کلونینگ و بیان ترشحی ژن لیپاز (BTL2) *باسیلوس ترموکاتنولاتوس* در *پیکیا پاستوریس* با استفاده از توالیهای نشانه طبیعی و آلفا فاکتور مخمری

مرضیه وفا[1و2]، باقر یخچالی[1،*]، علی حق نظری[2]، فردوس رستگارجزی[1]، علی اصغر کارخانه[1] و حورا احمدی دانش[1]

[1] **تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست**

[2] **زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی**

تاریخ دریافت: ٨٧/١١/٣ تاریخ پذیرش: ٨٩/٤/٢٦

چکیده

لیپاز (Triacylglycerol acylhydrolase EC 3.1.1.3)، هیدرولیز تری آسیل گلیسرول به گلیسرول و اسیدهای چرب را در حد فاصل لایه چربی و آب کاتالیز می کند. لیپازها در فرمولاسیون شوینده ها، تهیه بیوسورفکتانتها، صنایع روغن، غذایی، کشاورزی، چوب و کاغذ، پزشکی و دارویی کاربرد دارند. مهم ترین کاربرد این آنزیم در صنایع شوینده است. در این تحقیق، پس از استخراج DNA ژنومی باکتری *باسیلوس ترموکاتنولاتوس* (*Bacillus thermocatenulatus*) مولد لیپاز، ژن لیپاز *btl2* (همراه با توالی نشانه و بدون توالی نشانه) با روش PCR تکثیر و در حامل بیانی pPIC9 تحت کنترل پروموتر الکل اکسیداز کلون شد (pYV128 و pYV129) پس از تأیید صحت کلونینگ توسط PCR و برش آنزیمی، پلاسمیدهای نوترکیب فوق با آنزیم *Bgl II* خطی شده و با روش الکتروپوریشن به میزبان *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastories*) انتقال داده شدند. مخمر *پیکیا پاستوریس* نوترکیب در محیط BMGY کشت داده شد و با متانول بیان آنزیم لیپاز القاء شد. وجود آنزیم در محیط کشت با آزمون پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) و روش ایمونوبلات تأیید شد. خالص سازی لیپاز نوترکیب به روش تعویض یونی انجام و فعالیت ویژه آنزیم به روش pH- stat تعیین شد. نتایج تولید U/L ١٨٠٠٠ لیپاز نوترکیب در کشت فلاسک و کسب U/L ١٢٠٠٠ آنزیم نوترکیب خالص (راندمان خالص سازی ٦٦ درصد) با فعالیت ویژه μ/mg ٥٧٢٨ را نشان داد.

واژه های کلیدی: *باسیلوس ترموکاتنولاتوس*، *پیکیا پاستوریس*، لیپازنوترکیب، بیان ترشحی

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٤٤٥٨٠٣٥٣، پست الکترونیک :bahar@nigeb.ac.ir

مقدمه

دانش آنزیمولوژی تحول عمیقی در صنایع بیوتکنولوژی ایجاد نموده است، به طوری که امروزه از بین ٤٠٠٠ آنزیم شناخته شده در حدود ٢٠٠ نوع آن در صنایع مختلف کاربرد دارند که اکثراً از منابع میکروبی حاصل شده اند (٤ و ١٣). امروزه بیشتر آنزیمها (و احتمالاً در آینده ای نزدیک همه آنها) به وسیله فرمانتاسیون مواد با پایه زیستی تهیه می شوند (٨). آنزیمهای هیدرولیتیکی چون پروتئازها، آمیلازها، آمیدازها، استرازها و لیپازها بخش عمده ای از داد و ستد آنزیمهای صنعتی (حداقل٧٥ درصد) را در برمی گیرند. در این میان لیپازها به خاطر کاربرد گسترده در صنایع مختلف از جمله تولید شوینده ها، صنایع غذایی، دارو سازی، کشاورزی و ... اهمیت فراوانی داشته و در دست مطالعه و بررسی هستند (٦، ٧، ٩ و ١٤).

امروزه استفاده از مخمر متیلوتروف *پیکیا پاستوریس* به عنوان میزبان برای بیان پروتئینهای نوترکیب نظیر لیپاز نوترکیب، افزایش یافته است. این مخمر دارای پروموترهای قوی است که بیان ژن خارجی را القاء می کند، بنابراین قادر به تولید مقادیر زیادی از پروتئین هدف خواهد بود.

