مقاله پژوهشی

همسانه سازی و بیان ژن لیپاز باسیلوس *Bacillus pumilus* در مخمر *Pichia pastoris*

فتح اله احمدپور*، باقر یخچالی، سیدصفاعلی فاطمی، علی اصغر کارخانه، سمیرا طالبی

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده/ لیپازها (تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولازها EC 3.1.1.3) هیدرولیز تری‌آسیل گلیسرول به اسیدهای چرب و گلیسرول را در حد فاصل لایه چربی و آب کاتالیز می‌کند. این آنزیم‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی، کشاورزی، روغن، چوب و کاغذ، پزشکی و دارویی دارند. در این تحقیق ژن لیپاز باکتریایی باسیلوس پامیلوس بومی در میزبان پیکیاپاستوریس همسانه سازی و بیان شد. ژن لیپاز در حامل کلونینگ PGEM5Zf همسانه سازی شد و سپس با آنزیم های *BamHI* و *EcoRI* از حامل کلونینگ PGEM5Zf جدا و در حامل بیانی Ppic9 که با همان آنزیم ها برش خورده بود تحت کنترل راه انداز الکل اکسیداز همسانه‌سازی شد. سازه حاصل پس از تأیید همسانه‌سازی با روش‌های ملکولی و آنزیمی، از طریق روش الکتروپوریشن به درون ژنوم مخمر بیانی پیکیا پاستوریس انتقال داده شد. بیان آنزیم لیپاز در محیط کشت مناسب با تست پارانیتروفنیل پالمیتات(pNPP) و روش SDS-PGE بررسی شد. نتایج نشان دهنده بیان لیپاز نوترکیب به صورت پروتئین ترشحی بود.

واژگان کلیدی: لیپاز؛ باسیلوس پامیلوس؛ پیکیا پاستوریس؛ بیان؛ همسانه‌سازی.

مقدمه

لیپازها (تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولازها EC 3.1.1.3)[1] هیدرولیز تری‌آسیل گلیسرول به اسیدهای چرب و گلیسرول را در حد فاصل لایه چربی و آب کاتالیز می‌کنند. این آنزیم‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی، کشاورزی، روغن، چوب و کاغذ، پزشکی و دارویی دارند(۱,۲,۳,۴). از مهمترین کاربردهای لیپاز استفاده در شوینده‌های خانگی برای از بین بردن لکه‌های چربی است(۵). لیپازهای باکتریایی نوترکیب بخش مهمی از تجارت آنزیم‌ها هستند(۶). با توجه به کاربردهای وسیع آنزیم لیپاز در صنایع مختلف و عدم تولید آن در کشور و صرف هزینه‌های هنگفتی که برای وارد کردن آن می شود، انجام تحقیقات مختلف در ابعاد گوناگون برای فراهم کردن زمینه تولید این آنزیم در داخل کشور و خودکفایی ضروری به نظر می‌رسد. لذا در این تحقیق لیپاز باکتریایی که قبلا" از یک باسیلوس پامیلوس[2] مزوفیل بومی،

* فتح اله احمدپور، PhD
دانشجوی دکتری ژنتیک ملکولی، گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط زیست،
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
پست الکترونیک : ahmadpour۶۶@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۰۲ • تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۱

