مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۹، شماره ۳ (پیاپی ۲۷) ، بهار ۱۳۸۷

تولیدکیموزین کامل و پردازش یافته نوترکیب در *E-coli* و ارزیابی میزان بیان پری‌پلاسمایی و فعالیت آنزیمی آن‌ها

میثم احمدی‌زیدآبادی[۱] (M.Sc)، غلامرضا احمدیان[*۲] (Ph.D) ، رحیم سروری[۳](Ph.D)

۱ - *دانشگاه امام حسین (ع)، تهران*

۲ – *پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران*

۳ - *دانشگاه علوم پزشکی زنجـان*

چکیده

سابقه و هدف: تا سال ۱۹۹۰، رنت (پروتئازهایی که باعث لخته شدن شیر و تولید پنیر می‌شوند) با روش قـدیمی از شیردان گوساله‌های شیرخوار، یا از منابع گیاهی و یا میکروبی تهیه می‌گردید. در این سال اداره غذا و داروی آمریکـا اجازه تولید و مصرف کیموزین گاوی نوترکیب تولید شده توسط باکتری‌ها را صادر کرد. امروزه بیش از ۹۰ درصد پنیـر مصرفی در انگلستان از کیموزین نوترکیب تولید می‌شود. این تحقیق به منظور قطع وابستگی کـشور بـه مایـه پنیـر وارداتی، بررسی بیان و عمل‌کرد فرم اسپلایس یافته ژن کیموزین (فرم فاقد اگزون ۶) به منظور بدست آوردن آنـزیم کوچک‌تر و فعال‌تر همچنین بررسی عمل‌کرد سیگنال pelB در هدایت پروتئین به فضای پری‌پلاسم بـاکتری *E-coli* انجام گردید.

مواد و روش‌ها: با استخراج mRNA از لایه پوششی معده گوساله و انجام RT-PCR دو فرم از پرپروکیموزین (فرم پردازش یافته فاقد اگزون ۶ و فرم کامل پرپروکیموزین) بدست آمد. سپس با طراحی پرایمرهای مناسب هـر دو فـرم پروکیموزین در وکتور بیانی pET26b کلون گردید. بیان با وسترن بلات تا ئید گردید و عمل‌کرد آن‌ها بررسی شد.

یافته‌ها: هر دو فرم ژن پروکیموزین در وکتور pET26b تولیدگردیدند. میزان تولید فرم پردازش یافته ۷ برابر فرم کامل بود. هر دو فرم پروکیموزین باعث رسوب پروتئین‌های شیر شدند.

نتیجه‌گیری: از آنجا که فرم پردازش یافته و کامل پروکیموزین بعد از شوک اسمزی در فضای پری‌پلاسمی مشاهده نشدند. بنابراین سیگنال pelB قادر به هدایت هیچ یک از آن دو به فضای پری‌پلاسم نیست. بنابراین بایستی سیگنال جدیدی طراحی گردد.

واژه‌های کلیدی: کیموزین پردازش یافته، اسپارتیک پروتئاز، سیگنال pelB ، پروتئینازهای شبه رنتی

مقدمه

کیموزین جزئی از آسپارتیک پروتئازهای معدی است کـه همراه با پپسین و گاسترین می‌باشد. مولکول کاپاکـازئین شـیر توسط آنزیم کیموزین در پیوند بین اسـید آمینـه فنیـل آلانـین ۱۰۵ و متیونین ۱۰۶ شکسته می شود. وباعث لخته شـیر مـی شود [۱]. در واقع تعداد زیادی از پروتئازها قـادر بـه تجزیـه پروتئین‌های شیر و تولید لخته هـستند امـا ایـن خاصـیت بـه تنهایی جهت کاربرد آنزیم پروتئاز در پنیرسازی کافی نیـست. یک مایه پنیر خوب باید به سادگی در آب حـل شـود، فاقـد طعم نامطلوب باشد و قدرت لخته کنندگی بالا داشته باشد. اما پروتئاز اسیدی حاصل از منابع گیـاهی و باکتریـایی بـه دلیـل فعالیت پروتئولیتیکی بالا و ایجاد تلخی در پنیر مفید نیست. در

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۱۸۷۶۰۸ نمابر: ۴۴۵۸۰۳۹۵ - ۰۲۱

Email: ahmadian@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۴/۵

Archive of SID

www.SID.ir

حال حاضر در ایران اکثر صنایع پنیرسازی از رنت قارچی وارداتی جهت تولید پنیر استفاده می‌کنند. بنابراین لازم است محققین و پژوهش‌گران ایرانی در جهت تأمین این نیاز ضروری اقدام نمایند. پرپروکیموزین گاوی دارای ۳۸۱ اسیدآمینه است. ۱۶ اسید آمینه اول این پروتئین نقش سیگنال آب‌گریز را دارد و هنگام ترشح به فضای معده از پروتئین جدا می‌شود. و پروکیموزین با ۳۶۵ اسید آمینه تولید می‌شود [۲و۳]. این پروتئین تحت تاثیر pH معدی دچار تغییراتی می‌گردد و به صورت خودبخودی فعال می‌شود [۴ و۵] در این حالت ۴۲ اسیدآمینه از انتهای آمینی آن جدا می‌شود و یک زنجیره پروتئینی با ۳۲۳ اسید آمینه تولیدمی گردد [۶و۷].