Archive of SID
www.SID.ir

پیکیا پاستوریس به عنوان یک یوکاریوت بسیاری از مزایای سیستمهای بیان یوکاریوتی نظیر تا زدن پروتئین و تغییرات پس از ترجمه را دارد و در عین حال مانند سیستمهایی نظیر *Saccharomyces cerevisiae* و *E. coli* به آسانی قابل دست کاری و کشت در محیطهای ساده می باشد (٥).

با توجه به اهمیت آنزیم لیپاز در صنایع گوناگون و عدم تولید آن در داخل کشور و هزینه های هنگفتی که صرف وارد کردن آن می شود، کار بر روی کلون سازی و بیان آنزیم ضروری به نظر می رسد.

مواد و روشها

کلونینگ ژن لیپاز *btl2* در مخمر: باکتری گرمادوست *باسیلوس ترموکاتنولاتوس* به عنوان منبع ژن لیپاز از کلکسیون میکروبی DSMZ تهیه شد. با استفاده از پرایمرهای Pic sig F، Pic.F و Pic.R (جدول١) و DNA ژنومی آن ژن لیپاز همراه با توالی نشانه [*btl2*(1)] و بدون توالی نشانه [*btl2*(2)] توسط PCR با برنامه (دناتوره آغازین در ٩٤ درجه به مدت ١٢٠ ثانیه، سی چرخه تکثیر هر یک شامل دناتوره در ٩٤ درجه به مدت ٤٥ ثانیه، جفت شدن پایمر در ٥٠ درجه به مدت ٤٥ ثانیه، پلی مریزه شدن در ٧٢ درجه به مدت ٩٠ ثانیه و پلی مریزه شدن نهایی در ٧٢ درجه به مدت ١٠ دقیقه) با آنزیم Pfu DNA polymerase تکثیر شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات توالی ژن *btl2* در بانک اطلاعات ژن NCBI به شماره دسترسی X95309 انجام شد. ژنهای تکثیر یافته در پلاسمید pGEM5zf (پرومگا)کلون شد. پس از تأیید کلونینگ توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعه حاوی ژن از حامل کلونینگ توسط آنزیمهای *Bam*H I و *Eco*RI جدا و در حامل بیانی pPIC9 (Invitrogen) کلون شد. برای تأیید کلونینگ در حامل بیانی از آنزیمهایی استفاده شد که علاوه بر یک جایگاه برش در وکتور یک جایگاه برش نیز در ژن داشتند. نهایتاً برای هر ژن یک کلون هم از لحاظ اندازه قطعه کلون شده و هم از لحاظ جهت آن تأیید شد. انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان و بیان ژن مطابق دستورالعمل سازنده کیت (اینویتروژن) انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن *btl2* توسط آنزیم *Bgl*II به شکل خطی درآمده و توسط روش شوک الکتریکی(Electroporation) در شرایط ١,٥ kv، ٢٥ µF و ٢٠٠ اهم به مدت ٨-٧ میلی ثانیه به میزبان بیانی مستعد مخمر *Pichia pastoris* منتقل شد. مقادیر مختلف از محصول انتقال روی محیط حداقلMD (Minimal Dextrose Medium) حاوی YNB(Yeast Nitrogen Base) ١/٣٤ درصد، بیوتین ٤×١٠^{-٥} درصد و دکستروز٢ درصد، پخش شد. پلیتها ٩٦ ساعت در ٣٠- ٢٨ درجه سانتی گراد انکوبه شدند تا کلونیهای مخمر نوترکیب تشکیل گردند. کلونیهای نوترکیب حاوی ژن هیستیدین دهیدروژناز بوده و در محیط حداقل فاقد هیستیدین می توانند رشد کنند.

جدول١- پرایمرهای استفاده شده در واکنش های PCR

نام پرایمر	توالی	کاربرد
Pic.F	5′-AG*GAATTC*GCTGCATCCCCAAGAGCCAATG-3′ *Eco*RI	تکثیر ژن *btl2*(2)
Pic.R	5′-CATA*GAATTC*AGGTGCTTGCTC-3′ *Eco*RI	تکثیر ژن*btl2*(1) و *btl2*(2)
Pic.Sig.[F]	5′-AG*GGATCC*AAACGATGATGAAAGGCTGCAGAGTGTTG-3′ *Bam*HI	تکثیر ژن*btl2*(1)

Archive of SID

www.SID.ir

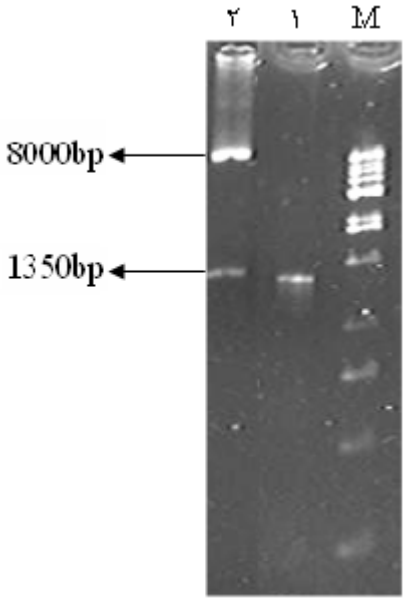
بررسی بیان آنزیم لیپاز در کلونهای نوترکیب مخمر: حدود ١٠٠ کلون مخمر که در محیط MD رشد کرده بودند، در ٥ میلی لیتر محیط (Buffered Complex glycerol Medium)BMGY حاوی: عصاره مخمر ١ درصد، پپتون ٢ درصد، بافر پتاسیم فسفات M ٠/١ (pH:6) ، YNB ١/٣٤ درصد، بیوتین $^{-٥}$ ١٠ ×٤ درصد و گلیسرول ١ درصد، به مدت یک شب در٣٠-٢٨ درجه سانتی گراد با سرعت rpm ٢٠٠ کشت داده شدند. سلولها با سانتریفوژ رسوب داده شدند. پس از خارج کردن محلول رویی رسوب سلولی در ٥ میلی لیتر محیط (Buffered Complex Methanol Medium) BMMY حاوی عصاره مخمر ١ درصد، پپتون ٢ درصد، بافر پتاسیم فسفات M ٠/١ (pH:6) ، YNB ١/٣٤ درصد، بیوتین $^{-٥}$ ١٠ ×٤ درصد و متانول ١ درصد، سوسپانسیون شد. جهت القای پروموتر AOX1 هر ٢٤ ساعت متانول در غلظت نهایی٠/٥ درصد اضافه شد. القا ٍ به مدت ٩٦ ساعت ادامه یافت. در آزمون بیان از مخمر حاوی وکتور بیانی بدون ژن لیپاز به عنوان شاهد منفی استفاده شد. ابتدا بیان لیپاز نوترکیب با یک آزمایش کیفی با استفاده از پارانیتروفنیل پالمیتات بررسی شده (٣) سپس با استفاده از SDS- PAGE و وسترن بلاتینگ (١٠) بیان و ترشح لیپاز نوترکیب بررسی شد. بدین منظور٩٦ ساعت پس از القاء محیط کشت مخمر از سلولها جدا شده، پروتئینهای محلول در آن توسط تری استیک اسید (TCA) ١٢ درصد رسوب داده شد. رسوب پس از حل شدن در بافر الکتروفورز و جوشاندن به مدت ٥ دقیقه توسط SDS-PAGE الکتروفورز شد. در وسترن بلاتینگ از سرم خرگوش ایمن شده با لیپاز نوترکیب خالص تولید شده در *E. coli* به عنوان آنتی بادی اولیه (١) و (Horse Radish Proxidase Anti Rabit) HRP (شرکت Serotec. UK) به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده شد. خالص سازی با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین DE52 انجام شد. فعالیت آنزیمی لیپاز نوترکیب خالص با روش pH- stat انجام گرفت.

نتایج

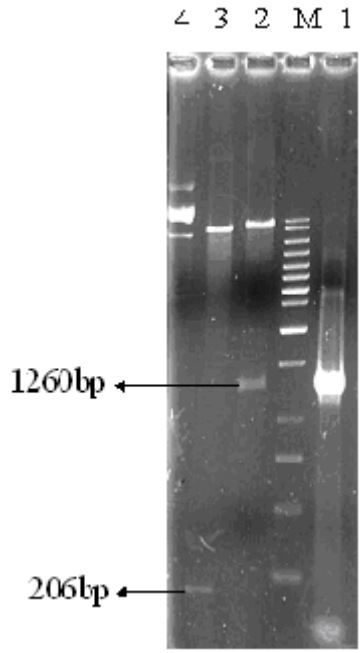
کلونینگ ژن لیپاز *btl2*: پس از تکثیر ژن *لیپاز*(1)*btl2* و *btl2*(2) توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی، محصول PCR در وکتور کلونینگ pGEM5zf کلون و پلاسمیدهای مربوطه به ترتیب pYV125 و pYV126 نامیده شدند. تأیید کلونینگ در این وکتور توسط برش با آنزیمهای *Bam*HI و *Eco*RI انجام شد که در نتیجه دو باند یکی به اندازه ١٣٥٠ جفت باز برای ژن *btl2*(1) و ١٢٦٠ جفت باز برای *btl2*(2) و دیگری به اندازه پلاسمید (٣٠٠٣ جفت باز) رؤیت شد که صحت کلونینگ را تأیید می کرد. ژن *btl2*(1) توسط آنزیمهای *Eco*RI و *Bam*HI از پلاسمید نوترکیب pYV125 و ژن *btl2*(2) توسط آنزیم *Eco*RI از پلاسمید pYV126جدا و در پلاسمید بیانی pPIC9 کلون شد تا به ترتیب پلاسمیدهای pYV128 و pYV129 به دست آید. به دلیل اهمیت جهت قطعه کلون شده در پایین دست پروموتر AOX1 در پلاسمید pPIC9 برای بیان پروتئین نوترکیب تأیید کلونینگ و جهت ژن *btl2* در پلاسمید با استفاده از برش توسط آنزیمهای *Eco*RI ، *Bam*HI و *Xho*I انجام شد (شکل١ و ٢). برش پلاسمید نوترکیب pYV129با آنزیم *Eco*RI باندی حدود ١٢٦٠ جفت باز ایجاد کرد که حاکی از صحت اندازه قطعه کلون شده بود و محصول برش با آنزیم *Xho*I دو باند در حدود ٩٠٥٤ و ٢٠٦ جفت باز ایجاد کرد (یک محل برش در ژن *btl2* و یک محل در پلاسمید بالادست ژن) که نشان دهنده صحت جهت کلونینگ بود (شکل ٢)، همچنین محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی نیز صحت کلونینگ ژن *btl2* را تأیید کرد.

بیان لیپاز BTL2 نوترکیب: پلاسمیدهای نوترکیب pYV128 و pYV129 پس از خطی شدن با استفاده از شوک الکتریکی به سلولهای مستعد مخمر منتقل و محصول انتقال روی محیط کشت حداقلMD جامد کشت داده شد تا کلونیهای نوترکیب پدیدار شوند.

Archive of SID
www.SID.ir

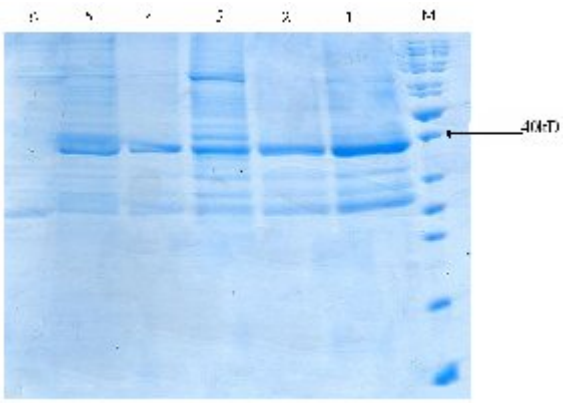


شکل١- هضم آنزیمی pYV128 با آنزیمهای *Bam*HI و *Eco*RI
ستون M نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb DNA ladder)،
ستون ١محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی Pic.Sig.F و
Pic.R، ستون ٢ محصول برش آنزیمی پلاسمید با آنزیمهای *Bam*HI
و *Eco*RI



شکل٢- تأیید صحت کلون pYV129 با هضم آنزیمی و PCR
ستون ١ محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی Pic.F و Pic.R،
ستون M نشانگر وزن مولکولی DNA (1kb DNA ladder
Fermentas)، ستون ٢ برش آنزیمی پلاسمید با آنزیم *Eco*RI،
ستون٣ برش آنزیمی پلاسمید با آنزیم *Xho*I، ستون ٤ پلاسمید بریده
نشده.

بعد از پیدایش کلونیهای نوترکیب بررسیهای بیان ابتدا با استفاده از آزمایش پارانیتروفنیل پالمیتات انجام شد. صحت بیان لیپاز نوترکیب در نمونه های مثبت توسط SDS-PAGE و ایمنوبلات بررسی شد. نتایج SDS- PAGE و وسترن بلاتینگ حضور یک باند پروتئینی حدود ٤٠ کیلو دالتون که معادل آنزیم لیپاز BTL2 بود را نشان دادند (شکل ٣ و ٤).



شکل ٣- بررسی بیان پروتئین BTL2 با ژلSDS-PAGE

ستون M نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ستون ٥-١ نمونه های پروتئین محیط کشت ٥ سویه مخمر نوترکیب حاوی ژن *btl2* ، ردیف ٦ نمونه کنترل منفی(سلول مخمر میزبان).

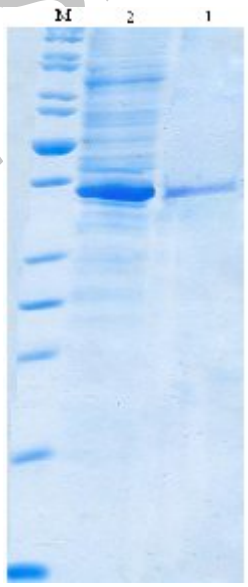
شکل٤- بررسی بیان پروتئین BTL2 با وسترن بلاتینگ

ستون ١ کنترل مثبت (پروتئین BTL2 خالص تولید شده در *E. coli* (١))، ستون ٢ کنترل منفی (سلول مخمر میزبان)، ستونهای ٢، ٣ و ٥ سه سویه مخمر نوترکیب حاوی ژن *btl2*(2)، ستونهای ٤ و ٦ دو سویه مخمر نوترکیب حاوی ژن *btl2*(1)

www.SID.ir

همان طور که نتایج نشان می دهد هر دو ساختار ژنتیکی حاوی توالی نشانه طبیعی ژن لیپاز و توالی نشانه آلفا فاکتور امکان بیان و ترشح لیپاز نوترکیب به محیط را فراهم کرده اند که مؤید کارآیی سیستم ترشحی مخمر در شناسایی و پردازش توالی نشانه با منشاء باسیلوس است. مقایسه میزان بیان ترشحی لیپاز نوترکیب دو ساختار ژنتیکی فوق نشان داد که میزان بیان دو سیستم بسیار نزدیک به یکدیگر و قابل توجه بود (نتایج ارائه نشده است).

خالص سازی لیپاز نوترکیب از ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی لیپاز تولید شده توسط یکی از کلونها، که بیان بالایی را نسبت به سایرین نشان می داد، با روش کروماتوگرافی تعویض یونی با رزین DE52 صورت گرفت (شکل۵).



شکل ۵ – تخلیص لیپاز نوترکیب ردیف M نشانگر وزن مولکولی پروتئین، ردیف ۲ نمونه حاوی لیپاز قبل از عبور دادن از ستون، ردیف ۱ نمونه حاوی لیپاز پس از عبور دادن از ستون.

میزان پروتئین موجود در ۱ میلی لیتر از نمونه خالص توسط روش برادفورد ۰/۰۷ میلی گرم در میلی لیتر تعیین گردید. فعالیت لیپاز خالص در نمونه فوق ٤۰۱U/ml و فعالیت ویژه آن (میزان فعالیت به ازای ۱ میلی گرم آنزیم) ۵۷۲۸/۵۷ U/mg محاسبه شد. با روش فوق مقدار ۱۲۰۰۰ واحد آنزیم نوترکیب خالص از یک لیتر کشت مخمر در فلاسک به دست آمد. اندازه گیری فعالیت آنزیم در کشت مخمر نوترکیب بیان کننده لیپاز BTL2 تولید ۱۸۰۰۰ µ/L لیپاز نوترکیب را نشان داد. بدین ترتیب با روش فوق راندمان خالص سازی حدود ٦٦ درصد کسب گردید.

بحث

با توجه به اهمیت پایداری حرارتی آنزیمهای صنعتی از جمله لیپاز، در این پژوهش بیان ژن لیپاز باکتری گرما دوست به نام *Bacillus thermocatenulatus* با دو توالی پپتید نشانه مورد مطالعه قرار گرفت، این باکتری دو آنزیم لیپاز با نامهای BTL1 و BTL2 تولید می کند که این پژوهش بر روی آنزیم BTL2 انجام شد. این آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و pH ۱۱–۹ پایدار بوده و خصوصیات مطلوبی برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی دارد. در این تحقیق سیستم بیانی مخمر متیلوتروف *Pichia pastoris* برای تولید آنزیم لیپاز نوترکیب استفاده شد. دلیل انتخاب این سیستم محاسن متعدد آن از جمله، وجود یک پروموتر قوی از ژن الکل اکسیداز۱(AOX I)، امکان رشد در تراکم بالا در فرمانتور، انجام فرآیندهای پس از ترجمه، دست ورزی آسان و نکته بسیار مهم خالص سازی آسان آنزیم تولیدی به دلیل بیان ترشحی آن بود (۱۵).

بیان پروتئینهای نوترکیب در *P. pastoris* به دو صورت ترشحی و داخل سلولی امکان پذیر است. از آنجایی که پیکیا به طور طبیعی پروتئینهای کمی به محیط کشت ترشح می کند، تخلیص پروتئین در بیان خارج سلولی ساده تر است (۲). همچنین اگر پروتئین در سیستم طبیعی ترشحی و گلیکوزیله باشد، بیان ترشحی ارجح است. از آنجا که پروتئین لیپاز BTL2 در سیستم طبیعی به صورت ترشحی بیان می شود بیان آن به صورت ترشحی در نظر گرفته شده و مطالعات مربوط به بیان تنها بر روی محیط کشت انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به اینکه سلولهای نوترکیب در اثر یک نوترکیبی هومولوگ ایجاد می شوند، به دلیل تنوع در محل ورود ژن در ژنوم و ورود تعداد نسخه های متفاوت ژن خارجی در ژنوم، ممکن است نو آراییهای ژنتیکی و گوناگون منجر به کلونهای مختلف با بیان متفاوت شود. بنابراین برای دستیابی به کلون با بیان بهتر باید تعداد زیادی کلون از لحاظ بیان مورد بررسی قرار گیرند. مطالعات وسترن بلاتینگ بر روی نمونه های مربوط به عصاره سلولی و محیط کشت ۳ کلون متفاوت مخمر حاصل از انتقال ژن *btl2* به همراه توالی نشانه باسیلوسی نشان داد که توالی نشانه باسیلوسی راندمان خوبی در ترشح لیپاز به درون محیط کشت داشته و قسمت اعظم این آنزیم را به درون محیط کشت هدایت می کند. همچنین بر اساس آزمایش پارا نیترو فنیل پالمیتات میانگین بیان در کلونهای مثبت حاوی ژن *btl2(1)* تفاوت چشمگیری با کلونهای مثبت حاوی ژن *btl2(2)* نداشت. شاید بتوان گفت کارآیی توالی راهنمای باسیلوسی از لحاظ ترشح و بیان تقریباً مشابه با توالی راهنمای مخمری آلفا فاکتور برای پروتئین لیپاز BTL2 است. بر اساس اطلاعات در دسترس این اولین گزارش استفاده از توالی راهنمای باسیلوسی در مخمر *p. pastoris* برای بیان ترشحی پروتئین نوترکیب است.

نتایج SDS-PAGE و وسترن بلاتینگ نشان داد که وزن مولکولی این لیپاز در کلونهایی که حاوی ژن *btl2(1)* (ژن همراه با توالی نشانه باسیلوسی) بود، تفاوت چندانی با لیپاز تولید شده توسط کلونهای حاوی ژن *btl2(2)* نداشت. همچنین مطالعه وسترن بلاتینگ نشان داد وزن مولکولی آنزیم BTL2 تولید شده در مخمر معادل وزن لیپاز BTL2تولید شده در *E. coli* است (۱). بررسی توالی آنزیم BTL2 نشان داد که این ژن حاوی سه جایگاه N– گلیکوزیلاسیون (Asn- X- Ser/Thr) است، با وجود این یکسان بودن تقریبی وزن مولکولی لیپاز حاصل از دو سیستم ژنتیکی پروکاریوتی و یوکاریوتی ممکن است ناشی از عدم گلیکوزیلاسیون آنزیم در مخمر و یا گلیکوزیلاسیون جزئی آن بدون تأثیر قابل توجه بر وزن مولکولی آن باشد.

لیپاز BTL2 در *E. coli* تحت کنترل پروموتر بومی و پروموتر قوی قابل القای حرارتی λP_L بیان شده است. اسمیت – دنرت این لیپاز را تحت کنترل پروموتر بومی کلون کرد (۱۱، ۱۲) که بیان پایین آنزیم نوترکیب (احتمالاً به دلیل پروموتر بومی) مشاهده شد. رواً و همکارانش (۱٦) بیان این لیپاز را در *E. coli* با به کار گیری پروموتر قوی قابل القای حرارتی λP_L با عملکرد بالاتر گزارش دادند. در هر دو مورد لیپاز به صورت درون سلولی و نامحلول(Inclusion body) تولید شده بود. بنابراین برای به دست آوردن آنزیم خالص باید مراحل خالص سازی زیادی انجام می شد. در سال ۲۰۰۳ کوین و همکارانش مخمر *P. pastoris* را برای بیان لیپاز BTL2 تحت پروموتر الکل اکسیداز۱ و توالی نشانه آلفا فاکتور به کار گرفتند. پروتئین تولید شده در این مخمر به صورت ترشحی تولید شده و در محیط کشت به طور نسبی خالص بود. خصوصیات فیزیکوشیمیایی آنزیم لیپاز نوترکیب تولید شده در *P.pastoris* تعیین گردید که با خصوصیات BTL2 ، حاصل از بیان بالا و پایین در *E. coli* مطابقت داشت (۱۷).

فعالیت ویژه سه لیپاز BTL2 نوترکیب فوق بسیار متفاوت بود به طوری که فعالیت ویژه لیپازی که در سطح بالا در *E. coli* بیان شد ٥٤٨٨٧ U/mg و لیپازی که در سطح پایین در *E. coli* تولید شد ۱۰۲۲۵ U/mgبود، در حالی که فعالیت ویژه لیپازی که توسط کوین در مخمر تولید شد۲۳۰۰۰ U/mg بود (۱۱، ۱۲، ۱۵، ۱٦). فعالیت ویژه لیپاز نوترکیب تولید شده در این تحقیق ۵۷۲۸/۵۷ U/mg بود. سه آنزیم لیپاز نوترکیب که فعالیت ویژه آنها در بالا گزارش شد، در شرایط بهینه در فرمانتور تولید شده بودند در حالی که آنزیم تولید شده در این تحقیق در فلاسک تولید شده است. میزان بیان در فرمانتور چندین برابر بیشتر از میزان

Archive of SID
www.SID.ir

بیان در فلاسک است. شاید دلیل اختلاف میان فعالیت ویژه آنزیم تولید شده در این تحقیق نسبت به تحقیق مشابه در مخمر ناشی از شرایط فرمانتاسیون یا خالص سازی باشد. بهینه سازی محیط کشت و شرایط فرمانتاسیون منجر به افزایش تولید خواهد شد که در ادامه تحقیق باید انجام شود. با این وجود فعالیت ویژه لیپاز تولید شده در این تحقیق بیشتر از لیپاز تولید شده در تحقیق مشابه در *E. coli* بود (۱). در این تحقیق همچنین کارآیی پپتید نشانه طبیعی لیپاز برای بیان نوترکیب آن در مخمر نشان داده شد. آنالیز نرم افزاری توالی پروتئینی لیپاز توسط نرمافزار Signal P نیز نشان می دهد که پپتید نشانه طبیعی لیپاز قابلیت شناسایی و پردازش توسط سیستم ترشحی یوکاریوتها را دارد (۱۸). این نتیجه امکان جستجو و یافتن پپتیدهای نشانه کاراً برای استفاده در سیستمهای مختلف بیان پروتئینهای نوترکیب را نشان می دهد. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از سیستم پ. *پاستوریس* به عنوان سیستمی کارآمد در تولید پروتئین لیپاز نوترکیب توصیه می شود.

منابع

۱- کارخانه ای، ع، ۱۳۸۷، بیان آنزیم لیپاز نوترکیب باسیلوس ترموکاتنولاتوس در *E. coli* و مطالعات ساختاری آن با استفاده از روشهای مهندسی پروتئین. پایان نامه دکترای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.

2- Eiden, A., T. Zagorc, T. Heintel, Y. Carius, F. Breinig Schmitt. M. 2004. Viral Preprotoxin Signal Sequence Allows Efficient Secretion of Green Fluorescent Protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. Applied and Environmental Microbiology. 70: 961-966.

3- Gupta, N. Rathi P. Gupta. R. 2002. Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases, Science Direct. 311: 98- 99.

4- Gupta R., Gupta N., Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification, and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 763-781

5- Higgins, D. R. Cregg. J. M. 1998. in *Pichia* Protocols (Higgins, D. R. and Cregg, J. M., eds.), pp. 1–15, Humana Press, Totowa

6- Jaeger K.E., Eggert T. (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13: 390-397

7- Jaeger K.E. & T. Eggert. (2002) Lipase for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 390-397.

8- Louwrier, A. 1998. Industrial products: the return to carbohydrate-based industries. Biotechnol Appl Biochem . 27:1–8.

9- Pandey A., Benjamin S., Soccol C. R., Nigam P., Kreiger N., Soccols V. T. (1999) The realm of microbial lipase in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29: 119-131

10- Sambrook J, Russell D. (2001) Molecular Cloning III: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

11- Schmidt-Dannert C., M.L. Rua, H. Atomi. Schmid R.D. (1996). Thermoalkalophilic lipase of Bacillus thermocatenulatus. I. Molecular, nucleotide sequence, purification and some properties. Biochim. Biophys. Acta. 1301: 105–114.

12- Schmidt-Dannert, C., M.L. Rua, H. Atomi. Schmid R.D. (1997) Two novel lipase from thermophile Bacillus thermocatenulatus: screening, purification, cloning, overexpression, and properties. Methods Enzymol. 284 : 194–220.

13- Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. (2001) Production, Purification, Characterization, and application of lipases. *Biotechnol Adv* 19: 627-662

14- Smulders E., Rahse W.,von Rybinski W., Steber J., Sung E., Wiebel F. (2002) *Laundary detergents*, 1st Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH.:Weinheim, pp 6

15- Rallabhandi, P & Y. Pak-Lam. 1996. Production of therapeutic proteins in yeasts. Australasian Biotechnology. 6(4): 730- 737.

16- Rua, H. Atomi. Schmidt-Dannert, M. L., C. Wahl, S. Sprauer. A. Schmid, R.D. 1997. Thermoalkalophilic lipase of Bacillus thermocatenulatus. Large-scale production, purification and properties: aggregation

Archive of SID
www.SID.ir

behaviour and its effect on activity. J. Biotech. 56 : 89–102.

17- Quyen, D. T., C. Schmidt- Dannert & R. D. Schmid. 2003. High-level expression of a lipase from Bacillus thermocatenulatus BTL2 in Pichia pastoris and some properties of the recombinant lipase. Protein expr purif. 28(1):102-110.

18- Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Jannick Dyrløv Bendtsen, Henrik Nielsen, Gunnar von Heijne and Søren Brunak.* J. Mol. Biol., 340:783-795, 2004.

Cloning and secretive expression of *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 lipase in *Pichia pastoris* Using natural and yeast α factor signal sequences

Vafa M.[2], Yakhchali B.[1*], Haghnazari A.[2], Karkhane A.A.[1], Rastgar-jazi F.[1], and Ahmadi Danesh H.[1]

[1]**National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, IR Iran**

[2]**Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, IR Iran**

Abstract

Lipase (Triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) hydrolyzes triacylglycerol to glycerol and fatty acids in the water and fatty acid interface. They have many applications in various industries including food, dairy, pharmaceutical, agrochemical, oleochemical and mainly in detergents. In this study *btl2* gene (with and without signal sequence) was amplified from purified genomic DNA of *Bacillus thermocatenulatus* using primers designed based on the sequence in the GeneBank data base (GenBank X95309). PCR products were cloned in pGEM5zf vector. Then the genes were subcloned into the pPIC9 expression vector under alcohol oxidase (AOX1) promoter (pYV128, pYV129). Molecular and restriction enzyme analysis confirmed cloning accuracy. The recombinant plasmids were linearized with *BglII* enzyme and transferred into *Pichia pastoris* host cells with electroporation. Finally, recombinant yeasts were cultured in BMGY medium and induced with methanol. Para nitrophenyl palmitate (pNPP) test and Immunoblotting method showed presence of the recombinant lipases in medium culture. The recombinant lipase was purified by ion exchange chromatography method and the specific activity was measured. The results showed that the recombinant lipase production was 18000U/L in flask culture, which 12000U/L purified recombinant lipase with 5728U/mg specific activity was recovered with this purification method.

Keywords: *Bacillus thermocatenulatus*; *Pichia pastoris*; recombinant lipase; secretional expression

Archive of SID

www.SID.ir