1. Lipases (Triacylglycerol acylhydrolases; EC 3.1.1.3)
2. Bacillus pumilus.

Archive of SID
www.SID.ir

ژن مربوط به آن جدا سازی و توالی‌یابی شده بود در سیستم مخمری کلون و بیان شد.(۷) سیستم بیانی مورد استفاده در این تحقیق مخمر متیلوتروف پیکیا پاستوریس[۳] بود. دلیل انتخاب این سیستم بیانی محاسن متعدد آن از جمله، وجود راه انداز قوی از ژن الکل اکسیداز[۴]، امکان رشد در تراکم بالای فرمانتور در محیط کشت ساده، انجام تغییرات شیمیایی پس از ترجمه پروتئین، دست ورزی آسان ژنتیکی و از آنجاییکه پیکیا پاستوریس به طور طبیعی پروتئین‌های کمی به داخل محیط کشت ترشح می‌کند، تخلیص پروتئین در بیان ترشحی آنزیم، ساده‌تر است. همچنین اگر پروتئین در سیستم طبیعی ترشحی و گلیکوزیله باشد، بیان ترشحی ارجح می‌باشد (۸,۹,۱۰,۱۱) لازم به ذکر است، سویه ای که دراین پروژه مورد تحقیق قرار گرفت ازجمله باسیل های مزوفیل می باشد و دامنه دمایی که لیپاز حاصل از آن فعالیت می کند در محدوده ۲۰ تا ۴۰ درجه سانتی گراد می باشد و این خود مزیت بر این است که این آنزیم میتواند در پودرهای رخت شویی که نیاز به آب گرم برای فعالیت ندارند مورد استفاده بگیرد همچنین از بیان ژن لیپاز مورد تحقیق، آنزیم لیپازی تولید می شود که به خارج از سلول ترشح می شود.

مواد و روش ها

سویه ها، پلاسمید و محیط های کشت

ژن لیپاز (EF093106) از یک باکتری باسیلوس پامیلوسی بومی بود که قبلا جداسازی و توالی یابی ودر پلاسمید pYM122 کلون شده بود (۷). حامل pPIC9 و مخمر پیکیا پاستوریس سویه GS115 از شرکت اینویتروژن[۵] تهیه شده بود. باکتری *Escherichia coli* سویه DH5 α برای همسانه سازی استفاده شد. محیط کشت LB[۶] برای کشت باکتری و محیط های کشت YPD, MM, MD BMGY, BMMY برای رشد مخمر استفاده شدند. همه محیط های کشت طبق دستورالعمل موجود در منابع ساخته شدند (۱۲).

همسانه سازی[۷] ژن لیپاز در پلاسمید PGEM5Zf

ژن لیپاز با استفاده از دو آغازگر رفت (5´ AGGGATCCCAACGATGAAGGT-TATCAGATTCAAGAAAAGG 3´) و برگشت (5´ GAATTCTTAATTCG-TATTCTGTCCCACG 3´) تکثیرشد. اندازه PCR ژن لیپاز با روش. قطعه تکثیر شده مربوط به ژن لیپاز ۷۷۰ جفت باز است. سپس برش خورده با آنزیم PGEM5Zf ژن لیپاز تکثیر شده در پلاسمید .همسانه سازی شد DH5 α سویه *E. coli* در سلول‌های مستعد *Eco*RV

بررسی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیپاز

صحت همسانه سازی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیپاز با روشPCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. همچنین برای تأیید صحت همسانه سازی با روش هضم آنزیمی[۸]، پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI برش داده شد. محل برش این آنزیم‌ها در انتهای ´۵ آغازگرها جاسازی و در نظرگرفته شده بود. محصول برش آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

همسانه سازی ژن لیپاز در حامل[۹] بیانی pPIC9

برای همسانه سازی ژن لیپاز، ابتدا حامل pPIC9 و حامل نوترکیب pGEM5Zf حاوی ژن لیپاز را با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI برش داده و قطعات مربوط به ژن لیپاز و حامل pPIC9 از روی ژل آگارز تخلیص و واکنش اتصال[۱۰] انجام شد تا پلاسمید نوترکیب pLSPICبدست آید. محصول واکنش اتصال به درون باکتری *E. coli* سویه DH5 α منتقل شد. از کلونی‌های نوترکیب که نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم بودند، استخراج پلاسمید انجام و DNA حاصله روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

تأیید صحت همسانه سازی پلاسمید نوترکیب pLSPIC

برای اطمینان از صحت همسانه سازی ژن لیپاز درپلاسمید pPIC9 و مشاهده اندازه قطعه همسان سازی شده، پلاسمید نوترکیب pLSPIC با آنزیم‌های *Bam*HI و *Eco*RI بریده شد و روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. برای تایید بیشتر در ضمن پلاسمید نوترکیب pLSPIC مورد نظر توالی یابی[۱۱] شد و همچنین برای اثبات وجود ژن خارجی(ژن لیپاز) در ژنوم مخمر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PCR ،OX1 انجام شد.

3. Pichia pastoris
4. lcohol oxidase1
5. Invitrogen
6. Lauria Bertani medium
7. Cloning
8. Digestion
9. Vector
10. Ligation
11. Sequencing.

www.SID.ir
Archive of SID

انتقال پلاسمید نوترکیب به درون سلول‌های پیکیا پاستوریس

دراین تحقیق جهت انتقال پلاسمید نوترکیب به درون مخمر از روش الکتروپوریشن[12]که در کنار سادگی از راندمان بالایی برخوردار است(۱۳,۱۴)، استفاده شد.حامل Ppic9 فاقد منشأ همانندسازی یوکاریوتی است و جهت بقا در سلول مخمر باید وارد DNA کروموزومی شود. ورود پلاسمیدهای خطی به درون DNA کروموزومی با کارایی بهتری اتفاق می‌افتد بنابراین پلاسمیدهای نوترکیب قبل از انتقال خطی شدند. پلاسمیدهای نوترکیب pLSPIC ساخته شده به وسیله آنزیم *BglII* برش داده شد، توسط روش الکتروپوریشن قطعه ۶ کیلوبازی که حاوی راه انداز الکل اکسیداز، ژن لیپاز اضافه شده و ژن هیستیدین دهیدروژناز (*his4*) بود، ابتدا خالص شده و سپس به سویه مخمری GS115 منتقل گردید. سویه مخمری GS115 در ژن هیستیدین دهیدروژناز (*his4*) نقص دارد و استفاده از آن اجازه می‌دهد تا سویه‌های دریافت کننده DNA خارجی براساس رشد در محیط فاقد اسیدآمینه هیستیدین انتخاب شوند.

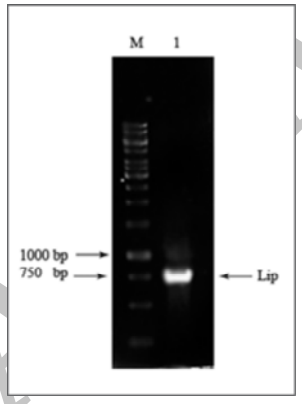
بررسی بیان لیپاز در مخمر پیکیا پاستوریس

بعد از انجام انتقال DNAA و پیدایش کلونی‌های نوترکیب، حدود ۱۰۰ کلون که در محیط MD رشد کرده بودند با آزمایش کیفی پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP)[13]بررسی شدند در این آزمایش از pNPP به عنوان سوبسترا برای نشان دادن فعالیت لیپاز استفاده شد که از روی تغییر رنگ ایجاد شده توسط آزاد شدن پارانیتروفنل (pNP) در اثر فعالیت لیپاز، و اندازه‌گیری جذب نوری آن در طول موج 405nm میزان بیان تخمین زده شد (۱۵) و مخمرهای تراریختی[14]که از نظر تست pNPP مثبت شده بودند برای تولید لیپاز نوترکیب در محیط کشت بیانی مخمر کشت داده شدند و بیان لیپاز نوترکیب توسط روش SDS-PGE بررسی شد.

نتایج وبحث

ژن لیپاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با روش PCR تکثیر ودر پلاسمید PGEM5Zf کلون شد (شکل۱)، پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیپاز بعد از برش با آنزیم های *Bam*HI و *Eco*RI، دو باند حدود ۳۰۰۰ جفت باز مربوط به پلاسمید pGEM5Zf و ۶۴۸ جفت باز مربوط به ژن لیپاز نشان داد (شکل ۲).

