مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، زمستان ۱۳۹۱
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

کلونینگ و بیان ترشحی ژن آنزیم *لیپاز باسیلوس پومیلوس F3* بومی ایران در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و مقایسه میزان بیان آن نسبت به فرم طبیعی آنزیم

اکبر حیدری[۱]، مهرداد موسی زاده مقدم[۲]، حسین آقاملایی*[۳]، محمد باقر یخچالی[۴]، بیژ ن بمبئی[۵]، علی محمد لطیفی[۶]، محمد هیئت[۷]

[۱]کارشناسی ارشد،گروه میکروب شناسی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
[۲]کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران ، ایران.
[۳]کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران ، ایران
[۴]دکتری،پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی و محیطی ، پژوهشگاه ملی ژنتیک ، تهران ، ایران
[۵]دکتری، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی و محیطی ، پژوهشگاه ملی ژنتیک ، تهران ، ایران
[۶]دکتری، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)- تهران ، ایران
[۷]کارشناسی ارشد ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران ، ایران

چکیده

سابقه و هدف : لیپازها، بیوکاتالیست های ارزشمندی هستند که به علت کاتالیز نمودن واکنش های شیمیایی مانند آبکافت، کافت الکلی، کافت اسیدی و استرفیکاسیون در صنعت دارای کاربردهای فراوانی می باشند. لیپازهای میکروبی از مهم ترین انواع این آنزیم ها هستند که به علت پایداری بالا در حلال های آلی، توانایی کاتالیز ملایم واکنش های هیدرولازی، سهولت در تولید و هزینه های نسبتا پایین آن یکی از مهم ترین منابع تولید در صنعت محسوب می گردند. باکتری *باسیلوس پومیلوس* یکی از مهم ترین منابع میکروبی این آنزیم می باشد، اما بیان و ترشح پایین این لیپاز یکی از مهم ترین مشکلات پیش رو جهت تولید آن توسط این باکتری محسوب می شود. هدف از این تحقیق تولید نوترکیب آنزیم لیپاز سویه بومی *باسیلوس پومیلوس* بصورت ترشحی به منظور افزایش سطح بیان آن در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* می باشد.
مواد و روش ها: ژن تولید کننده آنزیم لیپاز این سوش با استفاده از مهندسی ژنتیک در پلاسمید pWB980 همسانه سازی شد و پس از آن به سوش *باسیلوس سوبتیلیس* WB600 به عنوان میزبان منتقل گردید. در ادامه سطح بیان و ترشح آنزیم به صورت طبیعی و نوترکیب بررسی و مقایسه گردید.
یافته ها: آنزیم لیپاز در *باسیلوس سوبتیلیس* بصورت ترشحی بیان شد. میزان بیان این آنزیم نسبت به سوش طبیعی بیشتر می باشد.
نتیجه گیری: تولید نوترکیب لیپاز *باسیلوس پومیلوس* در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* روش مناسبی برای افزایش میزان بیان این آنزیم می باشد.
کلمات کلیدی: لیپاز، کلونینگ، *باسیلوس سوبتیلیس*، بیان ترشحی

مقدمه

لیپازها گروهی از آنزیم های هیدرولازی می باشند که با هیدرولیز باندهای استری تری گلسیریدهای زنجیره بلند باعث تجزیه آن ها به گلیسرول و اسید چرب می گردند. دارا بودن این آنزیم ها از یکسری ویژگی های عملکردی باعث شده است تا لیپازها به طور گسترده ای در صنعت مورد استفاده قرار گیرند. این ویژگی ها شامل تولید آن ها توسط طیف وسیعی از جانداران مانند گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم هایی مانند قارچ و باکتری (۱۰)، تمایل کاملا اختصاصی آن ها به سوبسترا بر اساس نوع، شکل فضایی و محل اتصال اسیدچرب و کاتالیز نمودن واکنش های متنوعی مانند هیدرولیز و سنتز باندهای استری و یا ایجاد تغییر در آن ها می باشد، همچنین در میکروارگانیسم هایی مانند باکتری ها عواملی مثل پایداری در دما و pH متفاوت نیز از ویژگی های اختصاصی این آنزیم ها محسوب می شود (۱۳). به منظور استفاده صنعتی از این آنزیم ها، تولید در مقیاس بالا با بیشترین میزان فعالیت و پایداری و نیز کمترین هزینه از اهمیت بالایی برخوردار است لذا استفاده از روش های موثر جهت دستیابی به این اهداف همیشه مورد توجه بوده است. در حال حاضر استفاده از بیوتکنولوژی و

آدرس نویسنده مسئول:مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
Email:aghamolaei22@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۲/۳۱
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۸/۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

تولید توسط میکروارگانیسم نوترکیب یکی از بهترین و موثرترین روش‌ها به منظور تولید صنعتی این آنزیم ها می باشد (۱،۳). لیپازهای باکتریایی از جمله لیپازهایی می باشند که به علت سهولت و هزینه های نسبتا پایین فرایند تولید و پایداری آن ها در حلال های آلی در صنعت دارای بیشترین کاربرد می باشند (۱۱). این نوع لیپازها حدود ۵۰ نوع می باشند که در ۶ گروه طبقه بندی شده اند که از میان آن ها آنزیم های گروه ۱ به علت تاثیرگذاری بر لیپید های غیر محلول در آب و قرارگیری لیپازهای تولید شده توسط جنس باسیلوس در این گروه از اهمیت بیشتری برخوردار می باشند (۹،۱۲). این اهمیت بدین خاطر است که این باکتری ها با دارا بودن توانایی تجزیه کنندگی موثر بر مبنای لیپاز، این آنزیم را با استفاده از سیستم ترشحی خود در مقیاس بالا و به صورت گسترده در فضای پیرامونی خود منتشر می کند (۵). در این میان لیپاز های باکتری *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* با دارا بودن وزن ملکولی حدود ۲۰کیلو دالتون جزء لیپاز های کوچک در این گروه به حساب می آید، همچنین لیپازهای این دو باکتری تمایل بیشتری به تری گلسیریدهای زنجیره کوتاه داشته و در pH قلیایی دارای عملکرد مناسب‌تری می‌باشند (۴). در حال حاضر با توسعه تکنولوژی آنزیمی پتانسیل های بسیار جدیدی به منظور استفاده از این نوع آنزیم ها در بیوتکنولوژی بدست آمده است که باعث توسعه استفاده از آن ها در صنایعی چون شوینده ها، مواد غذایی، کاغذ، لوازم آرایشی و دارویی شده است (۷). اما نکته قابل توجه در تولید صنعتی این آنزیم ها آن است که به طور طبیعی تولید این آنزیم در میکروارگانیسم ها پایین بوده و لذا جهت تولید در مقادیر بالا نیاز به کشت بالایی از میکروارگانیسم مولد است ضمن آنکه فراوری آنزیم از باکتری نیازمند انجام مراحل مختلف استخراج و خالص سازی می باشد که به نوبه خود هزینه تولید را بالا می برد. پیشرفت و گسترش استفاده از روش هایDNA نوترکیب و مهندسی پروتئین می تواند قسمتی از مشکلات یاد شده را حل کند زیرا محصول نوترکیب با دارابودن عوارض جانبی کمتر، خالص تر بوده و دارای خصوصیات شناخته شده تری است و در اکثر موارد نیز هزینه تولید پروتئین نوترکیب بسیار کمتر از استخراج آن از میکروارگانیسم وحشی می باشد. یکی از میزبان های باکتریایی که بدین منظور مورد استفاده قرار می گیرد *باسیلوس سوبتیلیس* است، این باکتری قادر است پروتئین های متنوعی را به محیط کشت ترشح کند که بهره گیری از این ویژگی برای تولید پروتئین های نوترکیب باعث راحت تر شدن مراحل جداسازی و تخلیص پروتئین خواهد شد (۱۵). از دیگر مزایای این باکتری توان رشد سریع، سهولت دستکاری ژنتیکی در ژنوم، غیر بیماری زا بودن، ژنوم مشخص و تعیین ترادف شده و ظرفیت بالا در ترشح پروتئین می باشد (۶). اما استفاده از این باکتری به عنوان میزبان دارای معایبی نیز می باشد که مهم ترین آن تولید پروتئازهای داخل و خارج سلولی مثل WPRA است که باعث تجزیه پروتئین‌های ترشحی می‌گردد (۲). البته این مشکل با ساخت سویه‌هایی مثل WB600 و WB700 که ژن های پروتئیناز آن ها غیر فعال گردیده و قادرند چپرون هایی مثل PRSA را در حد وسیعی تولید کنند حل شده است (۱۴). اخیرا در ایران سویه بومی باکتری *باسیلوس پومیلوس F3* توسط گروه دکتر یخچالی جداسازی و گزارش گردیده است (۸). همانطور که اشاره شد این باکتری یکی از مهم ترین باسیلوس های مولد لیپاز می باشد که آنزیم آن در صنعت کاربرد گسترده ای دارد. در این تحقیق با استفاده از مهندسی ژنتیک ژن تولید کننده آنزیم لیپاز این باکتری پس از شناسایی، جداسازی گردید و در باکتری باسیلوس سوبتیلیس WB600 کلون و بیان گردید، در ادامه فعالیت و میزان تولید آن به صورت طبیعی و نوترکیب مقایسه گردید .

مواد و روش ها

سوش‌های باکتریایی، پلاسمید و مواد مورد استفاده

سویه *باسیلوس پومیلوس* مورد استفاده یک سویه بومی است که توسط گروه دکتر یخچالی در ایران جداسازی شده است، این سویه جهت جداسازی و استخراج ژن آنزیم لیپاز مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از سوش باسیلوس سوبتیلیس WB600 به عنوان میزبان جهت بیان و تولید آنزیم لیپاز نوترکیب استفاده گردید، در این سوش ۶ ژن مهم تولید کننده پروتئازهای خارج سلولی باکتری توسط موتاسیون های القایی غیرفعال شده اند و لذا یک میزبان مناسب جهت تولید پروتئین های نوترکیب ترشحی می باشد. پلاسمید pWB980 جهت همسانه سازی (کلونینگ) و بیان ژن لیپاز مورد استفاده قرارگرفت، این

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمید دارای توالی سیگنال نشانه *SacB* در بالادست جایگاه وارد نمودن ژن خارجی می باشد که در طی پروسه بیان با اضافه شدن به ابتدای توالی پروتئین نوترکیب باعث هدایت آن به فضای خارج سلولی باکتری میزبان می گردد (۱۶).

تکثیر ژن لیپاز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

پس از استخراج و تخلیص ژنوم باکتری *باسیلوس پومیلوس* (با استفاده از کیت استخراج ژنوم Bioneer) این ژنوم به عنوان الگو جهت تکثیر ژن تولید کننده لیپاز با استفاده از PCR مورد استفاده قرارگرفت، بدین منظور توالی ‘TAAAGCTTATGAAAGTGATTCG-3-‘5 به عنوان پرایمر پیشرو با جایگاه برش آنزیمی برای*HindIII* وتوالی ‘TGGATCCTTAATTCGTATTCTGTC-3-‘5 به عنوان پرایمر معکوس با جایگاه برش برای آنزیم *BamHI* طراحی و جهت سنتز به شرکت Bioneer سفارش داده شد.

واکنش PCR به منظور تکثیر ژن آنزیم لیپاز

برای این منظور از دستگاه ترموسایکلر اپندورف استفاده گردید. این واکنش به صورت یک سیکل ابتدایی دناتوراسیون به مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه جهت باز نمودن پیوندهای هیدروژنی DNA الگو، ۳۰ سیکل اصلی که هر سیکل شامل سه مرحله دناتوراسیون با دمای ۹۵درجه و مدت زمان یک دقیقه، مرحله اتصال با دمای ۵۵ درجه و مدت زمان یک دقیقه و مرحله تکثیر با دمای ۷۲درجه و مدت زمان یک دقیقه و در انتها نیز یک سیکل نهایی با دمای ۷۲ درجه با مدت زمان ۱۰دقیقه اجرا گردید.

هضم آنزیمی محصول PCR

محصول PCR بدست آمده توسط آنزیم های *HindIII* و *Bam-HI* تحت هضم قرارگرفت تا دو انتهای چسبنده در انتهای قطعات ژنی ایجاد گردد. برای انجام این واکنش در یک تیوب ۰/۵ میکرولیتر هر یک از آنزیم های فوق، ۲۵۰ نانوگرم محصول PCR ، ۲ میکرولیتر بافر Tango10x (خریداری شده از شرکت Fermentas) به آب مقطر استریل اضافه گردید تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد، سپس این محلول به مدت ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پلاسمید pWB980 نیز با استفاده از روش لیز قلیایی از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس WB600* استخراج گردید و واکنش هضم آنزیمی برای آن نیز انجام گرفت با این تفاوت که حدود یک میکروگرم پلاسمید در هر واکنش استفاده گردید.

اتصال قطعات برش خورده ژنی به پلاسمید و انتقال آن به باکتری میزبان

پس از خالص سازی پلاسمید و قطعات ژنی هضم شده محصولات برش خورده با استفاده از میانکنش لیگاسیون توسط آنزیم T4 لیگاز (خریداری شده از شرکت Fermentas) به یکدیگر متصل شدند، این واکنش در دمای ۱۲ درجه و به مدت ۱۲ ساعت انجام گرفت. پس از سپری شدن زمان مورد نظر انتقال پلاسمید های نوترکیب با استفاده از کیت انتقال پلاسمید تولید شده در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) به باسیلوس *سوبتیلیس WB600* منتقل شدند. در این کیت با استفاده ازمحیط کشت حداقل و غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر از پپتید آنتی باکتریال؛ با ایجاد منافذی بر روی غشا شرایط مناسب برای انتقال پلاسمید به باکتری فراهم می شود. این کیت به شماره۷۴۳۹۷ در اداره ثبت اختراعات به ثبت رسیده است.

غربالگری باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب

از آنجا که پلاسمید pWB980 حامل ژن مقاومت به کانامایسین می باشد برای شناسایی باکتری هایی که پلاسمید را دریافت نموده اند از محیط انتخابی LB حاوی کانامایسین با غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی لیتر استفاده گردید. جهت تایید اولیه کلون در باکتری هایی که بر روی این محیط انتخابی رشد کرده بودند از دو روش PCR و برش آنزیمی استفاده شد و در ادامه نیز به منظور بررسی عدم وجود موتاسیون در ژن مورد نظر، محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Millegen فرانسه ارسال گردید.

بررسی بیان آنزیم لیپاز توسط باکتری های نوترکیب با استفاده SDS PAGE

برای این منظور کلونی هایی که در غربالگری اولیه مثبت بودند در محیط LB مایع حاوی کانامایسین به مدت ۱۲-۱۸ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد و با دور rpm ۱۸۰ گرماگذاری شدند و

www.SID.ir

Archive of SID

پس از سپری شدن این زمان سلول ها با استفاده از سانتریفیوژ از محیط کشت جدا گردیدند. برای جداسازی پروتئین ها به ازای هر ۸۸۰ میکرولیتر از محلول رویی ۱۲۰ میکرولیتر تری کلرو استیک اسید اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد سپس پروتئین ها توسط سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه با۲۱۰۰۰ rpm و مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شدند. بررسی وجود پروتئین لیپاز با استفاده از ژل SDS _ PAGE ۱۲درصد و با استفاده از نمونه کنترل انجام پذیرفت.

بررسی فعالیت آنزیم لیپاز بیان شده با استفاده از محیط کشت اختصاصی

برای این منظور از محیط کشت TW4 آگار حاوی کانامایسین استفاده گردید. این محیط شیری رنگ بوده و حاوی اسید چرب تری بوترین می باشد، باکتری هایی که دارای ژن لیپاز فعال باشند ضمن رشد بر روی این محیط با تجزیه این ماده باعث ایجاد هاله در اطراف ناحیه رشد خود می گردند.

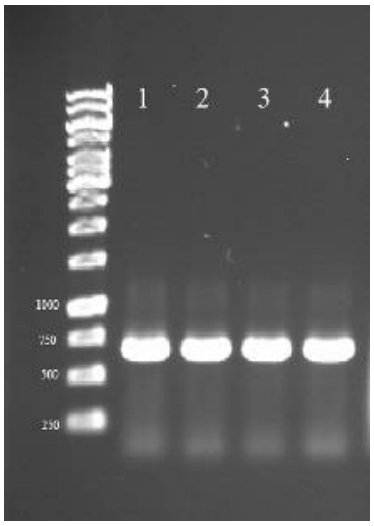
مقایسه میزان تولید آنزیم لیپاز به صورت طبیعی و نوترکیب

مانند مرحله قبل از محیط TW4 آگار حاوی تری بوتیرین اما بدون کانامایسین استفاده گردید. جهت مقایسه میزان فعالیت آنزیم لیپاز طبیعی و نوترکیب، پس از ایجاد چاهک های کم عمق در محیط کشت TW4آگار به صورت جداگانه ۲۰ میکرولیتر از رقت یکسان (OD_{600}=۰/۵) باکتری باسیلوس پومیلوس و باسیلوس سوبتیلیس نوترکیب در این چاهک ها تزریق گردید و سپس این محیط به مدت ۱۸ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. پس از سپری شدن این زمان میزان هاله ایجاد شده در اطراف هر یک از چاهک های حاوی *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* نوترکیب اندازه گیری و مقایسه گردید.

یافته ها

بررسی نتایج PCR

پس انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمر های اختصاصی طراحی شده، محصول واکنش توسط ژل آگارز یک درصد بررسی گردید (شکل۱). با توجه به اندازه ژن لیپاز که bp ۶۹۰ می باشد باندهای محصول PCR در مقایسه با باندهای استاندارد نشانگر در محل صحیح قرار داشتند . پس از انتقال پلاسمید های نوترکیب به باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و کشت باکتری های تراریخت بر روی محیط LB حاوی کانامایسین، پس از رشد چند کلنی انتخاب گردید و واکنش PCR با استفاده از پلاسمید استخراج شده از آن ها به عنوان الگو و پرایمر اختصاصی ژن لیپاز انجام گرفت. نتایج با استفاده از ژل اگارز ۱ درصد بررسی گردید که قرارگیری محصول PCR در محل صحیح نشان دهنده صحت همسانه سازی و قرارداشتن قطعه ژنی در پلاسمید می باشد.



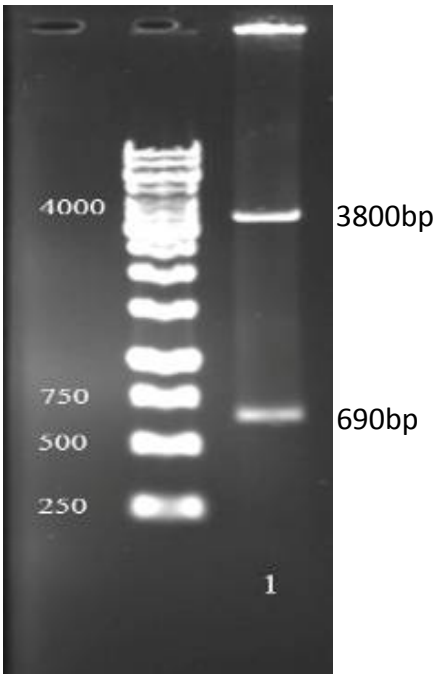
شکل۱- بررسی محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد.
ستون اول نشانگر اندازه و ستون های شماره گذاری شده محصول PCR را نشان می دهند. قرار گیری این باندها در مکان صحیح نسبت به نشانگر اندازه صحت اولیه کلون را نشان می دهد.

تایید باکتری های حامل پلاسمید نوترکیب با استفاده از روش آنزیمی

به منظور تایید نهایی، پلاسمیدهای استخراج شده تحت هضم آنزیمی توسط آنزیم های*HindIII* و*BamHI* قرار گرفتند. همان طور که در شکل مشخص است دو باند در ژل آگارز قابل مشاهده است، باند bp ۳۸۰۰ مربوط به پلاسمید و باند bp ۶۹۰ قطعه ژنی جداشده از پلاسمید که ژن لیپاز می باشد (شکل۲) .

www.SID.ir

Archive of SID



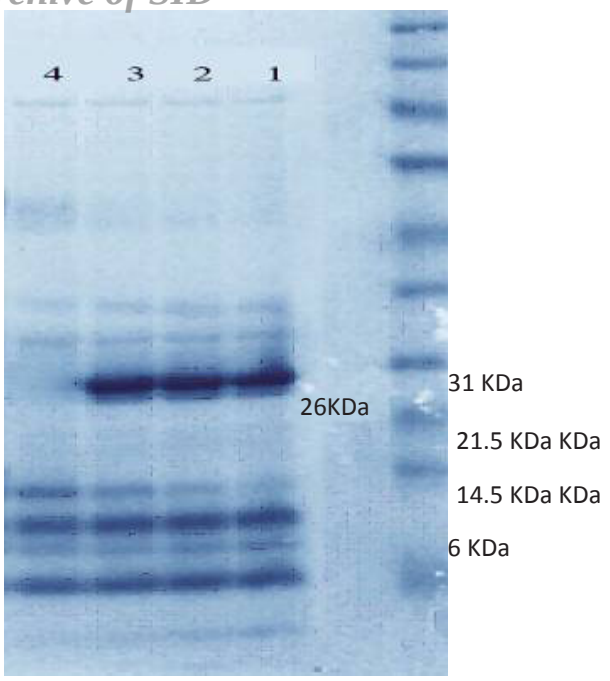
شکل۲- بررسی هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد. باندهای حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم های *HindIII* و*BamHI* در محل صحیح قرار گرفته است.

تعیین توالی قطعه ژنی موجود در پلاسمید

برای اطمینان از عدم موتاسیون در ژن، پلاسمید نوترکیب پس از استخراج و تخلیص (با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید Bi-oneer) برای تعیین توالی به شرکت Millegen فرانسه فرستاده شد. مقایسه نتیجه تعیین توالی با توالی موجود در بانک ژنی (NCBI) نشان داد که هیچ جهشی در ژن رخ نداده است.

تایید بیان و تولید پروتئین

به منظور تایید بیان پروتئین نوترکیب، محیط کشت حاوی باکتری نوترکیب به مدت ۱۲ ساعت گرماگذاری شد و پس از انجام مراحل جداسازی پروتئین، محلول حاوی پروتئین در ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد مورد بررسی قرارگرفت. همان طور که در تصویر مشخص است با توجه به باندهای نشانگر استاندارد وجود باند هم اندازه با پروتئین نوترکیب مورد نظر نشان دهنده بیان ژن تولیدکننده آنزیم لیپاز نوترکیب می باشد. در نمونه کنترل منفی که دارای پلاسمید PWB980 بدون ژن لیپاز است باندی مشاهده نمی شود (شکل۳).



شکل۳- بررسی بیان ژن نوترکیب آنزیم لیپاز با استفاده از ژل _ SDS PAGE ۱۲٪ . ستون ۱تا ۳ نمونه های دارای پروتئین نوترکیب و ستون ۴ نمونه کنترل منفی است.

بررسی عملکرد آنزیم لیپاز نوترکیب

برای اطمینان از عملکرد آنزیم نوترکیب، باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب که بیان ژن لیپاز آن با استفاده از SDS-PAGE بررسی و تایید گردیده بود بر روی محیط کشت TW4 آگار حاوی کانامایسین و اسید چرب تری بوترین کشت داده شد. با ترشح آنزیم لیپاز به محیط و تجزیه تری بوترین هاله ای شفاف در اطراف کلنی ها مشاهده می شود، این هاله در کلنی های *باسیلوس سوبتیلیس* فاقد ژن لیپاز به صورت خیلی ضعیف وجود دارد.

مقایسه میزان تولید آنزیم لیپاز به صورت طبیعی و نوترکیب

بررسی میزان هاله ایجاد شده در محیط TW4 آگار حاوی اسید چرب تری بوترین توسط رقت مشابهی از کشت باکتری *باسیلوس پومیلوس* (در شکل ۴ تصویر سمت چپ) و *باسیلوس سوبتیلیس* نوترکیب (تصویر سمت راست) نشان داد که هاله ایجاد شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* نوترکیب در مقایسه با *باسیلوس پومیلوس* بسیار بزرگتر است که نشانه تولید و ترشح

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتر این آنزیم توسط باکتری نوترکیب است (شکل ۴).

شکل۴- پلیت های کشت *باسیلوس سوبتیلیس* (سمت راست) و *باسیلوس پومیلوس* (سمت چپ) بر روی محیط TW4. قطر هاله در *باسیلوس سوبتیلیس* (9mm) بزرگتر از قطر هاله باسیلوس پومیلوس (4mm) نشانگر تولید بیشتر آنزیم لیپاز در باکتری نوترکیب می باشد.

بحث

با توجه به اینکه آنزیم لیپاز در صنعت کاربردهای بسیاری دارد لذا تولید آن از لحاظ تجاری از اهمیت گسترده ای برخوردار است و لذا همسانه سازی این آنزیم جهت مصارف صنعتی بسیار مورد توجه است. از جمله آنزیم های لیپازی که در صنعت مورد استفاده قرار می گیرد آنزیم لیپازی است که توسط باکتری *باسیلوس پومیلوس* تولید می شود. این باکتری در ایران به صورت بومی توسط گروه تحقیقاتی دکتر یخچالی از خاک جداسازی و شناسایی گردیده اما بیان ژن لیپاز آن به صورت نوترکیب در باکتری *E.coli* در حدی نیست که بتوان در تولیدات صنعتی از آن استفاده نمود. همچنین به علت آنکه بیان این آنزیم در باکتری *E.coli* درون سلولی است فرایند های پایین دستی تولید را با پیچیدگی هایی همراه خواهد کرد (۸).گونه های جنس باسیلوس از گذشته برای تولید انواع مختلف محصولات پروتئینی به کار می روند. به عنوان مثال تولید بعضی پروتئین ها مثل آلفا آمیلاز در این باکتری باسیلوس سوبتیلیس در حد گرم در لیتر است. خصوصیات منحصر به فرد باسیلوس ها به خصوص *باسیلوس سوبتیلیس* این باکتری ها را به عنوان کاندید مناسب برای بیان ژن های مختلف معرفی می کند. مهم ترین خاصیت این باکتری توانایی ترشح مقادیر بالایی از پروتئین به محیط کشت است که این ویژگی باعث راحت تر شدن مراحل تولید و تخلیص پروتئین های نوترکیب توسط آن می شود. در این تحقیق باکتری *باسیلوس سوبتیلیس WB600* به عنوان میزبان جهت کلونینگ و بیان ژن مذکور انتخاب گردید و با استفاده از جایگاه های برش دو آنزیم *HindIII* و *BamHI* ژن با موفقیت در این میزبان کلون و بیان شد. نتایج حاصل از مراحل مختلف بیان نشان داد که باکتری میزبان پس از ۱۲ ساعت پروتئین نوترکیب را به محیط کشت ترشح می کند. بررسی هاله ایجاد شده در محیط کشت TW4 که حاصل فعالیت آنزیم لیپاز نوترکیب است نیز نشان داد که اندازه هاله آن نسبت به سوش وحشی تولید کننده آنزیم از لحاظ قطری حدود دو برابر در واحد زمان بزرگتر است که این نشان دهنده ترشح بسیار بیشتر آنزیم لیپاز توسط *باسیلوس سوبتیلیس* در مقایسه با *باسیلوس پومیلوس* می باشد.

با توجه به ترشح لیپاز به بیرون از باکتری خالص سازی آن مراحل کمتر و هزینه پایین تری خواهد داشت و در نتیجه تولید صنعتی این آنزیم در باسیلوس سوبتیلیس مقرون به صرفه خواهد بود.

نتیجه گیری

کلونینگ آنزیم لیپاز *باسیلوس سوبتیلیس* با موفقیت در باکتری *باسیلوس پومیلوس* انجام شد. ایجاد هاله در محیط TW4 نشان از تجزیه تری بوترین توسط آنزیم و در نتیجه فعال بودن آنزیم نوترکیب از نظر عملکرد می باشد همچنین مقایسه میزان هاله ایجاد شده توسط سوش نوترکیب نسبت به سوش وحشی نشان داد میزان بیان این آنزیم بصورت نوترکیب و ترشحی در *باسیلوس سوبتیلیس WB600* در مقایسه با میزان بیان آن در سوش اصلی بسیار بیشتر است.

تشکر و قدر دانی

از کلیه پرسنل آزمایشگاه های تحقیقاتی مرکز بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) که ما را در انجام این تحقیق یاری فرمودند تشکر و قدر دانی می نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(1)Colin Vl, Baigori Md, Pera Lm. Effect of Environmental Conditions on Extracellular Lipases Production and Fun gal Morphology From Aspergillus Niger Mya 135. J Basic Microbiol , 2010; 50: 52-8.

(2) Doi Rh. Genetic Engineering In Bacillus Subtilis. Biotechnol Genet Eng Rev , 1984; 2: 121-55.

(3) Eichler J. Biotechnological Uses of Archaeal Extremozymes. Biotechnol Adv , 2001; 19: 261-78.

(4) Gandhi Nn. Applications of Lipase. Journal of The American Oil Chemists‘ Society , 1997; 74: 621-34.

(5) Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial Lipases: an Overview of Production, Purification and Biochemical Properties. Appl Microbiol Biotechnol , 2004; 64: 763-81.

(6) Harwood Cr, Moszer I. From Gene Regulation to Gene Function: Regulatory Networks In Bacillus Subtilis. Comp Funct Genomics , 2002; 3: 37-41.

(7) Hassan F, Shah A, Hameed A. Purification and Characterization of A Mesophilic Lipase From Bacillus Subtilis Fh5 Stable at High Temperature And Ph. Acta Biol Hung , 2007; 58: 32115 -.

(8) Heravi Km, Yakhchali B, Eftekhar F, Vafadar-Isfahani B, Ghomi Hh, Danesh Ha. Molecular Cloning and Charac terization of A Lipase From An Indigenous Bacillus Pumilus. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran , 2009; 20: 7-14.

(9) Holm C. Molecular Mechanisms Regulating Hormone-Sensitive Lipase And Lipolysis. Biochem Soc Trans, 2003; 31: 1120-4.

(10) Kulkarni N, Gadre Rv. Production and Properties of an Alkaline, Thermophilic Lipase From Pseudomonas Fluore scens Ns2w. J Ind Microbiol Biotechnol, 2002; 28: 344-8.

(11) Sangeetha R, Geetha A, Arulpandi I. Pongamia Pinnata Seed Cake: a Promising and Inexpensive Substrate for Production of Protease and Lipase from Bacillus Pumilus Sg2 On Solid-State Fermentation. Indian J Biochem Biophys , 2011; 48: 435-9.

(12) Sharma D, Sharma B, Shukla Ak. Biotechnological Approach of Microbial Lipase. A Review. Biotechnology , 2011; 10: 17-24.

(13) Svendsen A. Lipase Protein Engineering. Biochim Biophys Acta, 2000; 1543: 223-38.

(14) Tran L, Wu Xc, Wong Sl. Cloning and Expression of a Novel Protease Gene Encoding An Extracellular Neutral Protease from Bacillus Subtilis. J Bacteriol , 1991; 173: 6364-72.

(15) Wong Sl. Advances in the Use of Bacillus Subtilis for The Expression and Secretion of Heterologous Proteins. Curr Opin Biotechnol , 1995; 6: 517-22.

(16) Wu Sc, Wong Sl. Development of Improved Pub110-Based Vectors for Expression and Secretion Studies in Bacil lus Subtilis. J Biotechnol , 1999; 72: 185-95.

www.SID.ir