Emtage در سال ۱۹۸۳ و Marston در سال ۱۹۸۴ توانستند با استفاده از *E.coli* k-12 در بردارندهٔ پلازمید pCT70 حامل ژن پروکیموزین کامل، پروتئین مذکور را به میزان ۵-۱ درصد پروتئین کلی سلول تولید کنند. Chitpintyol و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۷، با استفاده از سلول‌های *E.coli* BL21 دارای پلازمید pET-PC حامل ژن پروکیموزین کامل، پروکیموزین را تا حدود ۳۰ درصد پروتئین کلی سلول تولید کردند. شکل‌های پردازش یافتهٔ مختلف mRNAی پروکیموزین گاوی در سال ۱۹۸۲ توسط Moir و در سال ۲۰۰۲ توسط Zinovieva و همکارانش گزارش شده‌اند، اما هیچ توضیحی در مورد اهمیت بیولوژیکی ایزوفرم‌های مختلف ارائه نگردید.

بررسی RNA های پیامبر که از روی ژن پرو کیموزین تولید شده‌اند نشان می‌دهد که این mRNA ها دارای حداقل ۷ فرم متفاوت هستند که از ۱تا ۴ اگزون از طریق پردازش حذف شده است. در نتیجه مولکول‌های mRNAیی تولید شده‌اند که ۹۹- ۱۱۴- ۲۱۳- ۲۳۷- ۲۳۶ – ۳۵۱ و ۴۵۰ نوکلئوتید از فرم کامل کوچک‌تر هستند، و در بانک ژنی با شماره‌های AF ۴۲۱۱۶۱ الی AF ۴۲۱۱۶۷ موجود می‌باشد. مولکول کیموزین دارای دو جایگاه فعال شامل آسپارتیک اسید در توالی ۳۶ و ۲۱۶ می‌باشد. فرم ۴ تا ۷ که به ترتیب حذف در اگزون‌های ۳ و ۴ آنها رخ داده است فاقد آسپارتیک ۳۶ می‌باشند همچنین این فرم‌ها فاقد ترئونین ۳۵ و سرین ۳۶ و گلایسین ۳۷ هستند که مسئول ایجاد باندهای هیدروژنی و تشکیل ساختار هستند. در حالی که فرم‌های ۱ تا ۳ با وجود حذف در اگزون‌های ۶ و ۸ حذف مناطق فعال و پیوندهای هیدروژنی را در بر نمی‌گیرند و این می‌تواند برای بررسی میزان فعالیت مناسب باشد. از این رو فرم فاقد اگزون ۶ که ۱۱۴ نوکلئوتید کوچک‌تر از فرم کامل است برای بررسی میزان فعالیت انتخاب گردید و عملیات کلونینگ و بیان روی آن انجام گرفت. چون حذف در اگزون ۶ در مناطق فعال نمی‌باشد احتمالاً با کوچک شدن پروتئین تولید آن افزایش می‌یابد [۸ و۹ و۱۰] در این کار تحقیقی به منظور بررسی توانایی *E.coli* BL21 در بیان دو فرم کامل و فاقد اگزون ۶ ژن پروکیموزین ابتدا mRNA ژن پروکیموزین از معده چهارم گوساله بدست آمد و با RT-PCR، cDNA مربوط به ژن کامل و فرم فاقد اگزون۶ تهیه شد و ژن‌ها وارد پلاسمید Pet-26 شدند به نحوی

شکل۱. مکان قرار گرفتن ژن پرو کیموزین در وکتور مورد نظر در مکان برش *Not*I و *Nco*I

Archive of SID
www.SID.ir

که توالی پلی‌هیستیدین در انتهای کربوکسیلی و سیگنال pelB در ابتدای آمینی آن قرار گرفت و سپس وکتور بیانی وارد *E.coli* شد. به منظور سهولت تخلیص، برچسب هیستیدینی به انتهای هر دو فرم پروتئین فیوز شد. این برچسب امکان تخلیص فیوژن پروتئین را بوسیله ستون Ni فراهم می‌آورد. به منظور ترشح پروتئین به فضای پری پلاسمی از سیگنال pelBدر محل سیگنال آب‌گریز پروتین استفاده گردید .

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: آنزیم‌های محدودگر *Nco*I و *Not*I متعلق به شرکت سیناژن بود. آنزیم T4 DNA Ligase از شرکت Roche و آنزیم‌های تکثیر دهنده DNApolymerase, DNApolymerase Pfu از شرکت Fermentase تهیه گردید و بر اساس برشور شرکت مورد استفاده قرار گرفت. کیت تخلیص DNA پلاسمیدی و کیت ا ستخراج و تخلیص DNA از شرکت Roche خریداری شد.

موادی ازقبیل dNTP, EDTA, Trisbase, Rnase, Mgcl2, یدروکسیدآمونیم، اسیداستیک گلاسیال، هیدروکسید سدیم، کلروفرم, فنل, اسید بوریک, اتیدیوم بروماید, لیزوزیم، ۲- مرکاپتواتانول، پودر آگارز، ژل low melting از شرکت سیناژن تهیه شدند. همچنین مواد مورد استفاده در تکنیک‌های SDS-PAGE، western blotting نیز از شرکت Serotec تهیه شدند.

DNAmarkerهای استفاده شده در این آزمایشات bp DNA ladder Plus SM0321#۱۰۰ و LambdaDNA/EcoR1+Hind111#SM0191و DNA ۱۰۰ ladder#SM0241 بودند. همچنین جهت تکنیک SDS-PAGE از مارکر خریداری شده از شرکت Fermentas استفاده شد.

از آنتی‌بادی منوکلونال ضدهیستیدین به عنوان آنتی‌بادی اختصاصی جهت Western blotting استفاده شد این آنتی‌بادی از نوع دو مرحله‌ای و شامل ANTI HISTIDIN TAGو RABBIT ANTI MOUSE HRP بود. این آنتی‌بادی به طور اختصاصی ۶ هیستیدین که پشت سر هم قرار گرفته‌اند را شناسایی می‌کند.

سویه‌های باکتریایی: سویه مورد استفاده جهت سلول‌های سازگار *E.coli* Bl21DE3، بوده که در بیان مورد استفاده قرار گرفت.

[F-,ompt,hsdSB(rB-mB-gal(cI857,indl,sam,nin5 lacuv5-T7genel),dcm(DE3)]

سویه مورداستفاده، در کلون‌سازی Top 10 و DH5α بوده‌اند.

F′, Φ80 d lacZ Δ15, endAl, yecAl, hsd R17(rk^-, mk^+)

پلاسمیدها: وکتورهای بیانیpET-26b(+) از شرکت Novagene خریداری شدند.

جهت بیان از سیستم T7 پروموتر استفاده شد که بر روی وکتورهایpET قرار دارد که جهت القاء از IPTG تهیه شده از شرکت Fermentas استفاده شد.

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها: از محیط‌های LB Brath و LB Agar حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جهت کلونینگ استفاده گردید و برای بیان ژن مورد نظر محیط‌های مختلف LB Brath مورد بررسی قرار گرفت. آمپی‌سیلین وکاناماسین مورداستفاده به‌عنوان آنتی‌بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

پرایمرها: پرایمرهای فرادست و فرودست پس از طراحی و آنالیز کامپیوتری جهت سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شد.

پرایمربالا دست با توالی(Forward) :

5′GGGGGCCATGGCTGAGATCACCAG 3′
*NCO*I

پرایمر پائین دست با توالی (Revers):

5′GGGCGGCCGCGATGGCTTTGGCCAGC 3
Not I

تفاوت فرم کوچک پروکیموزین با فرم کامل آن در حذف اگزون۶ می‌باشد وچون این اگزون در داخل ژن می‌باشد در نتیجه ابتدا و انتهای هر دو ژن یکسان می‌باشد. بنابراین

Archive of SID

www.SID.ir

کلونینگ هر دو فرم پرو کیموزین هم‌زمان و با استفاده از یک جفت پرایمر انجام گرفت.

جدول ۱. پروتکل PCR

مواد	مقدار
بافر 10X PCR	۵ میکرو لیتر
dNTPs Mi 2. 5 mM	۴ میکرو لیتر
Mgso4 50 mM	۳ میکرو لیتر
پرایمربالا دست۱۰پیکو مول بر میکرو لیتر	۳ میکرو لیتر
پرایمرپایین‌دست۱۰پیکومول‌بر میکرو لیتر	۳ میکرو لیتر
آنزیم Pfu DNA پلی مراز	۰/۵ میکرو لیتر
الگو (cDNA)	۳ میکرو لیتر
آب مقطر(آمپولی)	۲۸/۵میکرو لیتر
حجم نهایی	۵۰ میکرولیتر

جدول ۲. نحوه اجرای سیکل‌های PCR با آنزیم Pfu

مرحله	درجه حرارت	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل‌ها
دناتوره کردن اولیه	۹۵	۱۰	۱
دناتوره کردن	۹۵	۱	۳۲
اتصال	۴۶	۱	
تکثیر	۷۲	۱	
تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱

کیت استخراج پروتئین: برای بدست آوردن پروتئین‌های کلون شده از بار مثبت موجود بر رزین نیکل و بار منفی ناشی از وجود۶ هیستیدین انتهایی که در انتهای ژن‌ها قرار دارند استفاده گردید. در این روش از washing bufferهای با غلظت ایمیدازول متفاوت استفاده شد و با افزایش مقدار ایمیدازول در ابتدا پروتئین‌های که به صورت غیر اختصاصی و با نیروی کمی به رزین‌ها متصل شده‌اند جدا می‌شوند. سرانجام در مقدار مشخصی از ایمیدازول پروتئین‌های تولید شده خارج می‌گردد. باید توجه داشت که شستشو باید به آهستگی ولی چندین بار انجام شود. چون ممکن است پروتئین‌های غیر اختصاصی از رزین‌ها جدا شوند ولی از میان آن‌ها خارج نشوند. پروتئین‌های فیوز شده به برچسب هیستیدینی را به دو روش دناتوره و غیر دناتوره تخلیص می‌کنند. در روش دناتوره پروتئین‌ها بوسیله اوره ۸ مولار یا گوانیدیوم هیدروکلراید ۶ مولار دناتوره شده و از ستون تخلیص عبور داده می‌شوند. روش دناتوره زمانی بکار می‌رود که به دلیل ساختار فضایی پروتئین برچسب هیستیدینی در سطح پروتئین نباشد. در این حالت پس از مرحله تخلیص باید پروتئین مجدد تا زده شود تا کارایی لازم را بدست آورد. استفاده از روش دناتوره با محدودیتهایی همراه است. زیرا در بعضی موارد تا زدن دوباره پروتئین مشکلاتی را به همراه دارد.

روش غیر دناتوره که در این تحقیق استفاده شد زمانی بکار می‌رود که برچسب هیستیدینی در حالت تاخورده پروتئین در معرض باشد. در پژوهش حاضر برچسب هیستیدینی به انتهای (کربوکسیل) پروتئین متصل شد.

بااستفاده از ستون نیکل که از کمپانی کیاژن خریداری شده بود(The QIAexpressionist ™۲۰۰۱) پروتئین ۱۰۰٪ خالص نمی‌شود. زیرا سلول پروتئین‌های غنی از هیستیدین دارد که بطور غیر اختصاصی به ستون متصل می‌شوند.

پیمایش تراکم سنجی ژل رنگ آمیزی شده با کوماسی‌بلو به منظور بررسی کمی بیان پروتئین نوترکیب، از روش پیمایش ژل رنگ آمیزی شده حاصل از SDS-PAGE توسط دستگاه پیمایشگری pharmacia LKB. Ultrascan XL استفاده گردید.

شوک اسمزی: برای بدست آوردن پروتئن‌های پری‌پلاسمی لازم است دیواره خارجی باکتری تخریب گردد به این منظور ازمحلول TES که شامل (سوکروز، EDTA و Tris-HCL) در مقادیر متفاوت آب استفاده گردید و به تدریج مقدار آب افزایش داده شد تا با بررسی حالات متفاوت بهترین غلظت را که تنها باعث خروج پروتئین‌های پری‌پلاسمی می‌شود و سلول را نمی‌ترکاند به دست بیاید. ۱/۵ میلی‌لیتری از کشت باکتری نمونه بردرای شده در ۴ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۴۰۰۰ rmp به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محیط کشت به طور کامل خارج شد. رسوب باکتری در ۱۵ µl از بافر TES حل شده و به مدت ۲۰ دقیقه با

Archive of SID
www.SID.ir

تکان‌های متناوب بر روی یخ نگاه داشته شد. سپس با افزودن ۲۲/۵ µL آب دوبار تقطیر انکوباسیون بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت.

به منظور تفکیک پروتئین‌های پری‌پلاسمی، مخلوط سلولی پس از شوک اسمزی، به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. روشناور حاوی پروتئین‌های پری‌پلاسمی و رسوب حاوی پروتئین‌های اسفروبلاستی است.

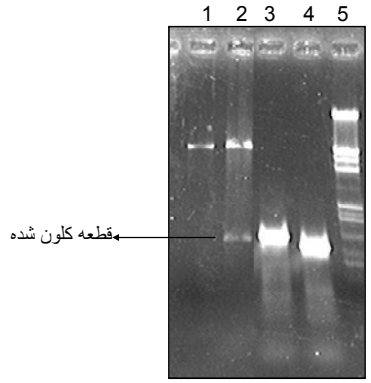
برای فعال سازی هر دو فرم آنزیم کیمزین در ph=4.5 قرار گرفتند. پس از ۵ ساعت توسط بافر فسفات ۲۰ برابر رقیق شد تا PH=7 رسید و فعال سازی خاتمه یافت. رقت‌های مختلف از هر دو فرم آنزیم به شیر خشک ۱۰ درصد که در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار و کلرید کلسیم ۲۵ میلی مولار حل شده بود اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت قرار گرفت [۱۱].

نتایج

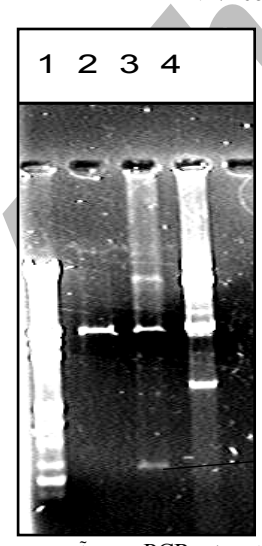
بعد از انجام PCR با پرایمرهای طراحی شده عمل هضم آنزیمی با دو آنزیم *NCO*I و *NOT* I برای قطعات حاصل از PCR و وکتور انجام گرفت. سپس جهت Ligation از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده گردید در ادامه طی مراحل شوک گرمایی و الکتروپوریشن *E-coli* ترانسفورم گردید و بر روی محیط LB-agar حاوی آنتی‌بیوتیک کاناماسین کشت داده شد. از سلول‌های مستعد بدون ناقل نیز بعنوان کنترل منفی استفاده گردید.

از کلنی‌های رشد یافته انتخاب و در محیط LB-Broth حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. جهت تائید کلونی‌ها واکنش quick check انجام گرفت و پس از تخلیص پلاسمید مراحل بعدی کنترل با هضم آنزیمی و PCR دنبال گردید. (شکل ۲ و ۳) جهت تائید نهایی نیز سفارش سکانسینگ داده شد.

بررسی بیان پروتئین: باکتری‌های BL21 DE3 ترانسفورم شده (حاوی ژن کیموزین در وکتور PET) در محیط مایع کشت داده شدند بعد از رسیدن به OD= ۰/۶ برای روشن کردن پروموتر T7 و تولید پروتئین کلون شده IPTG باغلظت ۱میلی‌مولار به محیط اضافه گردید و در زمان‌های ۰و۲و۴و۸ ساعت پس از القاء نمونه برداری انجام گرفت و میزان بیان پروتئین کیموزین بر روی ژل اکریل‌آمید بررسی گردید. میزان بیان هر دو فرم پروکیموزین با دستگاه پیمایشگر ژل بررسی شد. (شکل۴)



شکل ۲. (ژل آگارز ۱٪): PCR و برش آنزیمی برای پروکیموزین کامل ۱- وکتور برش خورده. ۲- پلاسمید نوترکیب برش خورده با دو آنزیم ۳- محصول PCR ژن پروکیموزین کامل با آنزیمpfu. ۴- محصول PCR ژن پروکیموزین پردازش یافته با آنزیم pfu ۵- نشانگر اندازه λDNA/EcoRI+HindIII،



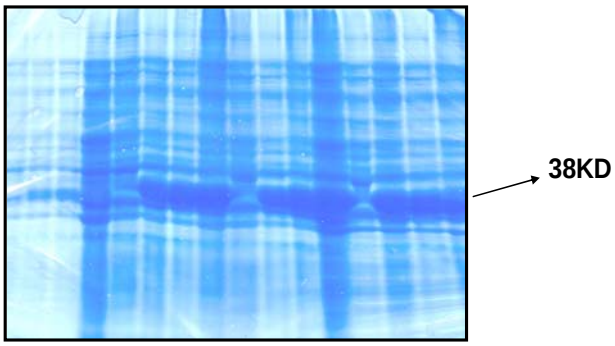
شکل ۳. (ژل آگارز ۱٪): PCR وبرش آنزیمی برای پروکیموزین پردازش یافته

۱ - نشانگر اندازه به ترتیبSM0321 #و SM0191 # ۲- پلاسمید برش خورده توسط دو آنزیم *Nco*Iو *Not*I از ژل۱٪ ۳- خروج ژن کیموزین پردازش یافته از پلاسمیدنوترکیب برش خورده توسط دو آنزیم *Nco*I و *Not*I

Archive of SID
www.SID.ir

وسترن‌بلات: برای اثبات بیان هر دوفرم ژن مورد نظر و بررسی پروتئین‌های پری‌پلاسمی از حالت شوک اسمزی و بیان سیتوپلاسمی دو ژل اکریل امید ۱۰درصد تهیه گردید و یکی را برای وسترن‌بلات و دیگری به عنوان شاهد استفاده گردید. (شکل۵).

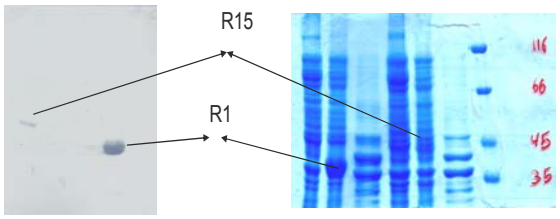
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



شکل ۴. (ژل۱۰٪ SDS-PAGE). بیان ژن کیموزین پردازش یافته برروی وکتور pET26b.

۱ تا ۴- باکتری همراه با وکتور القاء شده با IPTG. ۵ تا ۸ – القاء شده با IPTGدر زمان‌های ۰ و۲ و ۸و ۱۵ساعت. ۹ تا ۱۲- القاء شده با IPTG در زمان‌های ۰ و۲ و۸ و۱۵ ساعت. ۱۳ تا ۱۶- القاء شده با IPTG در زمان‌های ۰ و۲ و۸ و۱۵ ساعت.