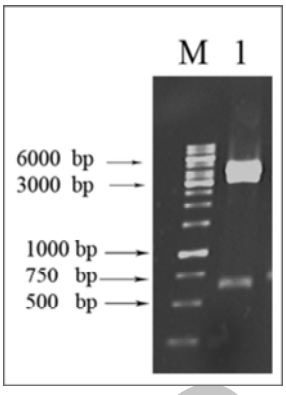
همچنین صحت همسانه سازی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیپاز با روشPCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. این نتایج صحت کلون‌سازی ژن لیپاز در حامل پلاسمیدی را تأیید می‌کند. ژن لیپاز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و روش PCR تکثیر و در پلاسمید pPIC9 همسانه سازی شد، پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیپاز بعد از برش با آنزیم های *Bam*HI و *Eco*RI از نظر صحت همسانه سازی با روش هضم آنزیمی و PCR و توالی یابی تأیید شد(شکل۳). خروج قطعه ۸۰۰۰ جفت بازی مربوط به پلاسمید pPIC9 و قطعه ۶۴۸ جفت بازی صحت همسانه سازی ژن لیپاز را در پلاسمید نوترکیب pLSPIC را تایید می کند. جهت تأیید بیشتر PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و پلاسمید pLSPIC به عنوان الگو نیز انجام شد در ضمن پلاسمید نوترکیب pLSPIC مورد نظر، توالی یابی شد و نتیجه توالی یابی نشان داد که ژن به درستی کلون شده است.



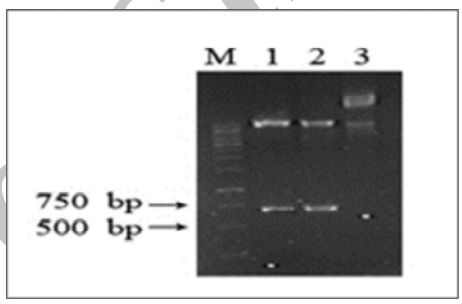
شکل ۱:تکثیر ژن لیپاز. ستون M : نشانگر وزن مولکولی DNA (۱Kb DNA ladder Fermentas)، ستون ۱: محصول PCR ژن تکثیر شده.

12. Electroporation
13. p-nitrophenyl palmitate (pNPP)
14. Transformants.

www.SID.ir



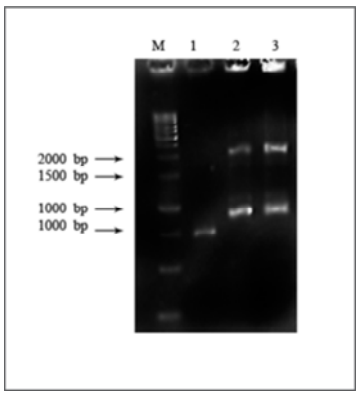
شکل ۲: الکتروفورز تایید صحت کلونینگ ژن لیپاز در پلاسمید PGEM۵Zf با برش آنزیمی. ستون M : نشانگر وزن مولکولی DNA (۱Kb DNA ladder Fermentas)، ستون ۱ : محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های BamHI و EcoRI.



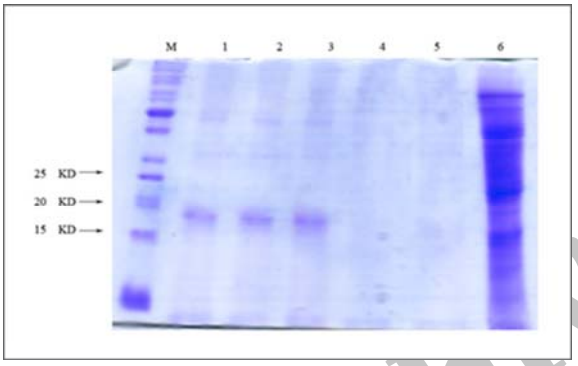
شکل ۳: الکتروفورز تأیید صحت کلونینگ ژن لیپاز در وکتور pPIC۹ با برش آنزیمی. ستون M : نشانگر وزن مولکولی DNA (۱Kb DNA ladder Fermentas)، ستون ۱و۲ : محصول برش آنزیمی حامل pPIC۹ حاوی ژن لیپاز، ستون ۳ : پلاسمید برش نخورده.

با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمیدهای نوترکیب به درون ژنوم مخمر انتقال[15] داده شدند. سپس وجود ژن لیپاز در ژنوم مخمر پیکیا پاستوریس با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی OX1 تایید شد (شکل۴). کلون های حاوی ژن لیپاز از نظر بیان ژن لیپاز با روش pNPP و SDS-PGE بررسی شد و نتایج نشان دهنده بیان ژن لیپاز به صورت ترشحی در مخمر پیکیا پاستوریس بود که یک باند ۱۹ کیلودالتونی نسبت به کنترل منفی دیده شد که نشان دهنده حذف سیگنال پپتید از پروتئین موردنظر می باشد و بیان لیپاز به صورت ترشحی بود (شکل۵). با توجه به این که سلول های نوترکیب ایجاده شده بر اثر نوترکیبی همولوگ ایجاد می‌شوند، به دلیل تنوع در محل ورود ژن در ژنوم، بازآرایی ژنتیکی و گوناگونی از لحاظ تعداد نسخه‌های ژن که وارد ژنوم شده، ممکن است کلنی‌های مختلف از لحاظ بیان با هم متفاوت باشند (۱۶). بنابراین برای دست‌یابی به کلنی با بیان بیشتر و بهتر بایستی تعداد زیادی کلون از لحاظ بیان بررسی شوند.

بنابراین برای دست‌یابی به کلنی با بیان بیشتر و بهتر بایستی تعداد



شکل ۴: الکتروفورز بررسی وارد شدن پلاسمیدهای نوترکیب به داخل ژنوم مخمر. ستون M : نشانگر وزن مولکولی DNA (۱Kb DNA ladder Fermentas)، ستون ۱: ژن لیپاز تکثیر شده با پرایمر های اختصاصی خود ژن لیپاز.ستون ۲ و۳ : محصول PCR کلون نوترکیب حاوی ژن لیپاز با آغازگرهای اختصاصی مخمر(AOX۱) که نشان دهنده وارد شدن ژن لیپاز به ژنوم مخمر می‌باشد.



شکل ۵: بررسی بیان لیپاز نوترکیب بر روی ژل SDS-PAGE. ستون M : نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون۱و۲ و ۳ : نمونه لیپاز نوترکیب تولیدشده در محیط کشت تحت پروموتر AOX۱. ستون ۴و۵ : نمونه‌های کنترل منفی، ستون ۶: نمونه‌ای پروتئین های داخل سلولی مخمر برای نشان دادن اینکه بیان داخل سلولی لیپاز دیده نمی شود.

زیادی کلون از لحاظ بیان بررسی شوند. از آزمایش کیفی، حساس، ساده و سریع پارانیتروفنیل پالمیتات(pNPP) استفاده و بیان لیپاز تخمین زده شد. مطالعه حدود ۴۰ کلنی از مخمرهای تراریخت نشان داد که که حدود ۲۵ کلون از آنها بیان کننده لیپاز نوترکیب هستند و باعث تغییر رنگ در آزمایش کیفی پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) می‌شوند. همچنین بیان پروتئین مورد تحقیق با استفاده از SDS-PGE بعد از رسوب دادن محلول رویی محیط کشت، نشان داده شد و بیان پروتئین لیپاز مورد تأیید واقع شد.

به دلیل ترشح لیپاز به درون محیط کشت و همچنین نشان دادن

15. Transform

Archive of SID
www.SID.ir

وتأییـد فعالیت لیپاز نوترکیب، سـیگنال پپتیـد طبیعی پروتئین لیپاز کـه منشـاء باسیلوسـی و باکتریایـی دارد در مخمر پیکیا پاسـتوریس قـادر بـه پروتئولیز انتخابی می باشـد زیـرا در انـدازه نهایی لیپاز بر روی ژل SDS-PGE تغییـر بـه اندازه سـیگنال پپتید ایجاد شـده بود به ایـن معنـا کـه انـدازه لیپـازی کـه بـر روی ژل دیـده مـی شـد اندازه لیپـاز بدون سـیگنال پپتید بود و همچنین تاخوردگـی پروتئین لیپاز باسیلوسـی کـه بتوانـد فالیـت لیپـازی انجـام دهـد در مخمـر پیکیا پاسـتوریس نیـز بـه راحتـی انجـام مـی شـود زیـرا پروتئینـی دارای فعالیـت مـی باشـد کـه تاخوردگـی صحیحـی در آن اتفـاق بیافتد و لیپازی مورد تحقیق تولید شده توسط مخمر نوترکیب نیز دارای فعالیت لیپـازی بـود بنابراین تاخوردگی به صـورت صحیح اتفاق افتاده اسـت و در واقع قابلیت های مخمر پیکیا پاسـتوریس را برای بیان پروتئین های نوترکیـب با منشـاء متفـاوت را تأیید می کنـد. در پایان بـا توجه به این که این آنزیم در کشـورمان تولید نمیشـود و هزینه های هنگفتی صرف وارد کردن آن ازسـایر کشـورها میشـود. لذا نتایج این تحقیق میتواند در راسـتای تولید دانش فنی برای تولید در مقیاس صنعتی اسـتفاده شود و بـه کاربرد آنزیم در صنایع مختلف کمك شـایانی نماید.

تشکرات

بودجه پژوهشـی این پروژه توسـط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیسـت فناوری تأمین شده بود.

منـابع/ References

1. Treichel H, Oliveira D de, Mazutti MA, Luccio MD, Oliveira JV. A Review on Microbial Lipases Production. Food Bioprocess Technol. 2010 Apr 1;3(2):182–96.
2. Gupta N, Sahai V, Gupta R. Statistical medium optimization and production alkaline lipase from a novel strain "Burkholderia multivorans" in a bioreactor. Process Biochemistry. 2007;42(4):518–26.
3. Park H, Lee K-S, Chi Y-M, Jeong S-W. Effects of methanol on the catalytic properties of porcine pancreatic lipase. Journal of microbiology and biotechnology. 2005 15(2):296–301.
4. Franken LPG, Marcon NS, Treichel H, et al. Effect of Treatment with Compressed Propane on Lipases Hydrolytic Activity. Food Bioprocess Technol. 2010 Aug 1;3(4):511–20.
5. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol. 1999;53:315–51.
6. Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochem. J. 1999 Oct 1;343 Pt 1:177–83.
7. Heravi KM, Yakhchali B, Eftekhar F, Vafadar-Isfahani B, Ghomi HH, Ahmadi-Danesh H. Molecular Cloning and Characterization of a Lipase from an Indigenous Bacillus pumilus. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. 2009;20(3):213–20.
8. Brocca S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD, Lotti M, Alberghina L. Design, total synthesis, and functional overexpression of the Candida rugosa lipl gene coding for a major industrial lipase. Protein science. 2008;7(6):1415–22.
9. Higgins DR. Overview of Protein Expression in Pichia pastoris. 2011 Oct 29 [cited 2011 Oct 29]; Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471140864.ps0507s02/abstract
10. Tolner B, Smith L, Begent RHJ, Chester KA. Production of recombinant protein in Pichia pastoris by fermentation. Nat. Protocols. 2006;1(2):1006–21.
11. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEMS microbiology reviews. 2006;24(1):45–66.
12. Sambrook, J. and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001
13. Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 2005 Apr;18(2):119–38.
14. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast. 2005;22(4):249–70.
15. Cho AR, Yoo SK, Kim EJ. Cloning, sequencing and expression in Escherichia coli of a thermophilic lipase from Bacillus thermoleovorans ID-1. FEMS microbiology letters. 2000;186(2):235–8.
16. Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T. Expression in the yeast Pichia pastoris. Meth. Enzymol. 2009;463:169–89.

Archive of SID

www.SID.ir