAGAAATATACACCGCAAGAAATCTCTCGGATTATT
TTGCAAAAATTTAAAATCTGACCGTGAAGCCTATCTCGGTGAAGAAAGTAAACGAAAGCAGTTATTACGGTTCCAGCTTATTTCACGACTCACAG
CGCCAAAGCGACAAAGGATGACAGGAAAATCGCTGGATTAGAAGTAGAGCGGATTTGCAACGAGCCAACAGCAGCTGCTCTTGGCCTATGGTCTT
GACAAAGAAGACGATCAAAACGATTCTTGCTACGACCTCGGTGGTGGTACGTTTACGCTTTCCATTCTCGAAATAGGTGATGGATTTTTTGAA
GTAAGGCCACTTCAGGGGACAATAAGCTTGGTGGGGATGACTTTGTCCAAAGTATCATTGACCATTTGATCGCAGAATTTAAAAAGGAAAAAT
GGCATTGATCTATCACAGGATAAAAATGGCGATGCAACGTTTAGAGGATGCTGCTGAGAAAGCGAAAAAGGATTTATCTGGTGTGATGTCAACA
CAAATTTCAATGCGGTTCAATACAGCGGATACAACAGGACCAAGACCTTGAACCTTACTCGCGGAAGTTTGAAGAGCTTCTTTCAC
ACTTAGTAGAAAGAAGCGTTGGGCTACAGTCAAGCATTAACAAGATTCAGGCCTTCTGCAAAGTGAATTTGATAAAGTGTCTCGTTGGAG
GATCTACAGTATTCCTGCGGTTCAAGGAGCGGTTAAGAACCTTACAGGAAAAGAACCATAAAGGGTAAATCCAGACGAAAGTCAATGCC
TCGGCGTAGCGGTTCAAGCAGGGGTTCTAACAGGAGATGTTAAAGATGTCGTACTTCTCGACGTAACCCCGCTTCACTTGGAAATGAAACAA
TGGGTGGCGTGTTCAGAAAGCTTATGAGCGTAAACGACAACTCCCTACTAGCAAATCGCAAATCCTTCCAAAGCGCTGCCGACAAACAGCCTTC
TGTGATATCCAGTCTTCAAGGAGAGCGGAAATGGCTGCCGACAACAAGACGCTCGGTGCTTCCAACCTAACAGATATCCGCCCGCACCA
CGTGGGTACCGCAAATCGAAGTTACATTTGATATGATGCGAACGGGATTTAAAGCTTAAAGCGAAAGACCTCGGCACAAACAAGAACAG
TCCATTACGATTACATCTTCTCCGGTTTAAACAGATGAAGAAATCGATCAGATGGTCAAGGACGAGAAAGCGAAGCGCTGAGGCTGATAAGAAA
CGCCCGAAGAAGTAGAGCTACGGAATGAAGCGGATCAGCTCGTCTTACAAACCGAGAAAACGTTAAGAGATCTCGGTGATAATGTAGATGAG
GCTGAGAAGACGAAAGCCGAGGAAGCAAAAAGAAAAGCTGAAAAAAGCGATCGAAGCGAACAATATTGATGAGATTCCGCGAACGAAAGAAGA
GCTTCAACAAGTCTTCAAGCCTTAAACGACAAAATATATGAGCAAGCGGCTCAACAAGCACAGCAAGCCCAATCGGCTGAAGGTGATCAAGG
CACAGTGGAAAAAGGGCAGGATGACAACGTTGTGGATGCAGATTATGAAGAAGTAAAAGAAGACAAGTAA

الف



ب

- B. halodurans* strain Guj1
- B. halodurans* C-125 DNA
- B. clausii* strain ENTPro
- B. clausii* strain KSM-K16 DNA
- B. pseudofirmus* OF4
- B. lehensis* G1

شکل ۲) الف) توالی نوکلئوتیدی مربوط به DnaK از باکتری *B. halodurans*; ب) درخت فیلوژنی همولوگ‌های توالی نوکلئوتیدی DnaK باکتری strain Guj1 *B. halodurans* توسط پایگاه داده ClustalW

MSKIIGIDLGTNSCVAVMEGGEATVIPNPEGNRTTPSVVAFKDGGERQVGEVAKRQAITNPNTVISVKRHMGTNH
KENIEGKEYTPQEISAILQKLKSDAEAYLGEVTKAVITVPAYFNDSQRQATKDAGKIAGLEVERIVNEPTAAALA
YGLDKEDDQTLVYDLGGTFDVSILELGDGFFEVKATSGDNKLGDDFVQVIIDHLIAEFKKENGIDLSQDKMAM
QRLEDAAEKAKKDLGSMSTQISLPFITADTTGPKHLELTLTRAKFEELSSHLVERTLGPTRQALQDSGLSASEID
KVVLVGGSTRIPAVQEAVKNLTGKEPHKGVNPDEVIALGVAVQAGVLTGDVVKDVLVDVTPSLGDIETMGGVFTK
LIERNTTIPTSKSILPTAADNQPSVDIHVLQGEREMAADNKTLRGFLTDIPAPRGPVQIEVTFDIDANGIVNVK
AKDLGTNKEQSITITSSGLTDEEIDQMVKDAEANAADKKRREEVELRNEADQLVFTTEKTLRDLGDNVDEAEK
TKAEAEKELKKAIEANNIDEIRATKEELQVQVQALTTKLYEQAAQQAQAQAQSAEGDQGTVEKQDDNVVDADY
EEVKEDKStop

شکل ۳) توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین DnaK از باکتری strain Guj1 *B. halodurans*

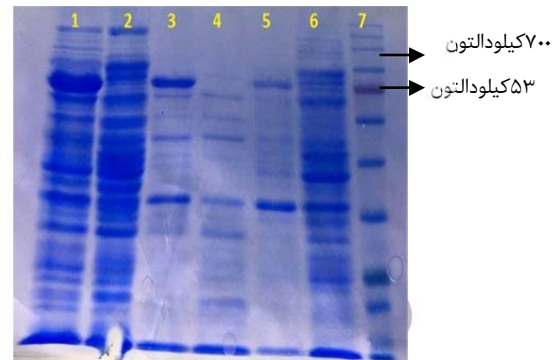
بررسی فعالیت آنزیم کربنیک‌انهدراز در حضور DnaK جزئی تخلیص‌شده

بررسی‌های مربوط به فعالیت پروتئین نوترکیب DnaK نشان داد که پروتئین مورد نظر فعال بوده پس در این شرایط بیانی توانسته شکل عملکردی خود را حفظ کند. این نتیجه‌گیری حاصل از بررسی

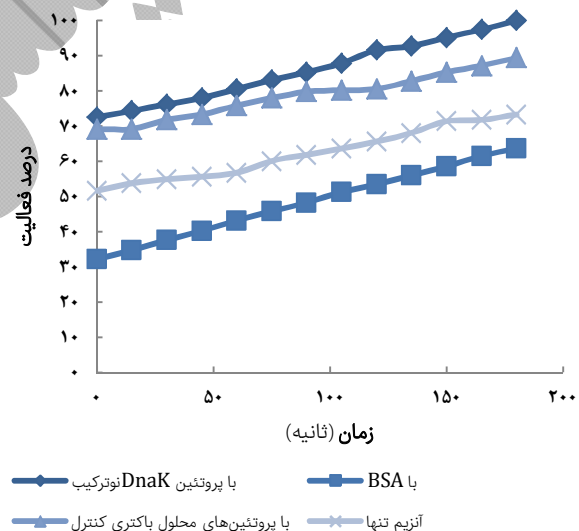
بررسی بیان پروتئین

برای بیان پروتئین ژن *dnaK* به صورت نوترکیب، قطعه حاوی ژن درون وکتور pET-28a⁺ کلون و به میزان باکتری BL21 منتقل شد. پروتئین بیان‌شده باندی در نزدیکی ناحیه ۷۰ کیلودالتونی مارکر پروتئینی در SDS-PAGE نشان داد (شکل ۴).

فعالیت آنزیم کربنیک‌انهیدراز در حضور این پروتئین نوترکیب، پس از قرارگیری در دمای 54°C به مدت یک ساعت بود که نشان داد این آنزیم فعالیت بالاتری در حضور این پروتئین نسبت به حالتی که این پروتئین نباشد از خود نشان می‌دهد (نمودار ۱).



شکل ۴ SDS-PAGE ۱۲/۵٪ از پروتئین بیان شده DnaK در باکتری *E. coli* سویه BL21. (۱) پروتئین‌های محلول باکتری لیز شده حاوی DnaK. (۲) پروتئین‌های محلول باکتری لیز شده بدون وکتور حامل ژن *dnaK* (باکتری کنترل)، (۳) پروتئین‌های محلول باکتری لیز شده حاوی DnaK بعد از تیمار حرارتی به مدت ۴۰ دقیقه در دمای 70°C . (۴) پروتئین‌های محلول باکتری کنترل لیز شده بعد از تیمار حرارتی در دمای 70°C به مدت ۴۰ دقیقه، (۵) پروتئین‌های رسوب باکتری لیز شده حاوی DnaK. (۶) پروتئین‌های رسوب باکتری کنترل لیز شده، (۷) مارکر پروتئینی شرکت سیناژن (PR901641)



نمودار ۱ بررسی فعالیت آنزیم کربنیک‌انهیدراز در حضور و عدم حضور چپرون حداکثر فعالیت آنزیم کربنیک‌انهیدراز ۱۰۰٪ در نظر گرفته شد. فعالیت کربنیک‌انهیدراز بعد از قرارگیری در دمای 54°C به مدت یک ساعت (به منظور شوک حرارتی و دنا توره کردن آنزیم) در حضور و عدم حضور پروتئین DnaK بررسی شد.

بحث

پروتئین‌های شوک حرارتی بسیاری از چپرون‌های مولکولی را تشکیل می‌دهند. HSPها عملکردهای متنوعی را انجام داده که از جمله آن تا خوردگی پلی‌پپتیدهای تازه سنتز شده، تا خوردگی مجدد پروتئین‌های دنا توره شده، جلوگیری از تجمع پروتئین‌ها، عبور و مرور پروتئین‌ها و کمک به تخریب پروتئولیتیک است. در صورت بروز مشکل در فعالیت آنها، به عنوان عامل بیماری‌زایی نقش ایفا می‌کنند، مثل بیماری‌های مربوط به پیری (مانند آب مروارید)،

اختلال در سیستم ایمنی و همچنین در بیماری‌زایی دامنه‌ای از انواع سرطان‌های انسانی می‌توانند درگیر باشند. تعدادی از بیماری‌های تخریب عصبی مثل آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون مربوط به کاهش فعالیت HSPها بوده است. از این رو می‌توان با هدف قراردادن چپرون‌ها به درمان این‌گونه بیماری‌ها پرداخت [4, 8-10]. علاوه بر آن، بیان پروتئین‌های نوترکیب به منظور مطالعه عملکرد زیستی ژن‌ها، کاربرد داروهای درمانی و فرآیندهای صنعتی حائز اهمیت است. در باکتری *E. coli* به صورت فراوان و مناسب تولید پروتئین‌های نوترکیب صورت می‌گیرد ولی بیان زیاد آن منجر به شکل‌گیری اجسام توده‌ای می‌شود [11]. به همین منظور با استفاده از سیستم‌های چپرونی مختلف در *E. coli* می‌توان به تا خوردگی صحیح این پروتئین‌ها کمک کرد [12]. شرکت تاکارا پلازمیدهای حاوی سیستم‌های مختلف چپرونی طراحی کرده که بیان همزمان این چپرون‌ها با پروتئین نوترکیب منجر به افزایش این پروتئین نوترکیب در حالت محلول می‌شود [13]. از این رو چپرون‌های مولکولی در حوزه بیوتکنولوژی بسیار حائز اهمیت هستند. پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلودالتون (Hsp70) در دامنه گسترده‌ای از فرآیندهای تا خوردگی، عبور و مرور غشایی، کنترل فعالیت پروتئین‌های تنظیمی، مسیره‌های سیگنال عبوری، تنظیم چرخه سلولی، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده حضور دارند. پس فاکتورهای مهمی در فرآیند تکامل و پاتولوژی مانند سرطان‌زایی، تخریب نورونی، بیماری‌های خودایمنی، عفونت‌های ویروسی و سالخوردگی محسوب می‌شوند [7]. Hsp70 برای فعالیت خود به ATP نیاز داشته، از این رو کوچپرون‌های HSP40 (DnaJ) و فاکتورهای تعویض‌کننده نوکلئوتید (NEF) با آن همکاری می‌کنند [1]. DnaK (همولوگ پروکاریوتی Hsp70 یوکاریوت‌ها) یکی از فراوان‌ترین و مهم‌ترین چپرون موجود در *E. coli* بوده، که کوچپرون‌های DnaJ و GrpE با آن همکاری دارند [12, 14].

به دلیل اهمیت بسزای چپرون‌های مولکولی در حوزه درمان و بیوتکنولوژی، هدف این مطالعه شناسایی، کلون، بیان و بررسی خصوصیات چپرونی DnaK از باکتری *B. halodurans* سویه Guj1 بود. از آنجایی که توالی ژن *dnaK* در این باکتری شناخته شده نبود، با پلاست کردن ژن *dnaJ* این باکتری [8]، در پایگاه NCBI موجودات با همولوژی بالا با این توالی به دست آمد که شامل باکتری‌های *باسیلوس سرتوس* سویه FORC-005، *باسیلوس تورنژنسیس* سویه MYBT18246 و *Bacillus sp.* B25 به ترتیب دارای درصد یکسانی ۱۰۰، ۹۹ و ۹۹ با این توالی هستند. DnaK این موجودات در پایگاه ClustalW هم‌ردیف شده و از ابتدا و انتهای آن برای DnaK، پرایمر طراحی شد. با تکثیر این ژن از باکتری *B. halodurans*، این قطعه ۱۸۳۹ جفت‌باز در وکتور pTZ57R/T قرار گرفت و از این وکتور حاوی ژن، PCR گذاشته شد، این قطعه تکثیر شده پس از برش به وکتور pET-28a متصل و پس از آن به میزبان BL21 انتقال یافت. باکتری BL21 به عنوان میزبان مناسب برای بیان این پروتئین انتخاب شد. بیان بهینه در 30°C به مدت ۲ ساعت صورت پذیرفت. پروتئین بیان شده حاوی دم هیستیدینی در انتهای C خود بود، پس برای تخلیص آن از کروماتوگرافی تمایلی Ni-NTA می‌توان استفاده کرد. با کمک پایگاه داده IPC پیش‌بینی شد که توالی پروتئینی این ژن، وزن مولکولی ۶۶/۱۸ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک ۴/۵۵ داشته و در شرایط سیتوپلاسمی (pH=۷/۴) دارای بار منفی است. در ساختار این پروتئین ۶۱۲ اسید آمینه وجود داشته و به دلیل وجود تنها یک

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: فاطمه وحدانی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۳۵٪)؛ حسین غفوری (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۳۵٪)؛ سجاد صاری‌خان (نویسنده سوم)، روش‌شناس (۳۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان انجام شد.

منابع

- Smith HL, Li W, Cheetham ME. Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;40:142-52.
- Dobson CM, Šali A, Karplus M. Protein folding: A perspective from theory and experiment. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1998;37(7):868-93.
- Izaddoust Kordmahaleh M, Ghafoori H, Sarikhan S, Heidari B. Identification and sequence analysis of cDNA encoding the 90-kDa heat shock protein (Hsp90) from the Caspian kutum *Rutilus frisii kutum*. *Aquat Physiol Biotechnol.* 2017;4(4):1-12. [Persian]
- Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* 2011;475(7356):324-32.
- Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(7):2874-8.
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, et al. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science.* 1996;272(5268):1606-14.
- Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(6):670-84.
- Rappa F, Farina F, Zummo G, David S, Campanella C, Carini F, et al. HSP-molecular chaperones in cancer biogenesis and tumor therapy: An overview. *Anticancer Res.* 2012;32(12):5139-50.
- Stefani M, Dobson CM. Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med (Berl).* 2003;81(11):678-99.
- Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules.* 2014;4(1):235-51.
- Jia Q, Luo Y. The selective roles of chaperone systems on over-expression of human-like collagen in recombinant *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2014;41(11):1667-75.
- Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(5):1694-9.
- Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(5):1694-9.

سیستئین، احتمال تشکیل پیوند دی‌سولفید در این پروتئین وجود ندارد. توالی نوکلئوتیدی ژن این پروتئین با توالی نوکلئوتیدی ژن *dnaK* از باکتری *B. halodurans* C-125 DNA ۹۹٪ یکسانی نشان می‌دهد. از آنجایی که ساختار سه‌بعدی پروتئین DnaK باکتری *B. halodurans* گزارش نشده بود، با استفاده از سرور I-TASSER برای این توالی پروتئینی در مقایسه با سایر توالی‌ها و ساختارهای مشابه موجود در پایگاه PDB، ساختاری سه‌بعدی پیش‌بینی شد. DnaK موجود در *E. coli* که دارای ساختار سه‌بعدی کریستالوگرافی شده در پایگاه PDB بوده، ۶۰٫۵ اسیدآمیننه داشته و pH ایزوالکتریک پیش‌بینی‌شده آن ۴٫۷۹ است. این پروتئین دومین‌های اتصال به نوکلئوتید و سوسترادارد. توالی اسیدآمینهای DnaK موجود در *E. coli* حدود ۶۰٪ با توالی اسیدآمینهای DnaK موردنظر همولوژی نشان می‌دهد. همچنین *B. halodurans* DnaK شباهت ۸۸٫۸٪ با ساختار سوم پروتئین BiP که عضوی از خانواده HSP70 در انسان است، دارد. BiP یک پروتئین متصل‌شونده به ATP بوده که به‌عنوان عضو ساکن شبکه آندوپلاسمی خانواده HSP70 است^[15]. از باقی‌مانده ۲۵ تا ۴۰۸ آن دومین NBD و از باقی‌مانده ۴۱۹ تا حدود ۶۳۳ آن را زیردومین‌های SBD و SBD دومین SBD تشکیل داده است^[16]. همچنین توالی آمینواسیدی این پروتئین با پروتئین *B. halodurans* ۵۲٫۱۴٪ یکسانی دارد.

به‌منظور بررسی عملکرد چپرونی DnaK نو ترکیب مورد مطالعه در شرایط "درون شیشه"، به آنزیم کربنیک‌انهدراز در حضور و عدم حضور چپرون، برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۵۴°C شوک حرارتی داده و ملاحظه شد که پس از این شوک حرارتی، فعالیت کربنیک‌انهدراز در حضور DnaK حدود ۲۷٪ بهبود یافته است. در مطالعه‌ای مشابه سندپ نشان داد که DnaK به‌صورت وابسته به غلظت می‌تواند باعث بهبود عملکرد لوسیفراز در محیط "درون شیشه" شود، همچنین رانگلینگ با استفاده از چپرون‌های *DnaK:DnaJ:GrpE* از *Clostridium acetobutylicum* موجب بهبود ۲۲٪ رفولدینگ لوسیفراز در محیط "درون شیشه" شد^[17, 18]. به‌طور کلی *B. halodurans* در مقابل استرس حرارتی از پروتئین‌های هدف محافظت کرده و فعالیت چپرونی دارد. هر چند با توجه به مطالعات پیشین می‌توان نتیجه‌گیری کرد برای دستیابی به فعالیت بهینه DnaK حضور کوچپرون DnaJ ضروری به نظر می‌رسد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم استفاده از دیگر چپرون‌های درگیر در عملکرد چپرون DnaK همانند GrpE (به‌عنوان فاکتور تبادل نوکلئوتیدی) اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود به‌منظور افزایش عملکرد فعالیت چپرونی DnaK در شرایط آزمایشگاهی، از تمامی کوچپرون‌های درگیر در شبکه چپرونی محیط سلولی استفاده شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثر حفاظتی DnaK از *باسیلوس هالودورانس* روی کربنیک‌انهدراز انسانی تمیاز شده با حرارت، نتیجه‌گیری می‌شود که DnaK از *باسیلوس هالودورانس* به‌طور ذاتی می‌تواند به‌منظور بهبود ویژگی‌های عملکردی آنزیم‌ها و پروتئین‌های هدف در حوزه‌های مختلف بیوتکنولوژی کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از دانشگاه گیلان جهت حمایت مالی پژوهش حاضر قدردانی و تشکر می‌شود.

chaperone complexed with ADP and substrate. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(21):8471-6.

17- Nicoll WS, Boshoff A, Ludewig MH, Hennessy F, Jung M, Blatch GL. Approaches to the isolation and characterization of molecular chaperones. Protein Expr Purif. 2006;46(1):1-15.

18- Yang J, Nune M, Zong Y, Zhou L, Liu Q. Close and allosteric opening of the polypeptide-binding site in a human Hsp70 chaperone BiP. Structure. 2015;23(12):2191-203.

14- Ghafoori H, Askari M, Sarikhan S. Molecular cloning, expression and functional characterization of the 40-kDa heat shock protein, DnaJ, from *Bacillus halodurans*. Process Biochem. 2017;54:33-40.

15- Schlecht R, Erbse AH, Bukau B, Mayer MP. Mechanics of Hsp70 chaperones enables differential interaction with client proteins. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(3):345-51.

16- Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE, Zuiderweg ER. Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK)

نسخه پیش از انتشار