بیان ترشحی ژن بتا–گزایلوزیداز باکتریایی حاوی برچسب هیستیدین در پیکیا پاستوریس

شیرین یوسفیان [1*](M.Sc)، سید امید رعنایی‌سیادت [1](Ph.D)، احسان دهنوی [1و2](Ph.D)، محمدتقی برجیان‌بروجنی [1](M.Sc) فرناز نیکزادجمنانی [1و3](M.Sc)

۱- *دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی*

۲- *دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده‌ی علوم زیستی*

۳- *دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی*

چکیده

سابقه و هدف: بتا-گزایلوزیدازها (EC 3.2.1.37)، از مهم‌ترین آنزیم‌ها در مجموعه آنزیم‌های همی‌سلولازی با پتانسیل کاربرد بالا در صنعت از جمله تولید بیواتانول، از خانواده گلیکوزیدازها بوده که حذف متوالی بقایای بتا-گزایلوزیل را از انتهای غیر احیاکننده‌ی گزایلوبیوز و گزایلوالیگوساکاریدهای خطی با پیوندهای β-1,4 انجام داده و به همراه بتا-گزایلانازها، برای دپلیمریزه کردن کامل گزایلان ضروری می‌باشند. هدف از این تحقیق بیان ترشحی ژن بتا-گزایلوزیداز باکتریایی حاوی برچسب هیستیدین در میزبان بیانی پیکیاپاستوریس، جهت رسیدن به افزایش سطح بیان و سپس خالص‌سازی نسبی آنزیم بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق توالی پروتئینی آنزیم بتا-گزایلوزیداز باکتریایی پس از بهینه‌سازی کدون برای میزبان بیانی Pichia pastoris، و افزودن توالی 6xHis-tag با طراحی پرایمرهای مناسب، به میزبان مخمری انتقال یافت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده در کشت فلاسک، تولید ۴۰ U/L آنزیم بتا-گزایلوزیداز نوترکیب با فعالیت ویژه‌ی ۰/۶ U/mg را در محیط بیانی BMMY نشان داد.

نتیجه‌گیری: کلونینگ و بیان موفق ژن بتا-گزایلوزیداز باکتریایی جهت به‌دست آوردن آنزیم فعال و پایدار از سیستم بیانی مخمر، با مقدار بالای بیان آنزیم انجام شد.

واژه‌های کلیدی: مخمرها، گزایلوزیدازها، هیستیدین، بیان ژنی

مقدمه

بقایای کشاورزی گوناگون، از جمله فیبر ذرت و تفاله نیشکر حاوی ۴۰-۲۰٪ همی‌سلولز، می‌باشند [۱]. همی‌سلولزها (گزایلان‌ها، آرابینوگزایلان‌ها) که از اجزای ساختاری در دیواره سلول‌های گیاهی می‌باشند، دومین پلی‌ساکاریدهای فراوان در روی زمین محسوب می‌شوند. توده لیگنوسلولزی که اساساً تشکیل شده از سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است، می‌تواند به عنوان یک منبع، نیاز در حال رشد ما را، به منابع تجدیدپذیر انرژی تامین کند [۲]. گزایلان فراوان‌ترین همی‌سلولز می‌باشد [۴،۳]. از نظر ساختاری،

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۹۶۷۸۵۰ نمابر: ۰۲۱-۲۲۴۳۱۷۸۲
Email: sh_yousefian67@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۱۹۳۱/۱۱/۲۴

Archive of SID
www.SID.ir

گزایلان‌ها هتروپلی‌ساکاریدهایی هستند که از پیوند خطی β-D-(1→4) تشکیل شده و با توجه به منبع بافت با ریشه‌های ال-آرابینوزیل، دی-گالاکتوزیل، استیل و... جای‌گزین می‌شود [۵،۳]. تجزیه‌ی کامل گزایلان یک مرحله‌ی کلیدی در چرخه‌ی کربن بوده و به دلیل غیر یکنواختی و طبیعت پیچیده‌ی شیمیایی گزایلان گیاهی، تجزیه کامل آن نیازمند فعالیت چندین آنزیم هیدرولیزکننده (همی‌سلولازها) با اختصاصیت و طرز عمل متفاوت می‌باشد [۴]. مهم‌ترین آنزیم‌های گزایلانولیتیک عبارتند از: اندو-۱،۴ گزایلاناز، که اسکلت گزایلان غیر محلول را به گزایلوالیگوساکاریدهای کوتاه‌تر محلول هیدرولیز کرده و بتا-گزایلوزیداز، که گزایلوالیگوساکاریدهای محلول و گزایلوبیوز را از انتهای غیر احیاکننده هیدرولیز کرده و گزایلوز آزاد می‌کند [۴،۳]. میکروارگانیزم‌ها اساساً مسئول تجزیه‌ی گزایلان در طبیعت می‌باشند. از این رو وجود بتا-گزایلوزیدازها در انواع مختلفی شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها گزارش شده است [۷،۶].

بتا - دی - گزایلوزیداز از باکتری Selenomonas ruminantium (SXA) پارامترهای کینتیکی آن در مقایسه با بتا - گزایلوزیدازهای گزارش شده از دیگر گونه‌ها حدوداً ۱۰ برابر بزرگ‌تر بوده و در ترکیب با فعالیت گزایلانازها، SXA دارای پتانسیل کاربردی بسیار بالا در پروسه‌های تبدیل زیست توده‌ی گیاهی به قندهای ساده قابل تخمیر برای تولیدات زیستی همانند اتانول زیستی می‌باشد [۹،۸،۶].

به عنوان یک یوکاریوت، Pichia pastoris بسیاری از فواید سیستم‌های بیانی یوکاریوت‌های پیش‌رفته‌تر، از جمله پردازش پروتئین، فولدینگ پروتئین و تغییرات پس از ترجمه را دارا می‌باشد. در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی یوکاریوتی سریع‌تر، راحت‌تر و با هزینه کم‌تر برای استفاده بوده و سطوح بالاتری از بیان را دارا می‌باشد. به عنوان یک مخمر، P.pastorisخصوصیات مفید دست‌کاری شده، از نظر مولکولی و ژنتیکی در مخمر Saccharomyces cerevisiae را هم دارا می‌باشد.

این خصوصیات P.pastoris را به عنوان یک سیستم بیانی کارآمد معرفی می‌کند [۱۵،۲-۱۰].

فرآیند خالص‌سازی پروتئین‌ها در صنعت که شامل جداسازی آن از ترکیبات غیر پروتئینی و نهایتاً خالص‌سازی آن از دیگر پروتئین‌های غیر هدف می‌باشد، فرآیندی دشوار و پرهزینه است. با اضافه کردن توالی شش آمینواسیدی هیستیدین به توالی‌های پروتئین می‌توان آن‌ها را با استفاده از ستون نیکل به راحتی و با خلوص بالا، خالص‌سازی کرد [۱۶].

هدف از این تحقیق اضافه کردن برچسب هیستیدین به ژن بتاگزایلوزیداز Selenomonas ruminantium و بیان ترشحی آنزیم در مخمر صنعتی پیکیاپاستوریس با استفاده از توالی آلفا فاکتور مخمری به منظور رسیدن به افزایش سطح بیان و سپس خالص‌سازی نسبی آنزیم تولید شده پس از بیان در این میزبان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آنزیم‌های محدودگر XhoI و KpnI متعلق به شرکت Vivantis بود. آنزیم DNA پلی‌مراز Max-tag، T4 DNA لیگاز و کیت استخراج پلاسمید، از شرکت Vivantis خریداری شد که طبق شرایط توصیه شده استفاده گردید. سوبسترای پارانیتروفنیل گزایلوپیرانوزید (PNPX) از شرکت سیگما خریداری شد. سویه باکتری مورد استفاده اشرشیاکلی DH5α بوده و از پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک خریداری شد.

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها. از محیط‌های LB و LB-Agar حاوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جهت کلونینگ استفاده گردید. آمپی‌سیلین مورد استفاده به عنوان آنتی‌بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

سنتز ژن. توالی پروتئینی آنزیم بتا-گزایلوزیداز باکتری *Selenomonasruminantium* با طول ۱۶۱۴ bp از بانک‌های اطلاعاتی پروتئین (GenBank accession no. AF040720.1) استخراج شده، و با توجه به ترجیح کدونی پیکیاپاستوریس، توالی ژن طراحی و برای سنتز به شرکت

Archive of SID

www.SID.ir

GENE ARTآلمان فرستاده شد. ژن مورد نظر به صورت کلون شده در وکتورPMK بین دو جایگاه برش XhoI و KpnIبه آزمایشگاه تحویل داده شد. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به کاناماییسین به عنوان مارکر انتخابی می‌باشد.

پرایمرها: پرایمرهای بالادست و پایین‌دست پس از طراحی و آنالیز کامپیوتری توسط شرکت سیناکلون سنتز گردید و در جدول ۳ آمده است. این دو پرایمر برای افزودن توالی شش آمینواسیدی هیستیدین به ژن نوترکیب بتاگزایلوزیداز طراحی گردید. برای افزایش DNA در شرایط آزمایشگاهی واکنش Touchdown PCR طبق جدول ۱ و ۲ انجام گردید.

جدول۱. مواد مورد نیاز در واکنش PCR و مقدارآن‌ها

مواد	مقدار (μl)
بافر10X PCR	۲
dNTPs 1mM	۰/۵
$Mgso_4$ 50mM	۰/۸
پرایمربالا دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر	۰/۵
پرایمرپایین دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر	۰/۵
آنزیم Max-tag	۰/۳
الگو 100ng(cDNA)	۱
آب مقطر(آمپولی)	۱۴/۴
حجم نهایی	۲۰

جدول ۲. برنامه‌ی Touchdown-PCR برای اضافه کردن برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به انتهای ژن بتا-گزایلوزیداز

تعداد سیکل‌ها	زمان (دقیقه)	دما (سانتی‌گراد)
۱	۵	۹۵
۵	۰/۵	۹۵
	۰/۵	۵۳
	۱/۵	۷۲
۲۵	۰/۵	۹۵
	۰/۵	۵۹
	۱/۵	۷۲
۱	۱۰	۷۲

جدول ۳. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و توالی آن‌ها

نام	توالی	توضیحات
Xs43His FWD	5'GAGCTCCTCGAGAAAA GGCCTATG	پرایمر بالادست ژن
Xs43His REV	5'AGGGTACCCTACTAGT GGTGGTGGTGGTGGTGA TCCAACTCTTTG	پرایمر پایین دست ژن

لیگاسیون به درون وکتور PTG19-T و ترانسفورم DNA نوترکیب به درون باکتری اشرشیاکلی. ژن نوترکیب بتاگزایلوزیداز به همراه توالی شش هیستیدین با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز به درون وکتور PTG19-T انتقال یافته و پس از انجام مراحل لیگاسیون و تهیه‌ی سلول‌های باکتریایی مستعد [۱۷] محصول لیگاسیون با استفاده از روش شوک حرارتی به درون سلول‌ها منتقل شد.

کلونینگ ژن در باکتری اشرشیاکلی. پس از انتقال پلاسمید PTG19-T به باکتری با استفاده از روش انتقال شوک حرارتی، باکتری‌ها را در محیط LB حاوی ۰/۵٪ عصاره‌ی مخمر، ۱٪ تریپتون و ۱٪ سدیم کلرید، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکرانکوباتور با دور ۳۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد و بدین ترتیب مقدار زیادی از پلاسمید را به دست آمد.

پس از انتقال باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت‌های حاوی IPTG, X-gal, amp به علت وجود ماده‌ی X-gal در داخل این پلیت‌ها، پس از فعال شدن آنزیم بتاگالاکتوزیداز در اثر حضور IPTG، کلنی‌های حاوی وکتور فاقد ژن، تنها به رنگ آبی و کلنی‌های حاوی سازه‌ی دارای ژن، به رنگ سفید مشاهده می‌شوند [۱۹،۱۸].

لیگاسیون به درون وکتور دوگانه‌ی pPink-HC: پس از استخراج پلاسمیدهای PTG19-T که حاوی توالی بتا-گزایلوزیداز حاوی برچسب شش هیستیدین بودند، تمام مراحل کلونینگ همانند انتقال وکتور PTG19-T به باکتری اشرشیاکلی انجام و باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت‌های انتخابی حاوی آمپی‌سیلین گزینش شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

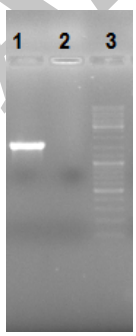
تهیه‌ی سلول‌های مستعد مخمر، انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان و بیان ژن مطابق دستورالعمل سازنده کیت (Invitrogen) انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن SXA توسط آنزیم BglII به شکل خطی در آمده و توسط روش الکتروپوریشن در شرایط ۱۸۰۰ v، ۲۰۰ A و ۲۵ اهم به میزبان بیانی مستعد Pichia pastoris منتقل شد. محصول انتقال بر روی پلیت PAD (Pichia Adenine Dropout) کشت داده شد. پلیت مورد نظر به مدت حداقل ۳ روز جهت رشد کلونی‌های مورد نظر در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد [۲و۲۰].

بررسی بیان آنزیم بتا-گزایلوزیداز در کلونی‌های نوترکیب مخمر: حدود ۲۰ کلون مخمر که در محیط PAD رشد کرده بودند، در ۱۰ میلی‌لیتر محیط BMGY (Buffered Complex Glycerol Medium) حاوی عصاره مخمر ۱٪، پپتون ۲٪، بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ M (pH=6)، YNB ۱/۳۴٪، بیوتین $^{-5}$۱۰×۴٪ و گلیسرول ۱٪، به مدت ۱ شب در ۳۰-۲۹ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۷۵ rpm کشت داده شدند، بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها و خارج کردن محلول رویی، رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط BMMY (Buffered Complex Methanol Medium) حاوی عصاره مخمر ۱٪، پپتون ۲٪، بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ M (pH=6)، YNB ۱/۳۴٪، بیوتین $^{-5}$۱۰×۴٪ و متانول ۱٪، سوسپانسیون شده و جهت القای پروموتر AOX1 متانول در غلظت نهایی ۰/۵٪ به مدت ۲۴ ساعت اضافه گردید. بیان بتا-گزایلوزیداز نوترکیب و سنجش فعالیت آن با کمک پارانیتروفنیل گزایلوپیرانوزید (PNPX) به عنوان سوبسترا انجام شد. با استفاده از SDS-PAGE بیان و ترشح پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور محیط کشت مخمر از سلول‌ها جدا شده، پروتئین‌های محلول در آن توسط سولفات آمونیوم ۴M رسوب داده شده و نمونه‌ی پروتئین توسط SDS-PAGE الکتروفورز شد.

سنجش فعالیت آنزیمی. سنجش فعالیت آنزیمی بتا-گزایلوزیداز از طریق اندازه‌گیری مقدار پارانیتروفنل آزاد شده از سوبسترای PNPX انجام شد. این سنجش در دمای ۵۰ °C و بافر سیترات pH=۸/۴ ۵۰ mM، مقدار ۵۰ µl از PNPX ۱۰Mm و مقدار مناسب از محلول آنزیمی رقیق شده در حجم کلی ۰/۵ ml انجام شد. مقدار جذب پارانیتروفنل آزاد شده بعد از مدت زمان ۱۰ دقیقه، در طول موج ۴۰۵ nm خوانده شد. واکنش با اضافه کردن ۱ml سدیم کربنات ۱M متوقف گردید [۲۱].

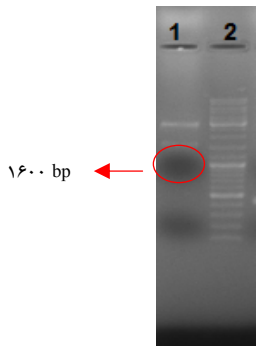
نتایج

کلونینگ ژن بتا-گزایلوزیداز SXA. افزودن برچسب شش هیستیدین به انتهای ژن جهت خالص‌سازی آنزیم تولیدشده پس از بیان، با انجام روش PCR با پرایمرهای طراحی شده، بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد. پس از لیگاسیون ژن نوترکیب بتا-گزایلوزیداز به همراه توالی شش هیستیدین به درون وکتور PTG19-T و انتقال به باکتری جهت تایید حضور ژن از روش PCR استفاده شده و باند مورد نظر رویت شد (شکل۱). همچنین توالی بتا-گزایلوزیداز به همراه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین اضافه شده به انتهای آن پس از انتقال به وکتور PTG19-T با استفاده از آنزیم‌های محدودگر XhoI و KpnI که به ترتیب ابتدا و انتهای ژن را برش می‌دهند، بریده شده و مقداری از آن برای اثبات برش، بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل۲).



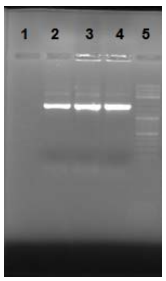
شکل۱. ژل آگارز تایید کننده‌ی کلونینگ ژن نوترکیب حاوی برچسب هیستیدین در وکتور PTG19-T در باکتری می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۱ حاوی XsHis با طول ۱۶۳۲bp. چاهک شماره ۲. کنترل منفی. چاهک شماره ۳. نشانگر GeneRuler™ #SM 0331.