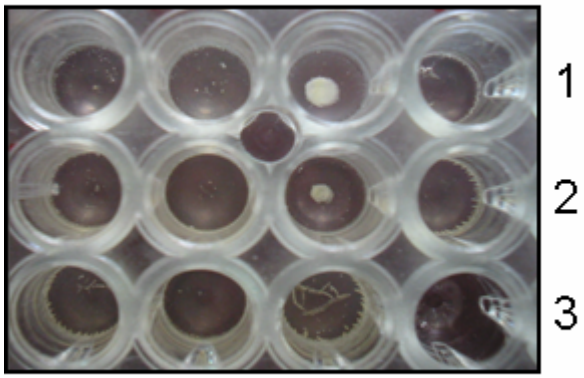
6 5 4 3 2 1 1 2 3 4 5 6 7



شکل ۵. وسترن بلاتینگ برروی پروتئین‌های حاصل از بیان ژن کیموزین ۱ – کیموزین پردازش یافته قبل از القاء ۲ – کیموزین پردازش یافته ۱۵ ساعت بعد از IPTG ۳ – پروتئین‌های حاصل از شوک اسمزی ۴ – کیموزین کامل قبل از القاء ۵ – کیموزین کامل ۱۵ ساعت بعد از IPTG ۶ – پروتئین‌های حاصل از شوک اسمزی ۷ – نشان‌گر اندازه۱۱۶ KD, 66.2KD,45KD, 35KD, 25KD

بررسی فعالیت آنزیمی: رقت‌های مختلف از هر دو فرم آنزیم به skim milke ۱۰درصد که در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و کلرید کلسیم ۲۵ میلی‌مولار حل شده بود اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. رسوب در ته ویال‌ها جمع گردید همانگونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود با افزایش مقدار آنزیم رسوب بیش‌تری مشاهده می‌گردد و در ردیف ۳ که مقادیر متفاوت از عصاره حاصل ازسونیکاسیون باکتری BL21 بدون ژن مورد نظر قرار گرفته رسوبی مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد عمل‌کرد مربوط به پروتئین کلون شده می‌باشد. برای مشاهده بهتر بعداز عمل رسوب گذاری مایع رویی با دستمال جاذب به آرامی برداشته شد. (شکل۶).

A B C D



شکل۶. بررسی فعالیت هر دو فرم کیموزین

۱- a,b,c حاوی ۵۰و۱۰۰و۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی کیموزین پردازش یافته d حاوی شیر ۲- a,b,c حاوی ۵۰و۱۰۰و۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی کیموزین کامل d حاوی شیر ۳- a,b,c حاوی ۵۰و۱۰۰و۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی باکتری لیز شده d حاوی شیر

بحث و نتیجه‌گیری

با وجود تولید پروتئازهای میکروبی و استفاده از آن‌ها در فرایند تولید پنیر، کیموزین دامی هنوز به عنوان بهترین و با ارزش‌ترین آنزیم لخته کننده در صنایع پنیر سازی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و برای ارزیابی و استاندارد کردن سایر پروتئازها مورد استفاده قرار می‌گیرد. کیموزین به دلیل قابلیت لخته کنندگی بالای پروتئین شیر و فعالیت پروتئازی پائین به عنوان یک پروتئاز اختصاصی برای لخته کردن شیر و تولید پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم بر خلاف سایر پروتئازها از رسیدگی بیش از حد پنیر و تلخی آن جلوگیری می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئاز سویه های قارچی در مقایسه با کیموزین، دارای نسبت قدرت لخته کنندگی به فعالیت پروتئازی پایین‌تری می‌باشند. این ویژگی در پنیرهایی نظیر پنیر ایرانی که دارای دوره رسیدگی می‌باشند موجب کاهش راندمان پنیر و تلخی آن می‌گردد. در ضمن پروتئازهای قارچی دارای پایداری حرارتی بالایی هستند. این ویژگی در فرآیند پنیر سازی مطلوب نیست. در ضمن سویه های قارچی علاوه بر پروتئاز، سایر آنزی‌مها به خصوص لیپاز را هم تولید می‌کنند که لیپاز سبب تجزیه چربی پنیر شده و موجب تندی آن می‌گردد.

باکتری گرم منفی *Escherichia coli* بعلت اطلاعات ژنتیکی شناخته شده و همچنین در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های همسانه‌سازی و ناقل‌های بیانی و سویه‌های جهش یافتهٔ و امکان تولید مقادیر انبوه پروتئین نوترکیب استفاده از این میکروارگانیسم برای تولید پروتئین نوترکیب ارزشمند می‌باشد. مشهورترین سویهٔ *E.coli* BL21 و مشتقاتشان هستند و بطور طبیعی فاقد پروتئازهای Lon (پروتئاز تجزیه کننده پروتئین‌های غیر طبیعی) و OmpT (پروتئاز غشاء خارجی که پروتئین های حاصل از شکستن سلول‌ها را هضم می کنند) می باشند. سلول‌های فاقد این پروتئازها، پروتئین‌های نوترکیب را بسرعت انباشته کرده و احتمال تجزیهٔ تعدادی از پروتئین‌ها در طول تخلیص کمتر می‌باشد [۱۱و۱۲و۱۳]. بنابراین *E.coli* BL21 که از سیستم بیانی وابسته به T7RNA پلی مراز استفاده می‌کند، میزبان مناسبی برای همسانه‌سازی و بیان ژن پروکیموزین تحت کنترل آغازگر (پروموتور) T7 می‌باشد.

پری پلاسم در مقابل سیتوپلاسم تنها ۴٪ از پروتئین‌های تام سلولی را شامل می‌شود. به علت محیط اکسید کننده پری‌پلاسم، محافظت پروتئینی در برابر پروتئازهای سیتوپلاسمی، تشکیل انتهای آمینی صحیح در پروتئین نوترکیب تولید شده و اجتناب از ایجاد اینکلوژن بادی ناشی از بیان پروتئین نوترکیب درسیتوپلاسم این فضا نسبت به بیان سیتوپلاسمی ترجیح داده می‌شود. فضای پری پلاسمی باکتری *E. Coli* به ویژه محیط مناسبی برای تولید انواع پروتئین‌های انسانی و سایر پروتئین‌های پستانداران واجد اسید آمینه سیستئین می‌باشد.

Protein disulfide isomerase که در *E. coli*، DsbC نامیده می‌شود و اکسیداسیون باندهای دی‌سولفیدی را بر عهده دارد وPPIase که ایزومریزاسیون باندهای X- pro را کاتالیز می‌نماید، پروتئین‌هایی هستند که امکان تاب خوردگی صحیح پروتئین بیگانه را در فضای پریپلاس *E. coli* فراهم می نمایند. [۱۴و۱۵و۱۶].

با توجه به خصوصیات فوق فضای پری‌پلاسمی باکتری *E.coli* BL21 مکان مناسبی برای تولید پروتئین می‌باشد بنابراین در این تحقیق سعی شد با انتخاب وکتور مناسب و سیگنال مقادیر زیاد پروتئین تولید و به پری‌پلاسم هدایت گردد. همچنین میزان بیان و فعالیت فرم فاقد اگزون ۶ بررسی گردید. میزان تولید فرم پردازش یافته ۷ برابر فرم کامل بود. علت این افزایش بیان بدین ترتیب توضیح داده شد: اگزون ۶ دارای ۳۸ اسید آمینه می باشد که ۱۲ تای آن‌ها بشدت و ۱۷ تای دیگر بمیزان کمتری آب‌گریز می‌باشند. یکی از عوامل مهم در تعیین میزان بیان پروتئین‌های یوکاریوتی در میزبان‌های باکتریایی، طبیعت هیدروفوبیک پلی پپتید می‌باشد. گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر آنکه تعویض اسیدهای آمینهٔ هیدروفوب با اسیدهای آمینهٔ خنثی موجب افزایش بیان در باکتری‌ها می‌گردد.

فرم پردازش یافته و کامل پروکیموزین بعد از شوک اسمزی و در شرایط متفاوت از قبیل کاهش دما (در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و کاهش میزان IPTG (در غلظت نیم میلی‌مولار) بررسی شدند و در فضای پری‌پلاسمی مشاهده نشدند بنابر این سیگنالpelB قادر به هدایت هیچ یک از این دو به پری‌پلاسم نیست. از آنجا که در مطالعات اولیه و با استفاده از نرم افزار signal P ترشحی بودن پروتئین بررسی شده بود و در نهایت نتایج متفاوتی حاصل شد باید در استفاده از این برنامه دقت لازم صورت گیرد. اما اتصال این سیگنال باعث افزایش حلالیت پروتئین گردید و در سانتریفیوژ با سرعت زیاد میزان اینکلوژن‌بادی کاهش یافت وپروتئین در

Archive of SID

www.SID.ir

رسوب وجود داشت وامکان تخلیض بـه روش غیـر دنـاتوره فراهم گردید این مسئله باید در مراحل بعد بررسی گردد. بنابر این وکتور از لحاظ بیانی مناسب است ولـی از نظـر ترشـحی مناسب نیست .د رادامه طرح بهتر است ژن مـورد نظـر بـدون سیگنال ترشحی و با استفاده از آنزیم *Nde*I به جای *Nco*I در وکتور کلون گردد ویا سیگنال جدیدی طراحی گـردد. حـذف اگزون ۶ مانع تولید آنزیم فعال نمی‌شود ایـن فـرم از پـروتئین درمقایسه با فرم کامل به میزان بیش‌تری تولید می‌شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز ملی ژنتیک بدلیل تامین هزینه‌هـای ایـن طرح و مسئولان مجله کومش که در جهت هر چه بهتـر شـدن مقاله از هیچ کوششی دریغ نکردند.

منابع

[1] Carey NH, Doel MT, Harris TJR, Lowe PA, and Emtage JS. A process for the production of a polypeptide. Patent: 1983; EP 0068691-A 29.

[2] Danley DE, and Geoghegan KF. Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin. C. J Biol Chem 1988; 263: 9785-9789

[3] Emtage JS, Angal S, Doel MT, Harris TJ, Jenkins B, Lilley G, Lowe PA. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in Escherichia coli. PNAS 1983; 80: 3671-3675.

[4] Foltmann B. A review on prorennin and rennin. Coppt Rend Trav Lab Carlsberg 1966; 35: 143-231.

[5] Foltman, B., 1987. General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, Editor. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1. London: Elsevier., pp: 37-68.

[6] Chitpinityol, S. and Crabbe, M.J.C. 1998. Chymosin and aspartic proteinase: review. Food Chem 61: 395-418.

[7] Blundell TL, Andreeva N. X-ray analyses of aspartic proteinases. IV. Structure and refinement at 2.2 A resolution of bovine chymosin. J Mol Biol 1991; 221: 1295-1309.

[8] Zinovieva N., Muller M., and Brem G, Short communication: Identification and characterization of multiple splicing forms of bovine prochymosin mRNA. J Dairy Sci 2002; 85: 3476- 3479.

[9] Moir D., Monod, M., Togni G, and Hube B. Molecular cloning and characterization of double- stranded cDNA coding for bovine chymosin, Gene (Amst.). 1982; 19: 127- 138.

[10] Green ML. Advances in the microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk (Eds Davies, FL. and Law , BA.). Applied Science Publication. England. 1984; pp:1-34.

[11] Hakki A, Uusitalo J, Bailey M, Pentila M, and Knowles JKC. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus Trichoderma reesei. Biotechnology 1989; 7: 596-603.

[12] Hidaka M, Sasaki K, Uozumi T, and Beppu T. Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. Gene 1986; 43: 197-203.

[13] Housen G, Madsen MT, Harlow KW, Lonblad P, and Foltmann B. The primary structure and enzymatic properties of porcine prochymosin and chymosin. Int J Biochem Cell Bio. 1996; 28: 667-675.

[14] Yang B., Tang B., Zhang S, and Yang K. Assisted refolding of recombinant prochymosin with the aid of protein disulphide isomerase. Biochem J 1994; 301: 17- 20.

[15] Sorensen H.P, and Mortensen K.K, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Biotechnol. 2005; 115, 113- 128.

[16] WEI C, Tang B, Zhang Y, and yang H. Oxidative refolding of recombinant prochymosin. Biochem J 1999; 340: 345-351.

Archive of SID

www.SID.ir

Production of full length and splicing form of chymosin using pETexpression system in *E-coli* and investigation its enzyme activity and preplasmic secretion

M. Ahmadi Zeydabadi (M.Sc)[1] G. Ahmadian (Ph.D)[*2], R. Sorouri (Ph.D) [3]
1- Emam hossein university, Tehran, Iran.
2- Department of Molecular Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology Tehran Iran.
3- Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Introduction: Chymosin (Rennin EC 3.4.23.4) is an aspartyl proteinas (the major proteolytic enzyme in the fourth stomach of the unweaned calf) that is formed by proteolytic activation from zymogene prochymosin. The aim of his study was to produce the full length and splicing form of chymosin using pETexpression system in *E-coli* and to assay the activity of expressed enzyme and preplasmic secretion.

Materials and Methods: The sense primer F-prochy(+) (5´-ggggccatgGCTGAGATCACCAGGA) including *NCO*I restriction site). The anti sense R-prochy(-) (5´-gggcggccgcGATGGCTTTGGCCAGC -3´) hybridizing to the C-terminal end of calf preprocymosin cDNA and contains an additional *Not*I restriction site at its 5´-end . The cells were disrupted by sonication and proteins were purified by using Ni-NTA beads from Qiagen under native conditional. The preprochymosin and AS6 preprochymosin were activated at pH 4.7. The enzyme solutions were diluted 20-fold with 50 mM phosphate buffer .

Results: Sequencing data analysis showed that the exon six has been spliced out and, therefore the gene product is 114 bp shorter in length, both chymosin forms were expressed together in *E.coli*. Under the same expression conditions, at least AS6 preprochymosin was produced 7-fold high expression in comparison to a full-length recombinant chymosin. Following acid activation and neutralization, the purified fractions were tested in a qualitative milk clotting assay. The clotting activity of preprochymosin and exon6-less preprochymosin were comparable.

Conclusion: High expression of this alternatively expressed transcript in bacteria, and proper folding of the AS6 chymosin protein molecule in the absence of exon six are the two most important aspects distinguished in this research.

Keywords: Preprochymosin; Aspartyl proteinase; Alternatively spliced transcript; In vitro, *E.Coli*

* Corresponding Author. Fax: +98 21 44580395; Tel: +98 9124187608
ahmadian@nigeb.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir