

## Isolation, Molecular Cloning, and Expression of *yyxA* Serine Protease Gene Extracted from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*

**Zahra Aghaei Jeshvaghani** 

PhD student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Gazvin, Iran. E-mail: zahra.aghae@edu.ikiu.ac.ir

**Ramin Hosseini** 

\*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Gazvin, Iran. E-mail: r.hosseini@ikiu.ac.ir

---

### **Abstract**

#### **Objective**

Proteases are among the most important industrial enzymes. Microbial proteases, especially from *Bacillus* sp., are most widely exploited industrially. The aim of this study was isolation, cloning, sequencing, expression, and bioinformatics study of *yyxA* serine protease gene extracted from *Bacillus licheniformis*.

#### **Materials and methods**

In this study, after extraction of bacterial DNA, the *yyxA* serine protease gene was isolated from *Bacillus licheniformis* using the polymerase chain reaction technique and cloned into the pTG19-T vector. The molecular structure, its biochemical and phylogenetic properties were investigated. The three-dimensional structure of the cloned enzyme was predicted using the I-TASSER, PHYRE2, RAPTORX, and Modeller tools. Confirmation of *yyxA* gene expression was performed by SDS-PAGE and dot blot analysis.

#### **Results**

Cloning was confirmed by sequencing. Based on the results of phylogenetic studies, the obtained protein sequence showed high similarity to the sequences of other *Bacillus* species, such as *B. subtilis*, *B. gobiensis*, and *B. pumilus*. After evaluating the drawn models, it was found that the models provided by PHYRE2 and I-TASSER software were desirable ones for predicting the

three-dimensional structure of this protease. Recombinant protein production was successfully induced by IPTG induction in the host containing the plasmid pET28a-yyxA. Optimization of recombinant protein production was investigated. The highest expression values were obtained at 37 ° C for 4 hours with one mM IPTG.

### Conclusions

The nucleotide sequence of the *yyxA* gene is 1212 nucleotides long, encoding a protein with 403 amino acids. Studies have shown that the enzyme encoded by this gene is in the category of stable enzyme and will be expressed in solution in *Escherichia coli*. These advantages make the enzyme as a suitable candidate for use in industry.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, Expression recombinant protein, Molecular cloning, Modeling protein, serine protease.

**Paper Type:** Research Paper.

**Citation:** Aghaei Jeshvaghani Z, Hosseini R (2021) Isolation, molecular cloning, and expression of *yyxA* serine protease gene extracted from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 35-54.

---

*Agricultural Biotechnology Journal* 13 (4), 35-54

DOI: 10.22103/jab.2021.17638.1320

Received: September 18, 2021.

Accepted: October 12, 2021.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

## جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن سرین پروتئاز *yyxA* استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* در باکتری *Escherichia coli*

زهرا آقایی جشقانی 

دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران  
zahra.aghae@edu.ikiu.ac.ir

رامین حسینی 

\* دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران  
r.hosseini@ikiu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۷

### چکیده

**هدف:** پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شوند. معمولاً برای تولید این آنزیم‌ها برای مصارف صنعتی از باکتری‌های متعلق به جنس باسیلوس استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش جداسازی، همسانه‌سازی، تعیین توالی، بیان و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *yyxA* استخراج شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، پس از استخراج DNA باکتریایی، ژن سرین پروتئاز با نام *yyxA* از باکتری *Bacillus licheniformis* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جداسازی و در ناقل pTG19-T و سپس ناقل pET28a همسانه‌سازی شدند و ساختار مولکولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. ساختار سه بعدی آنزیم همسانه‌سازی شده با استفاده از ابزارهای PHYRE2، RAPTORX، I-TASSER و Modeller پیش‌بینی شد. تأیید بیان ژن *yyxA* توسط آنالیز SDS-PAGE و دات بلاتینگ انجام شد.

**نتایج:** درستی همسانه‌سازی به وسیله توالی‌یابی تأیید شد. تولید پروتئین نوترکیب با القاء IPTG به میزان حاوی پلاسمید pET28a-*yyxA* با موفقیت انجام شد. بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقادیر بیان در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و طی زمان ۴ ساعت و با IPTG یک میلی‌مولار به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی‌های فیلوژنتیکی، توالی پروتئینی به دست آمده شباهت زیادی را با توالی‌های سایر باسیلوس‌ها از قبیل *B. subtilis*، *B. gobiensis* و *B. pumilus*

نشان دادند. پس از ارزیابی مدل‌های ترسیم شده مشخص گردید که مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار I-TASSER و PHYRE2 مدل‌های مطلوبی برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی این پروتئاز هستند.

**نتیجه‌گیری:** توالی نوکلئوتیدی ژن *yyxA* به طول ۱۲۱۲ نوکلئوتید بوده که پروتئینی با ۴۰۳ آمینواسید را رمز می‌کند. بررسی‌ها نشان داد که آنزیم کد شونده توسط این ژن در دسته آنزیم‌های پایدار قرار گرفته و در باکتری اشریشیاکلاهی به صورت محلول بیان خواهد شد که این مزایا موجب می‌شود که آنزیم مذکور به عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنعت در نظر گرفته شوند.

**کلیدواژه‌ها:** باسیلوس لیکنی فورمیس، بیان پروتئین نو ترکیب، سرین پروتئاز، مدل‌سازی پروتئین، همسانه‌سازی مولکولی

**نوع مقاله:** پژوهشی.

**استناد:** آقایی جشوقانی زهرا، حسینی رامین (۱۴۰۰) جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن سرین پروتئاز *yyxA* استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* در باکتری *Escherichia coli*. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۳(۴)، ۵۴-۳۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

## مقدمه

امروزه آنزیم‌های میکروبی کاربردهای فراوانی در صنایع مختلف دارند و در این میان پروتئازها ۶۰ درصد از فروش آنزیم‌های دنیا را به خود اختصاص داده‌اند (Gupta et al 2002; Nascimento et al. 2004). از این آنزیم‌ها در تولید مواد شوینده، مواد غذایی، کالاهای چرمی، تیمار و تجزیه فاضلاب و منسوجات استفاده می‌شود (Pastor et al. 2001). همچنین مطالعاتی در رابطه با تأثیر پروتئازها بر روی آفات متعدد محصولات کشاورزی از جمله نماتدها و قارچ‌ها انجام شده است (Siddiqui et al. 2005; Ward et al. 2012; Guleria et al. 2016). پروتئازها به طور گسترده در صنعت داروسازی برای تهیه مواد دارویی نظیر پمادهایی برای بهبود زخم‌ها و تولید ترکیبات الیگوپپتیدی مختلف با اهداف دارویی استفاده می‌شوند. همچنین این آنزیم‌ها برای برداشتن انگل‌های دستگاه گوارش، برداشت و حذف پوست مرده در بیماران دارای سوختگی نیز کاربرد دارند. دو سوم از پروتئازهای تولیدی، در صنایع شوینده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Gupta et al. 2002).

پروتئازهایی که از خصوصیات مطلوبی مانند پایداری حرارتی، عدم وابستگی به یون‌های فلزی، فعالیت در طیف وسیعی از pH و پایداری در برابر سورفکتانت‌ها و حلال‌های آلی برخوردار باشند؛ می‌توانند در صنایع مربوطه مورد استفاده قرار گیرند (Manachini and Fortina 1998). نیاز صنایع به چنین پروتئازهایی، جستجو را برای یافتن ریزسازواره‌های جدید و جداسازی و خالص نمودن

پروتئازهای جدید در سراسر دنیا افزایش داده است. در میان پروتئازهای میکروبی که شامل انواع باکتریایی، قارچی و ویروسی می‌باشند؛ پروتئازهای باکتریایی از لحاظ صنعتی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند و از آنجایی که باکتری *Bacillus licheniformis* توانایی و ظرفیت بالایی برای ترشح پروتئین دارد؛ برای تولید آنزیم‌های متعدد طبیعی و نوترکیب مورد استفاده قرار گرفته است (Borgmeier et al. 2012; Wiegand et al. 2013). علاوه بر این از آنجایی که از اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017) و بیان تمامی ژن‌ها در آن واحد در سلول رخ نمی‌دهد و برخی از ژن‌ها چه در پروکاریوت‌ها و چه در یوکاریوت‌ها در برخی از مراحل نمو و شرایط رشدی خاموش می‌مانند (Tohidi nezhad et al. 2015; Mohammadabadi et al. 2018; Ahsani et al. 2019a; Ahsani et al. 2019b Mohammadabadi 2020; Mohammadabadi 2021) لازم است که بیان ژن‌ها در شرایط مختلف مورد بررسی و پیمایش نیز قرار گیرد (Jafari et al. 2016).

در میان پروتئازها، کاربرد سرین پروتئازها به دلیل این که در pH قلیایی فعال بوده و محدوده وسیعی از مواد را به عنوان پیش‌ماده مورد استفاده قرار می‌دهند؛ بیش از سایر پروتئازها می‌باشد (Rani et al. 2012). از این رو، مطالعات بسیار زیادی در مورد این آنزیم‌ها صورت گرفته است (Çalık et al. 2001) و سرین پروتئازهای قلیایی توسط بسیاری از گونه‌های باسیلوس مانند *B. pumilus* و *B. licheniformis* تولید شده و در صنایع غذایی و شوینده به طور عمده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ward and Fogarty 1983). خصوصیات مربوط به بسیاری از پروتئازهای جنس باسیلوس شناسایی شده و ژن مرتبط با آن‌ها همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردیده است (Kaur et al. 2012; Hadjidj et al. 2018; Yao et al. 2018; Suberu et al. 2020). در پژوهشی (Joshi et al. 2013) پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز متعلق به *B. lehensis* در ناقل pGM-T، بیان این ژن را در ناقل بیانی مورد مطالعه قرار داده‌اند (Joshi et al. 2013). همچنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردیده است که ژن پروتئاز متعلق به *B. subtilis* که در باکتری *Escherichia coli* بیان شده است، دارای پایداری حرارتی و pH بوده و به عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنعت مطرح است (Suberu et al. 2019). در مطالعه‌ای دیگر پس از همسانه‌سازی و بیان ژن *epr* متعلق به *B. licheniformis* مشخص گردید که گرچه جرم مولکولی پروتئین نوترکیب تولیدی ۵۵ کیلودالتون است اما این پروتئین فرم فعال آنزیم نبوده و نیازمند یک هضم آنزیمی برای فعال شدن است (Ageitos et al. 2013). همچنین علاوه بر همسانه‌سازی و بیان پروتئازهای متعلق به باسیلوس‌ها در باکتری *E. coli*، مطالعاتی در زمینه همسانه‌سازی و بیان این ژن‌ها در باکتری *B. subtilis* نیز صورت گرفته است که به عنوان نمونه Tekin et al. پس از بیان هترولوگ ژن آلکالین سرین پروتئاز *B. halodurans* C-125 درون باکتری *B. subtilis* WB800 و مشاهده خصوصیات مطلوب پروتئین نوترکیب تولیدی پیشنهاد کرده‌اند که از این پروتئین در صنایع استفاده گردد (Tekin et al. 2020). در پژوهشی دیگر، پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز *B. licheniformis* در باکتری *B. subtilis* WB600، افزایش ۶۵ درصد تولید

پروتئین نوترکیب نسبت به سویه اصلی گزارش شده است (Tang et al. 2004). در یک بررسی محققان با انتقال ژن آلکالین پروتئاز از *B. alcalophilus* به *B. subtilis* افزایش بیان ۵۰ درصدی نسبت به سویه وحشی را گزارش کرده‌اند (Van der Laan et al. 1991). در پژوهشی (Çalik et al. 2003) نیز با انتقال ژن آلکالین پروتئاز از *B. licheniformis* به *B. licheniformis* موفق به بیش بیان این ژن در این باکتری شده‌اند (Çalik et al. 2003). با وجود مطالعات گسترده صورت گرفته روی پروتئازهای *B. licheniformis* هیچ گونه مطالعه‌ای روی ژن *yyxA* متعلق به باکتری *B. licheniformis* صورت نگرفته است.

از آنجایی که توالی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌ها با ساختار و عملکرد آن‌ها رابطه مستقیمی دارد؛ بنابراین آگاهی از توالی ژن برای استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک به منظور همسانه‌سازی در سایر میزبان‌ها و در نتیجه بالا بردن تولید آنزیم و بهینه‌سازی آن نقش بسزایی دارد و لذا هدف از این مطالعه، جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن سرین پروتئاز از باکتری *B. licheniformis* تحت عنوان *yyxA* می‌باشد تا ضمن شناسایی توالی و عملکرد آنزیم مورد مطالعه، در پژوهش‌های آتی بتوان از آن‌ها در جهت تکامل پروتئازهایی با اهداف خاص تجاری استفاده نمود.

## مواد و روش‌ها

**تهیه نمونه میکروبی:** باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC۱۷۲۱ به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (<http://ptcc.iroast.org>) دریافت شد و بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت گردید.

**طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر و جداسازی ژن سرین پروتئاز:** برای طراحی آغازگرها از نرم‌افزار Oligo ۷ استفاده شد. به منظور جداسازی ژن سرین پروتئاز با مراجعه به پایگاه (National Center for Biotechnology Information) NCBI توالی مربوطه با شماره دسترسی NC\_006322، ۱ استخراج و سپس با کمک نرم‌افزار Primer Blast، بررسی گردید. در طراحی آغازگر جایگاه برشی آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI به ترتیب در ابتدای آغازگر رفت و برگشت قرار گرفت. به منظور تسهیل اتصال DNA پلیمرز در زمان تکثیر، به ابتدای آغازگرها توالی‌هایی اضافه شد (جدول ۱). توالی آغازگرهای طراحی شده، جهت سنتز به شرکت Metabion آلمان ارسال گردید.

**استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده:** طبق روش بیان شده توسط Cheng and Jiang، DNA ژنومی استخراج گردید (Cheng and Jiang 2006) و پس از آن جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ درصد استفاده گردید.

## جدول ۱. آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر

Table 1. Primers used in the present study

Primer name	نام آغازگر	Primer sequence	توالی آغازگر
yyxA1212F		ATAGGATCCATGGAGTTTAATCATGATGAGG	
yyxA1212R		CTCGAATTCACCTTATCAGCTTCCTAATTG	

تکثیر ژن *yyxA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): واکنش PCR با استفاده از (*Pfu* (Fermentas)

DNA polymerase و آغازگرها برای ۳۵ سیکل انجام شد. مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه انجام شد. شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۸ درجه به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

## مراحل همسانه‌سازی و بیان: خالص‌سازی محصول PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل، با استفاده از کیت استخراج

اسید نوکلئیک Bioneer (K-3035-1) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. واکنش اتصال میان ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pTG19-T با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Takara) به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Sambrook and Russell 2001). با استفاده از روش شوک حرارتی محصول اتصال به سلول‌های مستعد اشریشیا کلاهی (*Escherichia coli*) سویه DH5 $\alpha$  انتقال داده شد (Cohen et al. 1972). به منظور انتخاب کلنی‌های مثبت، باکتری‌ها روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  IPTG و X-gal کشت داده شدند و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب شدند. استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی انجام شد (Birnboim and Doly 1979) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI مورد بررسی قرار گرفتند. پلاسمید حاوی قطعه نوترکیب توسط شرکت Bioneer کره جنوبی و با استفاده از آغازگر راه انداز باکتروفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توالی‌یابی گردید. همچنین پس از برش آنزیمی پلاسمیدهای *yyxA* و pTG19-T و pET28a به صورت جداگانه با دو آنزیم *Bam*HI و *Eco*RI و خالص‌سازی ژن *yyxA* و پلاسمید pET28a برش‌یافته از روی ژل، همسانه‌سازی ژن *yyxA* در درون پلاسمید pET28a به وسیله واکنش اتصال انجام گرفت و پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه (DE3) BL21 منتقل گردید (Cohen et al. 1972). پس از تأیید کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب با استفاده از PCR، هضم آنزیمی و توالی‌یابی، کلنی نوترکیب مورد نظر به ۱۰ میلی‌لیتر LB مایع حاوی ۵۰  $\mu\text{g/ml}$  کانامایسین تلقیح شد و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷°C با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۵۰ میلی‌لیتر LB افزوده شد

و تا رسیدن به OD ۰/۶ در انکوباتور قرار داده شد. بیان ژن سرین پروتئاز در میزبان باکتریایی در شرایط مختلف دمایی (۱۶، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس) و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی‌مولار IPTG و در زمان‌های صفر، ۲ و ۴ ساعت پس از افزودن القاکننده مورد بررسی قرار گرفت و جهت بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب بر روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد بارگذاری گردید. باکتری‌های القا شده در شرایط مختلف، در ۷۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و رسوب باکتری‌ها در بافر TE (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl و ۱ میلی‌مولار EDTA هر دو با pH ۸) حل شد و باکتری‌ها توسط امواج فراصوت لیز گردیدند. سونیکاسیون شامل پنج مرحله سه دقیقه‌ای با سه دقیقه فاصله بین هر مرحله و بر روی یخ انجام شد.

#### آنالیز دات بلا‌تینگ: به منظور تأیید بیان پروتئین هترولوگ از تکنیک دات بلات و آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی (محصول

شرکت Biolegend آمریکا) استفاده شد. در این پژوهش آنتی‌بادی علیه IgG موش نشاندار با پراکسیداز ساخت شرکت Bio-Rad به عنوان آنتی‌بادی دوم مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت در حضور پراکسید هیدروژن و سوپسترای به نام Diaminobenzidine (DAB)، در محل کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی بر روی غشا وجود لکه‌های قهوه‌ای رنگ مورد بررسی قرار گرفت.

#### بررسی توالی اسید آمینه‌ای و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین Q65CS2: با استفاده از برنامه

Translate توالی نوکلئوتیدی حاصل از فرایند توالی‌یابی مورد ترجمه قرار گرفت و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam، ProtScale، TMHMM و Signalp موجود در تارنمای (<https://www.expasy.org/proteomics>) بررسی شد. توالی‌های حفاظت شده و دومین‌های موجود در این پروتئین توسط برنامه‌های ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite>)، supfam (<http://supfam.org>) و Pfam (<http://pfam.xfam.org>) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل پروتئاز مورد مطالعه با سایر پروتئازها با استفاده از بانک اطلاعاتی MEROPS انجام شد (Rawlings et al. 2008). در ادامه توالی اسیدآمینه به دست آمده از Translate به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST مورد جستجو قرار گرفت و توالی‌هایی با بیشترین شباهت، انتخاب و برای هم‌مدیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) ویرایش ۵/۲ و با استفاده از ماتریس‌های تشابه گوناگون ترسیم گردید. درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌های ایجاد شده با Bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد (Felsenstein 1985; Tamura et al. 2007).

#### پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم: برای پیش‌بینی ساختارهای دوم و سوم پروتئین از برنامه‌های SOPMA

(Geourjion and Deleage 1995)، PHYRE2، PyMOL موجود در تارنمای (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)، موجود در تارنمای



و (<https://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER>) I-TASSER (<https://www.pymol.org>) و RAPTORX (<http://raptorx.uchicago.edu>) استفاده گردید. همچنین ساختار سوم پروتئین مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Modeller 9v16 (Sali and Blundell 1993) به روش چند الگویی مدل سازی شد. برای تخمین کیفیت مدل های پیش بینی شده توسط I-TASSER از امتیاز C (C-score) استفاده گردید. نمودار رامانچاندران به منظور ارزیابی کیفیت پارامترهای ساختاری مدل های پیش بینی شده به کمک نرم افزاری به نام procheck موجود در تارنمای (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES>) ترسیم شد و در ادامه نیز Q-mean score (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) و Z-score (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) مدل ها محاسبه گردید (Benkert et al. 2009).

## جدول ۲. توالی های پروتئینی مورد استفاده برای ساخت درخت فیلوژنتیکی ژن *yyxA*

**Table 2. Protein sequences used for phylogenetic tree construction *yyxA* gene**

درصد تشابه	شماره دسترسی	نام اختصاصی	نام اختصاصی ژن	جنس و گونه	ردیف
پروتئین	Accession number	پروتئین	Specific name of the gene	Species name	Number
Protein		Specific name of the protein			
%identity					
100	NC_006322.1	Q65CS2	<i>YyxA</i>	<i>B. licheniformis</i>	1
68.8	NZ_CP012600.1	A0A0M4FTT5	AM592_17555	<i>B. gobiensis</i>	2
68.1	NZ_VEIS01000011.1	A8FJB1	BPUM_3684	<i>B. pumilus</i>	3
64.1	OAS83115.1	A0A179SN19	A6K24_10855	<i>B. litoralis</i>	4
62.2	NZ_JNVC02000013.1	A0A084GNI5	GS18_0215870	<i>B. indicus</i>	5
59.9	NZ_CP016020.1	A0A1L3MXY7	A9C19_20155	<i>B. weihaiensis</i>	6
59.5	NZ_QURG01000030.1	A0A165Y0I0	AZI98_08070	<i>Aeribacillus pallidus</i>	7
61.4	NZ_AJLR01000036.1	K6DK45	BAZO_02886	<i>B. azotoformans</i>	8
56.7	SLUL01000000	A0A4R1QIK8	EDD69_10238	<i>Thermolongibacillus altinsuensis</i>	9
56.9	SLVV01000000	A0A4R2BCF8	EV146_10844	<i>B. foraminis</i>	10
57.3	RZTZ01000000	A0A437K9H0	EM808_13985	<i>B. taxi</i>	11
59	LJAJ01000000	A0A0N0Z2Q8	<i>htrA_3</i>	<i>Geobacillus sp.</i>	12
54.7	NC_011567	B7GMT5	Aflv_2834	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	13
54.2	NZ_BASE01000029	A0A0A8X1Y0	SAMD00020551_1407	<i>B. selenatarsenatis</i>	14
53.5	A0A1X7G729	A0A1X7G729	B1B01_21595	<i>B. filamentosus</i>	15

## نتایج و بحث

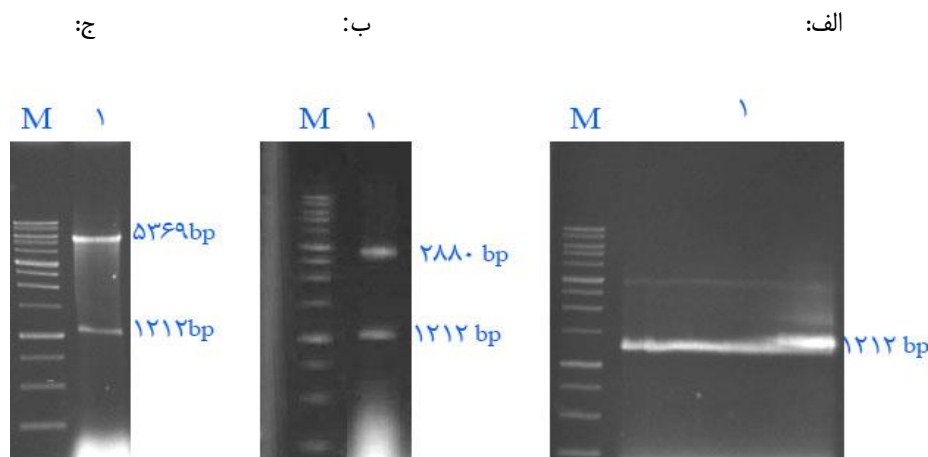
جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی آمینواسیدی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین به دست آمده: پس از استخراج DNA باکتریایی، ژن رمزکننده *yyxA* در ناقل پلاسمیدی pTG19-T همسانه‌سازی شد. فرایند همسانه‌سازی با انجام آزمون‌های PCR و هضم آنزیمی با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱ الف و ب)، هم‌چنین نتایج توالی‌یابی DNA صحت همسانه‌سازی را مورد تأیید قرار داد.

پلاسمیدهای pTG-*yyxA* و pET28a(+) به صورت جداگانه با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* برش یافتند و ژن *yyxA* در ناقل خطی شده pET28a(+) الحاق گردید. سپس پلاسمید نو ترکیب PET28a-*yyxA* به باکتری *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  انتقال داده شد و با هضم آنزیمی با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* و توالی‌یابی حضور ژن و استقرار آن به درستی تأیید گردید (شکل ۱-ج).

برای تولید پروتئین نو ترکیب، پلاسمیدهای pET28-*yyxA* و pET28a(+) فاقد ژن به صورت جداگانه به میزبان بیانی *E. coli* سویه BL21 (DE3) انتقال داده شدند. پروتئین بیان شده توسط ژن *yyxA* با نام Q65CS2 شناخته می‌شود. وزن مولکولی پروتئین Q65CS2 و His-Q65CS2 به ترتیب ۴۳/۲۰ و ۴۶/۷۸ کیلودالتون پیش‌بینی شد. وجود باند پروتئینی واضح در محدوده ۴۵ کیلودالتون بر روی ژل SDS-PAGE ۴ ساعت پس از افزودن IPTG (با غلظت یک میلی‌مولار) بیانگر تولید موفق پروتئین نو ترکیب بود (شکل ۳). گرچه وزن مولکولی آنزیم تولیدی در محدوده وزن مولکولی اغلب سرین پروتئازها قرار ندارد اما نزدیک به وزن مولکولی گزارش شده برای آلکالین پروتئاز *B. circulans* MTCC 7906 و پروتئین بیان شده توسط ژن *epr* متعلق به *B. licheniformis* است (Kaur et al. 2012; Ageitos et al. 2013). به منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نو ترکیب آزمایش‌های مختلفی طراحی گردید و در آن‌ها بیان پروتئین در دماهای مختلف (۱۶، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس) و غلظت‌های مختلف IPTG (یک دهم، نیم و یک میلی‌مولار) مورد سنجش قرار گرفت و نمونه‌های بیانی ۰، ۲ و ۴ ساعت پس از القای IPTG جمع‌آوری گردیدند. بیشترین میزان بیان پروتئین در دمای ۳۷°C و ۴ ساعت پس از القای IPTG با غلظت یک میلی‌مولار مشاهده گردید (شکل ۲). نتایج دات بلات در تصویر شماره ۳ قابل مشاهده است. ردیف دوم، حاصل واکنش میان آنتی‌بادی با پروتئین نو ترکیب محلول است که به صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ مشاهده می‌شود و نشان‌دهنده صحت بیان پروتئین نو ترکیب است و این در حالی است که در ردیف اول (کنترل) لکه قهوه‌ای مشاهده نمی‌شود.

چارچوب بازخوانی DNA رمز کننده سرین پروتئاز *yyxA* ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی NC\_006322.1 به طول ۱۲۱۲ bp بوده که پروتئینی با ۴۰۳ آمینواسید را رمز می‌کند. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین رمز شده توسط *yyxA* با استفاده از برنامه ProtParam مورد بررسی قرار گرفت که وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک

برای این پروتئین به ترتیب ۴۳/۲۰ و ۵/۸۲ محاسبه شد که وزن مولکولی محاسبه شده در این پژوهش با وزن مولکولی گزارش شده مربوط به پروتئاز *B.subtilis* یکسان است (Subreu et al. 2019).



شکل ۱. الف) تکثیر ژن *yyxA* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (M) نشانگر اندازه مولکولی ۱ kb سیناکلون، ۱) نتیجه حاصل از تکثیر ژن *yyxA* به وسیله PCR در حجم بالا (ب) نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTG-*yyxA* (M) نشانگر اندازه مولکولی ۱) پلاسمیدهای نوترکیب pTG-*yyxA* هضم شده با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI* (ج) نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET28-*yyxA* (M) نشانگر اندازه مولکولی ۱ kb، ۱) پلاسمید نوترکیب pET28-*yyxA* هضم شده با دو آنزیم *EcoRI* و *BamHI*.

Figure 1. A) *yyxA* gene amplification using polymerase chain reaction M) molecular size marker 1 kb, 1) Result of amplification of *yyxA* gene by high volume PCR B) results of enzymatic digestion of recombinant plasmid pTG-*yyxA* M) molecular size marker 1 kb, 1) Digested recombinant plasmid pTG-*yyxA* with two enzymes *EcoRI* and *BamHI* C) Recombinant plasmid Pet28-*yyxA* M) molecular size marker 1 kb, 1) Digested recombinant plasmid pET28-*yyxA* with *EcoRI* and *BamHI*.

با توجه به این که شاخص ناپایداری پروتئین کد شده توسط *yyxA* ۳۳/۲۶ محاسبه شد؛ پروتئین مورد نظر در رسته پروتئین‌های پایدار قرار می‌گیرد (Gasteiger et al 2005). همچنین شاخص آلیفاتیک به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت برای پروتئین Q65CS2 ۹۸/۳۴ محاسبه گردید که به میزان این شاخص در مورد دو پروتئاز موجود در *B. anthracis* str. Sterne و پروتئاز موجود در *B. lehensis* نزدیک است (Banerjee et al. 2014; Sulaiman et al. 2017) و می‌توان پروتئین مورد مطالعه در این تحقیق را در گروه پروتئین‌های پایدار در برابر حرارت به شمار آورد (Ikai 1980).

مقدار GRAVY منفی پروتئین Q65CS2 (-۰/۱۵۶) نشان دهنده این است که پروتئین مذکور غیر قطبی است. نیمه عمر توالی مورد مطالعه در یاخته‌های پستانداران ۳۰ ساعت، در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و در *E. coli* بیش از ده ساعت پیش‌بینی گردید. با استفاده از شاخص Hydropathy محاسبه شده در برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolittle مشخص شد که سرین پروتئاز مورد مطالعه آب‌گریز بوده و از مجموع کل اسیدهای آمینه این پروتئین، ۴۶ اسید آمینه بار منفی داشتند؛ در حالی که تعداد کل اسید آمینه‌ها با بار مثبت ۴۲ بود (Kyte and Doolittle 1982). در طی بررسی انجام شده با استفاده از برنامه TMHMM در مورد پروتئین رمز شده توسط ژن *yyxA* دومین گذرنده از غشا و دومین خارج مشاهده گردید که به نظر می‌رسد پروتئین مذکور دارای خاصیت ترشحی باشد که با نتایج خانواده‌ایی که به آن تعلق دارد، مطابق است. براساس نتایج مشاهده شده در برنامه supfam پروتئین کد شده توسط *yyxA* متعلق به بالا خانواده Trypsin-like serine proteases می‌باشد. نتایج حاصل از برنامه Pfam نشان داد که توالی مربوط به پروتئین دارای دو دومین Trypsin\_2 و PDZ\_2 است. طبق برآورد برنامه ScanProsite پروتئین کد شده توسط ژن *yyxA*، دومین کاتالیتیکی PDZ در ناحیه آمینواسیدی بین ۲۹۴ تا ۳۸۷ واقع شده است. نتایج حاصل از بررسی پروتئین Q65CS2 (پروتئین بیان شده توسط ژن *yyxA*) در پایگاه داده MEROPS نشان داد که این پروتئین دارای دومین S01.364 می‌باشد. در پایگاه مذکور این آنزیم جز گروه اندوپپتیدزها و به عنوان نوعی کموترپسین A شناخته می‌شود. اعضای موجود در این خانواده عمدتاً دارای سیگنال پپتید در انتهای N خود هستند.

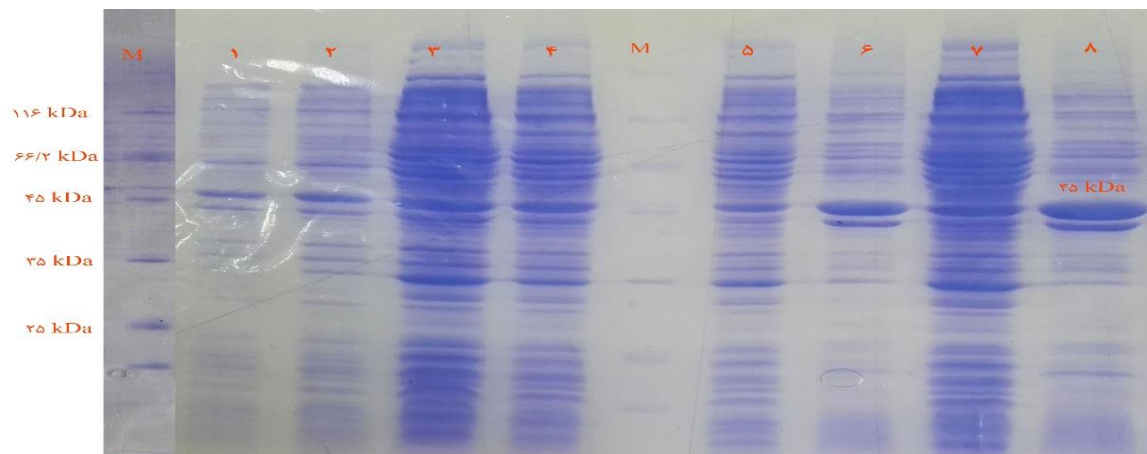
**بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی پروتئین Q65CS2 با سایر پروتئازها:** توالی پروتئینی به دست آمده از سرین پروتئاز *yyxA* با پروتئازهای موجودات دیگر مورد مقایسه قرار گرفت. پروتئین Q65CS2 بالاترین تشابه را با پروتئین‌های A0A0M4FTT5 موجود در *B. gobiensis*، A8FJB1 متعلق به *B. pumilus* و A0A179SN19 مربوط به *B. litoralis* به ترتیب به میزان ۶۸/۸، ۶۸/۱ و ۶۴/۱ درصد دارد. در تمامی توالی‌های ذکر شده در جدول ۲ توالی‌های (۱۹۶-۲۰۱) GNPLGL، (۲۱۰-۲۰۵) GSVTQG، (۲۳۷-۲۴۹) QTDAAINPGNSGG و (۲۶۶-۲۶۰) GINSMK حفاظت شده هستند. وجود سرین (به عنوان نوکلئوفیل)، آسپارتیک اسید (به عنوان الکتروفیل) و هستیدین در جایگاه فعال پروتئین مورد مطالعه مطابق با توالی همسان سه تایی در تمامی اعضای گروه سوبتلیزین‌ها و کموترپسین می‌باشد (Shimogaki et al. 1991). نکته حائز اهمیت دیگر نیز این است که مانند سایر کموترپسین‌ها گلایسین در این پروتئین نیز به صورت کاملاً حفاظت شده در کنار توالی همسان سه تایی قرار گرفته است و موتیف Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly را تشکیل داده است. بررسی فیلوژنتیکی توالی Q65CS2 با توالی‌های مربوط به پروتئازهای سایر موجودات با استفاده از نرم‌افزار Mega5.2 و به روش Neighbor Joining نشان داد که این پروتئین از نظر فیلوژنتیکی با پروتئازهای مربوط به *B. gobiensis*، *B. pumilus* و *B. subtilis* بیشترین شباهت را داشته و در یک گروه قرار می‌گیرند. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده شباهت بین پروتئازهای متعلق به جنس باسیلوس بیش از شباهت بین پروتئین‌های مورد مطالعه با پروتئازهای سایر موجودات است و این احتمالاً نشان دهنده این است که پروتئازهای جنس باسیلوس یک جد مشترک

دارند. در پژوهشی Sareen et al. (2005) نیز پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز *apr46* متعلق به *B. licheniformis* درخت فیلوژنتیکی مربوط به این ژن را رسم کرده‌اند. گرچه در درخت ترسیم شده توسط این محققان پروتئاز مربوط به *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 بیشترین شباهت را با پروتئاز مورد مطالعه نشان داده است؛ اما پروتئازهای مربوط به سایر باسیلوس‌ها نیز در نزدیکی پروتئاز مربوط به ژن *apr* قرار گرفته‌اند که نشان دهنده شباهت میان پروتئازهای مختلف جنس باسیلوس است (Sareen et al. 2005). گزارش‌های Takagi et al. نیز نشان می‌دهد که ۸۵ درصد همولوژی بین پروتئازهای مقاوم به حرارت باکتری‌های *B. stearothermophilus* و *B. thermoproteolyticus* و ۸۲ درصد همولوژی بین پروتئازهای پایدار در برابر حرارت باکتری‌های *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens* وجود دارد (Takagi and Takashi, 2003). تمامی این شواهد نظریه جد مشترک در بین پروتئازهای جنس باسیلوس را تقویت می‌کند.

### بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی پروتئین رمز شده توسط ژن *yyxA* طبق محاسبه برنامه SOPMA،

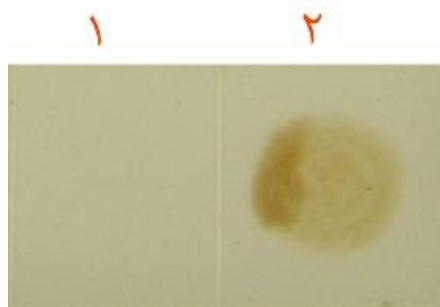
بیشترین ساختار دوم پروتئین Q65CS2 متعلق به ماریپیج تصادفی<sup>۱</sup> است که ۳۹/۸۱ درصد آمینوسیدها را شامل می‌شود. آلفا هلیکس و پیچ بتا نیز به ترتیب ۱۵/۹۹ و ۱۱/۲۹ درصد از ساختارهای این پروتئین را تشکیل می‌دهند. طبق برآورد نرم‌افزار PHYRE2 در پروتئین Q65CS2 ساختار صفحات بتا با فراوانی ۳۵ درصد بیشترین ساختار ثانویه را تشکیل می‌دهند و آلفاهلیکس تنها ۱۹ درصد از ساختار پروتئین مذکور را شامل می‌شود. پس از پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزارهای Modeller، I-TASSER، RAPTORX و این مدل‌ها با استفاده از نمودار رامچاندوران مورد ارزیابی قرار گرفتند. طبق برآورد نمودار رامچاندوران در مورد پروتئین رمز شونده توسط ژن *yyxA*، مدل ترسیمی به وسیله نرم‌افزار RAPTORX با دارا بودن ۹۰/۳ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب، مدل مناسب‌تری می‌باشد و مدل ارائه شده توسط PHYRE2 نیز با دارا بودن ۸۷/۴ از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب در مرتبه دوم قرار می‌گیرند. پس از ارزیابی شاخص Q-mean مربوط به مدل‌های ترسیم شده، مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار PHYRE2 با احتساب Q-mean برابر ۰/۶۲۱ با کیفیت‌ترین مدل برای پروتئین مذکور تشخیص داده شد که با بررسی Z-score مربوط به این مدل در مقایسه با سایر مدل‌ها نیز این نتیجه مورد تأیید قرار گرفت. همچنین مدل پیشنهادی توسط ابزار آنلاین RAPTORX نیز با داشتن Q-mean برابر ۰/۵۱۹ مدلی قابل قبول محسوب می‌شود. ساختارهای پیش‌گویی شده خروجی نرم‌افزارهای I-TASSER و PHYRE2 توسط نرم‌افزار Prosa به عنوان بهترین مدل‌ها انتخاب شدند. میزان Z-score برای این دو مدل به ترتیب با ۷/۲۵- و ۶/۶۸- محاسبه شد که در بازه امتیازاتی است که به طور معمول برای پروتئین‌هایی با اندازه‌های مشابه یافت می‌شود. لذا می‌توان نتیجه گرفت دو مدل ترسیم شده توسط PHYRE2 و I-TASSER مدل‌های قابل اعتمادی بوده و ساختارهای ترسیم شده به ساختارهای تجربی نزدیک است. از سویی دیگر در این دو مدل باقیمانده‌های اسیدهای آمینه نیز اکثراً از سطح انرژی منفی برخوردار هستند.

<sup>1</sup> Random coil



شکل ۲. آنالیز SDS-PAGE بیان پروتئین نوترکیب His- Q65CS2 تولید شده در باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3). ۱) پروتئین محلول استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a ۴ ساعت پس از القا با غلظت یک میلی مولار. ۲) پروتئین محلول استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a ۲ ساعت پس از القا با غلظت یک میلی مولار. ۳) پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a ۴ ساعت پس از القا با غلظت یک میلی مولار. ۴) پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a ۲ ساعت پس از القا با غلظت یک میلی مولار. M) نشانگر اندازه پروتئینی مربوط به شرکت سیتومتین ژن (۵-۱۱۶/۶ kDa). ۵) پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a زمان صفر. ۶) پروتئین محلول استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28-yyxA ۲ ساعت پس از القای با غلظت یک میلی مولار. ۷) پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28-yyxA زمان صفر. ۸) پروتئین محلول استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28-yyxA ۴ ساعت پس از القای با غلظت یک میلی مولار

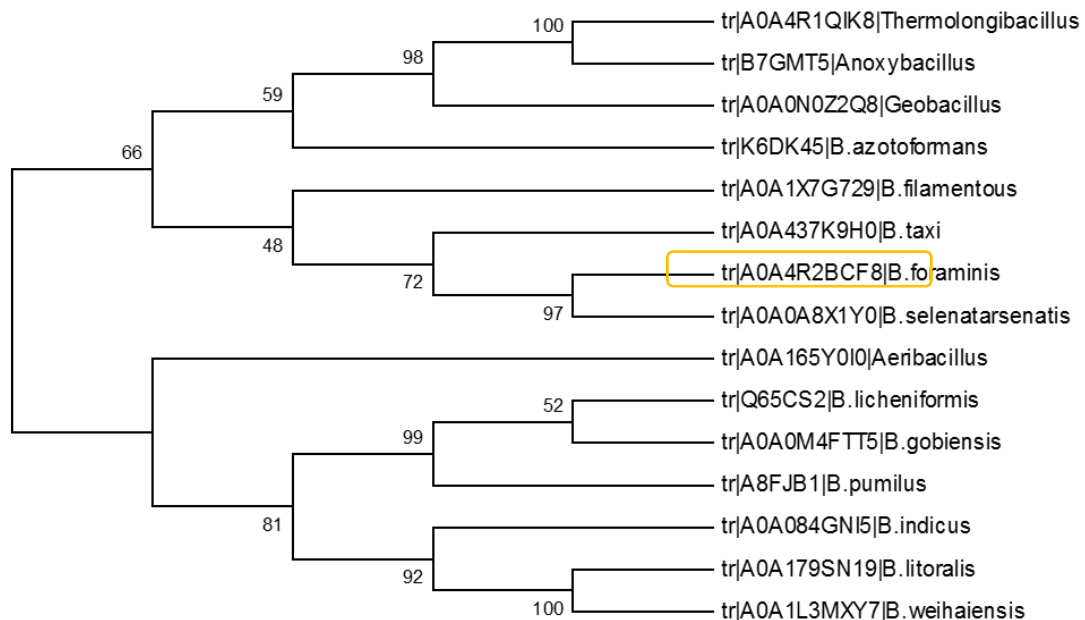
Figure 2. SDS-PAGE analysis for the verification of expression of His- Q65CS2 fusion protein overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. 1) Total soluble proteins extracted from pET28a 4 h after induction with IPTG. 2) Total soluble proteins extracted from pET28a 2 h after induction with IPTG. 3) Total proteins extracted from pET28 4 h after IPTG induction. 4) Total proteins extracted from pET28a 2 h after IPTG induction M) Protein weight marker (6/5- 116 kDa). 5) Total proteins extracted from pET28a 0 h after IPTG induction. 6) Total soluble proteins extracted from pET28a-yyxA 2 h after IPTG induction. 7) Total proteins extracted from pET28-yyxA 0 h after IPTG induction. 8) Total soluble proteins extracted from pET28a-yyxA 4 h after IPTG induction.



شکل ۳. آنالیز دات بلات پروتئین نو ترکیب Q65CS2. ۱- بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی

پلاسمید pET28a ۲- بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a-yyxA

Figure 3. Dot blot analysis of recombinant protein Q65CS2. 1- Soluble proteins extracted from pET28a. 2- Soluble proteins extracted from pET28a-yyxA.



شکل ۴. درخت فیلوژنتیکی رسم شده مربوط به پروتئین‌های مختلف جنس باسیلوس و سایر موجودات با

استفاده از نرم افزار MEGA5.2. نام اختصاصی ژن‌ها و پروتئین‌های موجود در این درخت فیلوژنتیکی در

جدول ۲ آمده است و پروتئین کد شده توسط ژن yyxA داخل کادر مشخص شده است.

Figure 4. Phylogenetic tree plotted for the serine proteases of Bacillus using MEGA5.2 software. The specific names of genes and proteins in this phylogenetic tree are listed in Table 2. The protein encoded by the yyxA gene inside the box is identified.

## نتیجه گیری

پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *yycA* استخراج شده از *Bacillus licheniformis* انجام گرفت. به منظور بهبود عملکرد آنزیم‌ها در صنعت، شناخت توالی و خصوصیات مربوط به آنزیم‌های میکروبی جدید با استفاده از همسانه‌سازی و تکنولوژی DNA نو ترکیب لازم می‌باشد. تاکنون پژوهشی به منظور توالی‌یابی، تعیین خصوصیات و بیان ژن سرین پروتئاز *yycA* صورت نگرفته است. طبق نتایج به دست آمده، سرین پروتئاز Q65CS2 متعلق به سرین پروتئازهایی می‌باشد که شبیه به تریپسین عمل می‌کنند. ساختار این پروتئاز در مقایسه با ساختار سایر پروتئازهای صنعتی دارای ویژگی غیر معمول است. این پروتئازها در ساختار خود حداقل یک دمین PDZ دارند که در اتصال به انتهای کربوکسیل پروتئین‌های دیگر نقش دارد و آمینواسیدهای فعال در آن‌ها آسپارتیک اسید، هیستیدین و سرین هستند (Kim et al. 2003; Jiao et al 2010). دمین PDZ به عنوان یک سایت آلوستریک آنزیم عمل می‌کند و پروتئاز را قادر می‌سازد تا پروتئین‌هایی با تاخوردگی اشتباه را تشخیص دهد (Sohn et al. 2009) و این امکان را فراهم می‌سازد که از آن در صنعت و در شرایط نامطلوب استفاده شود. از سویی دیگر همان‌طور که مطالعات نشان داد، آنزیم سرین پروتئاز مورد مطالعه علاوه بر این که در دسته آنزیم‌های پایدار قرار می‌گیرند؛ به صورت محلول در میزبان بیان خواهد شد و به صورت اجسام اینکلوژن تجمع پیدا نخواهد کرد که این مزایا موجب می‌شود که آنزیم مذکور به عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنعت در نظر گرفته شوند.

**سپاسگزاری:** از معاونت محترم پژوهشی و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره) قزوین به خاطر حمایت

مالی و حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

- احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۱)۱۱، ۱۵۰-۱۳۵.
- توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئی علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۴)۶، ۵۰-۳۵.
- جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئی علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان (۴)۴، ۱۳۲-۱۱۹.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۱)۱۲، ۱۷۷-۱۹۲.



محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

## References

- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019a) Effect of Roasted Soybean and Canola Seeds on Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma (PPARG) Gene Expression and Cattle Milk Characteristics. Iran J Appl Anim Sci 9, 635-642.
- Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozzi M et al. (2019b) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).
- Ageitos JM, Vallejo JA, Serrat M et al. (2013) In Vitro Ca<sup>2+</sup>-Dependent Maturation of Milk-Clotting Recombinant *Epr*: Minor Extracellular Protease: From *Bacillus licheniformis*. Mol Biotechnol 54, 304–311.
- Banerjee A, Pal S, Paul T et al. (2014) Characterization of *Bacillus anthracis* proteases through protein-protein interaction: an in silico study of anthrax pathogenicity. Cellmed 4(1), 1-12.
- Benkert P, Künzli M, Schwede T (2009) QMEAN server for protein model quality estimation. Nucleic Acids Res e322.
- Bhatt HB, Singh SP (2020) Cloning, expression, and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. Front Microbiol 11, 941-956.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res 7, 1513–1525.
- Borgmeier C, Bongaerts J, Meinhardt F (2012) Genetic analysis of the *Bacillus licheniformis* degSU operon and the impact of regulatory mutations on protease production. J Biotechnol 159, 12-20.
- Çalık P, Çalık G, Özdamar TH (2001) Bioprocess development for serine alkaline protease production: a review. Rev Chem Eng 17, 1–62.
- Çalık P, Kalender N, Özdamar TH (2003) Overexpression of serine alkaline protease encoding gene in *Bacillus* species: performance analyses. Enzyme Microb Technol 33(7), 967-974.
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci 69:2110–2114.
- Cheng RH, Jiang N (2006) Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. Biotechnol Lett 28, 55–59.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A et al. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.

- Geourjon C, Deleage G (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics* 11(6), 681–4.
- Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK (2016) Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *Int J Food Microbiol* 232, 134–143.
- Gupta R, Beg QK, Khan S, Chahuan B (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 381–95.
- Hadjidj R, Badis A, Mechri S et al. (2018) Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* K7A. *Int J Biol Macromolec* 114, 1033-1048.
- Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Bioch* 88, 1895–1898.
- Joshi S, Satyanarayana T (2013) Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresour Technol* 131, 76–85.
- Kaur I, Kocher GS, Gupta VK (2012) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene for an Alkaline Protease from *Bacillus circulans* MTCC 7906. *Indian J Microbiol* 52 (4), 630-637.
- Kim GM, Lee AR, Lee KW et al. (2009) Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from cheonggukjang. *J Microbiol Biotechnol* 19, 997-1004.
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105–32.
- Manachini PL, Fortina MG (1998) Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* 20, 565–568.
- Masoudzadeh SH, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2020) Effects of diets with different levels of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Rumin Res* 193, e106276.
- Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Characteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 7, 289-295.
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).

- Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 10, 111-122 (in Persian).
- Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agric Biotechnol J* 12 (1), 177-192 (In Persian).
- Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. *Agric Biotechnol J* 12 (4), 167-181 (In Persian).
- Nascimento WCAD, Martins MLL (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 35, 91-96.
- Pastor MD, Lorda GS, Balatti A (2001) Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Braz J Microbiol* 32, 6-9.
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY et al. (2008) MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res* 36, 320–325.
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234, 779-815.
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Vol: 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sareen R, Bornscheuer UT, Mishra P (2005) Cloning, functional expression and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* 27, 1901–1907.
- Siddiqui IA, Haas D, Heeb S (2005) Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a bio-control factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Environ Microbiol* 171, 5646–5649.
- Suberu Y, Akande I, Samuel T et al. (2019) Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. *Biocatal Agric Biotechnol* 20, 101264.
- Sulaiman N, Mahady NM, Ramly NZ (2017) Substrate binding site of proteases from *bacillus lehensis* G1 by molecular docking. *Academia* 5 (1), 36-43.
- Takagi H, Takashi M (2003) A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 63, 1-9.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24 (8), 1596 –1599.
- Tang XM, Shen W, Lakay FM et al. (2004) Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett* 26, 975–979.

- Tekin A, Uzuner U, Sezen K (2020) Homology modeling and heterologous expression of highly alkaline subtilisin-like serine protease from *Bacillus halodurans* C-125. *Biotechnol Lett* 43(2), 479-494.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. *Agric Biotechnol J* 6, 35-50.
- Van der Laan JC, Gerritse G, Mulleners LJ et al. (1991) Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl Environ Microbiol* 57(4), 901-909.
- Ward E, Kerry BR, Manzanilla-Lopez RH, et al. (2012) The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcpl* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode bio-control. *PLoS One* 7 (4), e35657.
- Wiegand S, Voigt B, Albrecht D et al. (2013) Fermentation stage-dependent adaptations of *Bacillus licheniformis* during enzyme production. *Microb Cell Fact* 12 (1), 1-18.
- Yao Zh, Kim JA, Kim JH (2018) Gene cloning, expression, and properties of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus pumilus* BS15 isolated from gul (oyster) jeotgal. *Biotechnol Bioprocess Eng* 23 (3), 293-301