Archive of SID
www.SID.ir

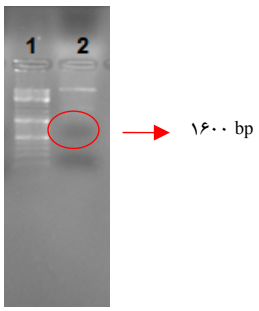


شکل۲. ژل آگارز تاییدکننده‌ی کلونینگ ژن نوترکیب حاوی برچسب هیستیدین در وکتور PTG19-T در باکتری می‌باشد. چاهک شماره ۱ وکتور نوترکیب PTG19-T بریده شده با آنزیم‌های محدودگر XhoI و KpnI که نشان دهنده‌ی توالی بتا-زایلوزیداز با طول ۱۶۳۲bp می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۲ نشانگر GeneRuler™ #SM 0331.

پس از لیگاسیون ژن نوترکیب بتا-گزایلوزیداز به همراه توالی شش هیستیدین به درون وکتور pPink-HC و انتقال به باکتری جهت تایید حضور ژن از روش PCR (شکل۳) و هضم آنزیمی استفاده شد و باند مورد نظر رویت شد (شکل۴).



شکل۳. ژل آگارز تاییدکننده‌ی کلونینگ ژن نوترکیب حاوی برچسب هیستیدین در پلاسمید pPink-HC در باکتری می‌باشد. چاهک شماره ۱ کنترل منفی. چاهک شماره‌ی ۴-۲ حاوی XsHis با طول ۱۶۳۲bp. چاهک شماره ۵ نشانگر GeneRuler™ #SM .0331



شکل۴. ژل آگارز تاییدکننده‌ی کلونینگ ژن نوترکیب حاوی برچسب هیستیدین در پلاسمید pPink-HC در باکتری می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۱. نشانگر GeneRuler™ #SM 0331. چاهک شماره ۲. وکتور نوترکیب PTG19-T بریده شده با آنزیم‌های محدودگر XhoI و KpnI که نشان دهنده‌ی توالی بتا-زایلوزیداز با طول ۱۶۳۲bp می‌باشد.

به دنبال انجام الکتروپوریشن به منظور انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن به مخمر پیکیا پاستوریس و مشاهده‌ی کلونی‌ها به منظور اطمینان از حضور ژن در مخمر با استفاده از روش کلونی PCR با پرایمرهای طراحی شده، کلونینگ ژن در مخمر بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد (شکل۵).

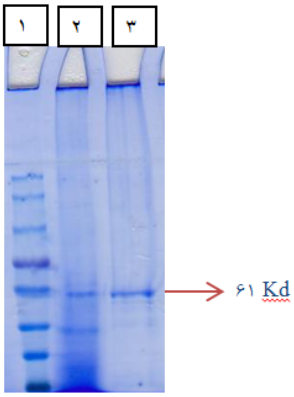
شکل۵. ژل آگارز تاییدکننده‌ی کلونینگ ژن نوترکیب حاوی برچسب هیستیدین در پلاسمید pPink-HC در مخمر می‌باشد. چاهک‌های شماره ۱۰-۱ حاوی XsHis با طول ۱۶۳۲bp. چاهک شماره ۱۱ نشانگر GeneRuler™ #SM 0331. چاهک شماره ۱۲ کنترل مثبت

بیان بتا-گزایلوزیداز نوترکیب. پلاسمید نوترکیب pPink-HC حاوی ژن بتا-گزایلوزیداز باکتریایی پس از خطی شدن با روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد مخمر منتقل و محصول انتقال روی محیط کشت جامد PAD کشت داده شد تا کلونی‌های نوترکیب پدیدار شوند. بعد از پیدایش کلونی‌های نوترکیب بررسی‌های بیان ابتدا با استفاده از آزمایش سنجش فعالیت آنزیمی با کمک پارانیتروفنیل گزایلوپیرانوزید به عنوان سوبسترا انجام شد. صحت بیان ژن نوترکیب در نمونه‌های مثبت توسط SDS-PAGE بررسی شد. نتیجه SDS-PAGE حضور یک باند پروتئینی حدود ۶۱ کیلو دالتون که معادل آنزیم بتا-گزایلوزیداز بود را نشان داد (شکل۶).

نتایج به‌دست آمده از ۵۰۰ ml کشت مخمر در فلاسک حاوی بتا-گزایلوزیداز تولید شده توسط یکی از کلون‌ها، که بیان بالایی را نسبت به سایرین نشان می‌داد، نشان‌دهنده‌ی تولید ۴۰ U/L آنزیم بتا-گزایلوزیداز نوترکیب با فعالیت ویژه‌ی ۰/۶ U/mg در محیط بیانی BMMY می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۶. چاهک شماره ۱ نشان‌گر سیناژن PR.901641. چاهک شماره ۲ بتا-گزایلوزیداز نوترکیب. چاهک شماره ۳. آنزیم تجاری از گونه‌ی Bacillus pumilus با وزن مولکولی مشابه آنزیم نوترکیب

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق توالی ژن گزایلوزیداز برای بیان در مخمر پیکیا پاستوریس بهینه‌سازی گردید. هر سیستم بیانی دارای ذخیره‌ی tRNA متفاوت و در نتیجه در طی ترجمه دارای یک ترجیح کدونی (Codon preference) مشخص می‌باشد.

مقاله‌های بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد بیان پروتئین‌های نوترکیب در این میزبان اگر بر اساس ترجیح کدونی آن باشد بسیار بیش‌تر می‌شود. محققان نشان داده‌اند که وجود کدون‌های نادر سبب افزایش ناپایداری در mRNA حاصل و در نهایت سبب بیان کم‌تر پروتئین می‌گردد. پس از بهینه‌سازی، حدود ۲۲٪ از نوکلئوتیدها تغییر پیدا کردند (۳۶۵ نوکلئوتید از کل نوکلئوتیدهای ژن). در این مطالعه، سیستم بیانی مخمر متیلوتروف Pichia pastoris برای تولید آنزیم بتا-گزایلوزیداز نوترکیب استفاده شد. دلیل انتخاب سیستم بیانی پیکیاپاستوریس در این تحقیق، محاسن متعدد آن از جمله، وجود یک پروموتر قوی (AOX1)، امکان رشد در تراکم بالا در فرمانتور، انجام فرآیندهای پس از ترجمه، دست‌ورزی آسان و خالص‌سازی آسان آنزیم تولیدی به دلیل بیان ترشحی آن بود. بیان پروتئین‌های نوترکیب در P.pastoris به دو صورت ترشحی و داخل سلولی امکان‌پذیر است. از آن‌جایی که پیکیا به طور طبیعی پروتئین‌های کمی به محیط کشت ترشح می‌کند، تخلیص پروتئین در بیان خارج سلولی ساده‌تر است. به دلیل وجود همین محاسن، امروزه این مخمر انتخاب اول بسیاری از محققان برای بیان پروتئین نوترکیب می‌باشد.

با توجه به مطالعات انجام شده بر روی پژوهش‌های انجام شده در داخل و خارج کشور این اولین گزارش از بیان آنزیم بتا-گزایلوزیداز از خانواده ۴۳ گلیکوزیدازها در این مخمر می‌باشد [۲۴-۲۲]. با توجه به هدف این تحقیق، کلونینگ و بیان موفق ژن بتا-گزایلوزیداز باکتریایی جهت به‌دست آوردن آنزیم فعال و پایدار از سیستم بیانی مخمر، با مقدار بالای بیان آنزیم (۴۰ U/L) انجام شد. هم‌چنین در این تحقیق توالی شش آمینواسیدی هیستیدین به منظور خالص‌سازی با موفقیت به ژن نوترکیب بتا-گزایلوزیداز افزوده شد (نتایج خالص‌سازی ارائه نشده است).

تقاضای بازار جهانی برای آنزیم‌هایی که به شکل صنعتی تولید می‌شوند دارای رشد شگرفی می‌باشد. گزیلوزیدازها از جمله مهم‌ترین آنزیم‌ها در مجموعه آنزیم‌های همی‌سلولازی می‌باشند، اما تنها درصد کوچکی از بازار را شامل می‌شوند که البته این میزان به سبب پتانسیل کاربرد بالا در حال افزایش است. گزیلوزیدازها کاربرد وسیعی در صنعت دارند که از آن جمله می‌توان به صنایع غذایی، تغذیه دام و طیور، صنایع خمیر و کاغذ، صنعت نانوایی و تولید بیواتانول اشاره کرد؛ از این‌رو پرداختن به آنزیم بتا-گزایلوزیداز به عنوان بخشی از سیستم همی‌سلولازی مهم می‌نماید.

هدف نهایی از این تحقیق بیان آنزیم در مقیاس انبوه و صنعتی بوده و برای افزایش میزان بیان و تولید آنزیم بتا-گزیلوزیداز از پروموتر القایی AOX1 استفاده شد. به‌دست آوردن آنزیم فعال و پایدار از سیستم بیانی مخمر، هم‌چنین مقدار بالای بیان آنزیم (۴۰ U/L) نشان‌دهنده‌ی طراحی صحیح ژن کدکننده‌ی آنزیم و عمل‌کرد درست القا توسط متانول بود. این گزارش بالاترین میزان بیان آنزیم گزایلوزیداز را در کشت فلاسک در میان میزبان‌های بیانی نشان می‌دهد.

با توجه به این‌که سلول‌های نوترکیب در اثر یک نوترکیبی همولوگ ایجاد می‌شوند، به دلیل تنوع در جایگاه ورود ژن در ژنوم، ممکن است نوآرایی‌های ژنتیکی گوناگون منجر به

Archive of SID

www.SID.ir

کلون‌های مختلف با میزان بیان متفاوت شود. بنابراین برای دست‌یابی به بهترین کلون با بیان بالاتر بایستی تعداد زیادی کلون از لحاظ بیان مورد بررسی قرار گیرند. با سنجش فعالیت آنزیمی با کمک پارانیتروفنیل گزایلوپیرانوزید به عنوان سوبسترا، بهترین کلون از نظر فعالیت آنزیمی انتخاب شد.

نتایج SDS-PAGE بر روی محلول سوپرناتانت آنزیمی، صحت بیان ژن نوترکیب در نمونه‌های مثبت را تایید کرده و نشان‌دهنده‌ی ترشح مناسب آنزیم در نتیجه‌ی استفاده از توالی آلفافاکتور مخمری در میزبان بیانی پیکیاپاستوریس می‌باشد.

در این تحقیق نشان داده شده است که پیکیاپاستوریس میزبان بسیار مناسبی برای بیان گزایلوزیداز می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، سویه نوترکیب ایجاد شده با توجه به بیان مقادیر زیاد، پتانسیل بالایی برای استفاده در صنعت از استفاده در صنایع نساجی تا تولید بیواتانول دارد.

تشکر و قدردانی

کلیه‌ی مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که بدین وسیله از زحمات و مساعدت‌های انجام شده به ویژه استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سید امید رعنایی سیادت سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

[1] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol 2003; 30: 279-291.

[2] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in pichia pastoris. Biotechnology (N Y) 1993; 11: 905-910.

[3] Haan RD, Van Zyl WH. Enhanced xylan degradation and utilisation by Pichia stipitis overproducing fungal xylanolytic enzymes. Enzyme Microbial Technology 2003; 33: 620-628.

[4] Fan Z, Werkman JR, Yuan L. Engineering of a multifunctional hemicellulase. Biotechnol Lett 2009; 31: 751-757.

[5] Wagschal K, Heng C, Lee CC, Wong DW. Biochemical characterization of a novel dual-function arabinofuranosidase/xylosidase isolated from a compost starter mixture. Appl Microbiol Biotechnol 2009; 81: 855-863.

[6] Jordan DB, Wagschal K. Properties and applications of microbial β-D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from Selenomonas ruminantium. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86: 1647-1658.

[7] Knob A, Terrasan CR, Carmona EC. β-Xylosidases from filamentous fungi: an overview. World J Microbiol Biotechnol 2010; 26: 389-407.

[8] Jordan DB, Li XL, Dunlap CA, Whitehead TR, Cotta MA. Structure-function relationships of a catalytically efficient beta-D-xylosidase. Appl Biochem Biotechnol 2007; 141: 51-76.

[9] Jordan DB, Braker JD. Inhibition of the two-subsite beta-d-xylosidase from Selenomonas ruminantium by sugars: competitive, noncompetitive, double binding, and slow binding modes. Arch Biochem Biophys 2007; 465:231-246.

[10] Buckholz RG, Gleeson MA. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. Biotechnology (N Y) 1991; 9: 1067-1072.

[11] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. Mol Biotechnol 2000; 16: 23-52.

[12] Farber NE, Troshynski TJ, Turco G. Spinal anesthesia in an infant with epidermolysis bullosa. Anesthesiology 1995; 83: 1364-1367.

[13] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast 2005; 22: 249-270.

[14] Romanos M, Scorer C, Sreekrishna K, Clare J. The generation of multicopy recombinant strains. Methods Mol Biol 1998; 103: 55-72.

[15] Sreekrishna K, Potenz RH, Cruze JA, McCombie WR, Parker KA, Nelles L, et al. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast Pichia pastoris. J Basic Microbiol 1988; 28: 265-278.

[16] Hemdan ES, Porath J. Development of immobilized metal affinity chromatography: II. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. J Chromatogr A 1985; 323: 255-264.

[17] Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 1979; 6: 23-28.

[18] Hengen P. Purification of his-tag fusion proteins from escherichia coli. Trends Biochem Sci 1995; 20: 285-286.

[19] Zhao C, Hellman LM, Zhan X, Bowman WS, Whiteheart SW, Fried MG. Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. Anal Biochem 2010; 399: 237-245.

[20] Cregg JM. Pichia protocols. Method Mol Cell Biol 2007; 389.

[21] Iembo T, Azevedo MO, Jr C, Filho EX. Purification and partial characterization of a new β-xylosidase from Humicola grisea var. thermoidea. World J Microb Biot 2006; 22: 475-479.

[22] Chen Z, Jia H, Yang Y, Yan Q, Jiang Z, Teng C. Secretory expression of a β-xylosidase gene from thermomyces lanuginosus in escherichia coli and characterization of its recombinant enzyme. Lett Appl Microbiol 2012.

[23] Smaali I, Rémond C, O'Donohue MJ. Expression in escherichia coli and characterization of β-xylosidases GH39 and GH-43 from bacillus halodurans C-125. Appl Microbiol Biotechnol 2006; 73: 582-590.

[24] Suzuki S, Fukuoka M, Ookuchi H, Sano M, Ozeki K, Nagayoshi E, et al. Characterization of aspergillus oryzae glycoside hydrolase family 43 β-xylosidase expressed in escherichia coli. J Biosci Bioeng 2010; 109: 115-117.

Archive of SID

www.SID.ir

Secretive expression of bacterial β-xylosidase gene including hexahistidin-tag in *Pichia pastoris*

Shirin Yousefian(M.Sc)[*1], Seyyed Omid Ranaei Siadat(Ph.D)[1], Ehsan Dehnavi(Ph.D)[1,2], Mohammadtaghy Borjian Borujeni(M.Sc)[1], Farnaz Nikzad Jamnani(M.Sc)[1,3]

1 - Nanobiotechnology laboratory, Department of biotechnology, faculty of Energy engineering and new technologies, Shahid beheshti University, Tehran, Iran

2 - Faculty of biology science, Tarbiat Moddares University, Tehran, Iran

3 – Dept. of biotechnology, faculty of agriculture and natural resources, science and research branch of Islamic azad University, Tehran, Iran

(Received: 28 Oct 2012; Accepted: 12 Feb 2013)

Introduction: β-D-Xylosidases (EC 3.2.1.37), one of the most important hemicellulases with high potential industrial application such as bioethanol production, are exo-type glycosidases that catalyze the successive removal of β-xylosyl residues from the non-reducing termini of xylobiose and higher linear β-1,4-xylooligosaccharides and in conjunction with β-xylanases are essential in completely depolymerizing xylan. The aim of this study was secretive expression of bacterial β-xylosidase gene including hexahistidin-tag in *Pichia pastoris* in order to achieve high level expression and enzyme purification subsequently.

Materials and Methods: In this study, after optimizing the sequence of protein encoding bacterial β-xylosidase based on the expression codon usage of *Pichia pastoris* and addition of 6xHis-tag sequence through suitable designed primers to gene, transformation of recombinant plasmids was performed through electroporation method into the expression yeast.

Results: The results showed that the recombinant β-xylosidase production was 40 U/L with 0/6 U/mg specific activity in flask culture.

Conclusion: Cloning and successful expression of bacterial β-xylosidase gene was carried out in order to obtain an active and stable enzyme with high level expression from yeast expression system.

***Keywords*:** Yeasts, Xylosidases, Histidine, Gene expressio

* Corresponding author: Fax: +98 21 22431782; Tel: +98 9132967850

sh_yousefian67@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir