مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره پانزدهم، تابستان ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

بیان و خالص‌سازی ژن نوترکیب Cold sensitive Taq DNA polymerase در E.coli

سمانه گلیج[1*]، دکتر علی ناظمی[2]، دکتر مصطفی جعفرپور[2]

[1] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
[2] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت بعلت کاربرد آن در PCR و تحقیقات بیولوژی مولکولی توجه زیادی را به خود معطوف ساخته است و در نتیجه اهمیت مطالعه روی DNA پلیمرازهای مقاوم به حرارت مختلف را دو چندان نموده است. هدف از این مطالعه سنجش عملکرد و میزان تولید آنزیم DNA پلیمراز حساس به سرما و مقاوم به حرارت تولید شده در میزبان باکتریایی و خالص‌سازی سریع و ارزان آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بعد از سنتز ژن طراحی شده به صورت مصنوعی، کلونینگ آن به داخل وکتور pET۲۸a انجام شد. سپس پلاسمید حاوی ژن تولیدکننده آنزیم Taq DNA polymerase به سویه E.coli BL۲۱ انتقال یافت. در این مطالعه از IPTG به عنوان القاءگر برای بیان ژن موردنظر استفاده شد. خالص‌سازی اولیه آنزیم توسط امواج اولتراسوند و در ادامه به وسیله شوک حرارتی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و رسوب‌دهی سایر پروتئین‌های نامحلول به وسیله سانتریفوژ انجام گردید. فعالیت و عملکرد Taq DNA polymerase تولید شده در مقایسه با آنزیم تجاری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: Taq DNA polymerase مقاوم به حرارت و حساس به سرمای نوترکیب بیان شده در E.coli، برتری قابل توجه و عملکرد بهتری نسبت به آنزیم تجاری از نظر فعالیت و مقاومت در برابر حرارت نشان داده است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت و سطح کاربرد آنزیم Taq DNA polymerase مقاوم به حرارت در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی، روش مورد استفاده در تولید این آنزیم، روشی کاربردی و مقرون به صرفه می‌باشد. به علاوه، سهولت روش به کار گرفته شده و نیز صحت و دقت عمل آنزیم تولید شده، دلیل مناسب و قابل قبولی برای تولید آزمایشگاهی و محلی آنزیم cold sensitive Taq DNA polymerase با خلوص بالا می‌باشد.

کلمات کلیدی: Taq DNA polymerase، E.coli، مقاوم به حرارت، حساس به سرم

مقدمه

تکثیر DNA با استفاده از Taq DNA polymerase یکی از گسترده‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده در زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی[1] است (۱۰). DNA پلیمراز نقش بسیار مهمی در تکثیر ماده ژنتیکی موجودات زنده و ادامه حیات آن‌ها دارد. ۵ سال پس از کشف ساختار DNA توسط واتسون و کریک[2]، اولین آنزیم DNA پلیمراز (DNA پلیمراز I باکتری E. coli) در سال ۱۹۵۸ توسط کورنبرگ و همکارانش کشف گردید (۱۶). از آن پس آنزیم‌های پلیمراز بیشتری با خصوصیات منحصر به فرد شناسایی و به این خانواده اضافه گردیدند (۱۵). گرچه در ابتدا اطلاعاتی در رابطه با توالی آن‌ها در دست نبود اما بررسی و مقایسه خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم‌ها، تفاوت‌های

آدرس نویسنده مسئول : گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
Email :goliyjsama@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۶/۱۳

1 Biotechnology
2 Watson- Crik

Archive of SID
www.SID.ir

قابل توجهی را نشان می‌داد. در آن زمان با مقایسه شکل توالی اولیه این آنزیم‌ها، آن‌ها را به ۴ گروه اصلی A، B، C و X تقسیم کردند که تا امروز هم همین طبقه‌بندی وجود دارد (۵ و ۱۱). با پیشرفت پروژه تعیین توالی ژنوم، تعداد بسیار زیادی ترادف جدید ژن DNA پلیمراز از باکتری‌ها، آرکی‌ها و یوکاریوت‌ها تعیین و شناسایی شده است که همگی دارای منشأ تکاملی مشترکی هستند (۹).

آنزیم DNA polymerase مقاوم به حرارت یکی از اجزاء اصلی واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) به شمار می‌آید. در حال حاضر انواع مختلفی از آن به صورت نوترکیب[1] یا طبیعی[2] تولید می‌شوند. یکی از آن‌ها، آنزیم Hot Start می‌باشد که این آنزیم در دمای آزمایشگاه، غیرفعال بوده و در نتیجه احتمال اتصال غیراختصاصی پرایمرها[3] به محل‌های غیر هدف و تولید دایمرهای[4] پرایمری را منتفی می سازد (۱۹).

ترادف آنزیم DNA پلیمراز I در میان طیف وسیعی از پروکاریوت‌های ساکن محیط‌های مختلف، در طول میلیاردها سال کاملاً حفظ‌شده باقی مانده است. این طیف وسیع پروکاریوتی از Deinococcus radiodurans مقاوم به اشعه و Thermus aquaticus مقاوم به حرارت تا باکتری روده‌ای E.coli[5] و باکتری اجباری داخل سلولی کلامیدیا تراکوماتیس[6] را شامل می‌شود (۱۸). مزیت Taq DNA polymerase تحمل درجه حرارت بالا (۹۵- ۹۰ درجه سانتی‌گراد) آن است. به علاوه، این آنزیم می‌تواند قطعات DNA به طول ۱۰ هزار جفت باز را تکثیر نماید. پلیمرازهای مقاوم به حرارت، موجب افزایش محصولات PCR بخاطر اتصال و افزایش آغازگر در دمای بالا شده‌اند (۱۸). مناسب‌ترین دما برای فعالیت این آنزیم‌ها با توجه به الگوی DNA، دمای ۸۰- ۷۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، بیش از ۶۵ نوکلئوتید در ثانیه پلیمریزه می‌شود. وزن مولکولی این آنزیم‌ها، حدود ۹۴۰۰۰- ۶۶۰۰۰ دالتون می‌باشد و ۹ دقیقه در ۹۷/۵ درجه سانتی‌گراد پایدار می‌مانند (۸).

یکی از ویژگی‌های منفی آنزیم Taq این است که فاقد مکانیسم تصحیح (proof reading) است و به همین دلیل ممکن است صحت کامل در تکرار واکنش‌ها را نداشته باشد. آنزیم‌های Taq که به صورت تجاری به فروش می‌رسند، احتمال خطایی حدود یک در ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید را دارند. مطالعات متعددی در خصوص میزان خطای آنزیم‌های پلیمریزه کننده مقاوم به دمای بالا انجام شده و میزان این خطا را بین $۲/۱ \times ۱۰^{-۴}$ تا $۱/۶ \times ۱۰^{-۶}$ به ازای هر نوکلئوتید در هر مرحله از تکثیر برآورد نموده‌اند (۳ و ۶). این آنزیم یک زنجیره یک کیلو بازی DNA را در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تقریباً در ۳۰ ثانیه تکثیر می‌نماید.

از زمان کشف Taq پلیمراز، تا به حال چندین DNA پلیمراز مقاوم به حرارت دیگر نیز شناسایی و در آزمایش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در حالی که Taq به عنوان رایج‌ترین آنزیم مقاوم به حرارت برای PCR استفاده می‌شود، پلیمرازهای حاصل از دیگر منابع ویژگی‌های متفاوتی دارند که از آن‌ها برای اهداف خاص می‌توان بهره برد (۱۴).

برای این منظور، مطالعات گسترده‌ای برای جداسازی آنزیم مقاوم به حرارت از منشأهای دیگر در جهان انجام گرفته است. به عنوان مثال آنزیم pfu که جزء آنزیم‌های خانواده B پلیمرازهاست و از باکتری Pyrococcus furiosus جداسازی شده و دارای فعالیت اگزونوکلئازی ’۵-’۳ نیز بوده و بنابراین در بسیاری از مطالعات بیولوژی مولکولی مثل تعیین توالی و نیز تکثیر ژن جهت اهداف تولید پروتئین نوترکیب که صحت بالای عملکرد آنزیم DNA پلیمراز یک امر ضروری است، کاربرد دارد. البته یکی از معایب این آنزیم، پایداری حرارتی خیلی پائین و نیز processivity پائین در فعالیت پلیمرازی این آنزیم است که کاربرد آن را محدود می‌سازد (۲۰). به همین دلیل با وجود این آنزیم‌ها، هنوز هم تحقیقات برای یافتن آنزیم‌هایی با خصوصیات بهتر همچنان ادامه دارد.

در این پروژه، ما قصد داریم به طور مصنوعی ژن Taq DNA polymerase باکتری Thermus aquaticus را با تغییراتی جهت ایجاد حساسیت به دمای پایین (به منظور Hot start شدن) سنتز و در وکتورهای بیان کننده[7] در باکتری E.coli سویه $BL_{۲۱}$ بیان نمائیم.

1 Recombinant
2 Native
3 Primers
4 Dimers
5 *Escherichia coli*
6 *Chlamydia trachomatis*
7 Expression vectors

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

- انتقال ژن Taq به BL۲۱ (ترانسفورماسیون)

سویه‌ای از E.coli به نام BL۲۱(DE۳)PlysS جهت انتقال پلاسمید pET۲۸a حامل ژن Taq مورد استفاده قرار گرفت (لازم به ذکر است که این پلاسمید از شرکت GENERAY خریداری شده بود).

سوش باکتری موردنظر در محیط LB مایع به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد نمود. ترانسفورماسیون با استفاده از $۵۰mMCacl_۲$ انجام گرفت و پارامترهای مختلفی مثل کاتیونهای دوظرفیتی و عوامل کاهنده تاثیرگذار بودند. در همه مراحل کشت و تکثیر باکتری حامل پلاسمید موردنظر، از آنتی‌بیوتیک کانامایسین جهت انتخاب باکتری‌های تراریخت و پلاسمید موردنظر استفاده گردید.

- بیان، استخراج وخالص‌سازی آنزیم

سوش باکتری حامل ژن تولیدکننده آنزیم موردنظر، به محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک گزینشی تلقیح شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت بهینه کردن شرایط بیان پروتئین، القاءکننده IPTG به محیط اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از القاء، سلول‌های باکتری جمع‌آوری و خالص‌سازی اولیه آنزیم توسط امواج اولتراسوند به منظور شکسته شدن دیواره سلولی باکتری‌ها و همچنین به وسیله شوک حرارتی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. در ادامه لایه فوقانی توسط سانتریفوژ جداسازی شد. در این مرحله ۱۰۰µlµl از سوپرناتانت به عنوان نمونه crude lysis، نمونه‌گیری می‌شود.

در ادامه به منظور آماده‌سازی ستون تصفیه آنزیم، ۵ میلی‌لیتر $Ni^{۲+}$-Sepharose به ستونی که قبلاً به فیلتری مجهز شده بود، اضافه شد. جهت ایجاد تعادل و نیز تنظیم PH ستون، ۱۵ میلی‌لیتر بافر متعادل‌کننده ($۵۰mM\ NaH_۲Po_۴$, ۳۰۰mM Nacl, ۱۰mM Imidazole) به آرامی به آن اضافه شد. پس از خارج شدن این بافر از ستون، مخلوط آنزیم به آرامی به ستون اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس از قسمت خروجی ستون نمونه‌گیری صورت گرفت و به عنوان نمونه super flow نامگذاری شد. برای جمع‌آوری پروتئین‌های غیرضروری، طی دو مرحله بافر شستشو [Wash buffer ($۵۰mM\ NaH_۲Po_۴$, ۳۰۰mM Nacl, ۳۰mM Imidazole) به ستون اضافه گردید و نمونه‌گیری انجام شد. در نهایت با اضافه کردن Elution buffer ($۵۰mM\ NaH_۲Po_۴$, ۳۰۰mM Nacl, ۱۵۰mM Imidazole) به ستون، پروتئین موردنظر جمع‌آوری و خالص‌سازی شد. همه محلول‌های پروتئینی جدا شده در طی خالص‌سازی بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند و وزن مولکولی پروتئین خالص‌شده تخمین زده شد.

- سنجش غلظت پروتئین

در این مرحله از سنجش غلظت به روش برادفورد استفاده شد به این صورت که با تهیه استانداردهای مختلفی از BSA (µg/µl)، میزان OD آن در طول موج ۵۹۵nm قرائت گردید. سپس نمودار استاندارد برادفورد ترسیم شد.

- بررسی خاصیت Cold Sensitivity

در این مرحله، عملکرد Hot start آنزیم cold sensitive در مقایسه با آنزیم معمولی شرکت سیناژن، از طریق انکوباسیون هر دو آنزیم به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی فعالیت آنزیم از طریق تکثیر حاصل از اتصالات اولیه پرایمرها صورت گرفت. در ادامه اجازه تکثیر از طریق واکنش زنجیره پلیمراز روی یکی از پرایمرهای متداول داده شد.

- بررسی خاصیت اندونوکلئازی

برای سنجش خاصیت اندونوکلئازی، تاثیر آنزیم تولیدشده بر روی DNA ژنومی مورد بررسی قرار گرفت. در این روش از $Mgcl_۲$ ۱.۵mM استفاده شد. آنزیم موردنظر به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در مجاورت DNA ژنومی قرار داده شد. سپس فعالیت اندونوکلئازی آنزیم از طریق الکتروفورز واکنش روی ژل آگارز ارزیابی گردید.

- بررسی پایداری حرارتی[۸]

در این مرحله، خاصیت Heat Stability آنزیم موردنظر و آنزیم تجاری، با هم مقایسه گردید. بدین صورت که دو زمان دناتوراسیون ۲۰ و ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به

8Heat Stability

Archive of SID

www.SID.ir

طور مجزا برای هر دو آنزیم در نظر گرفته شد و سپس مجدداً در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها

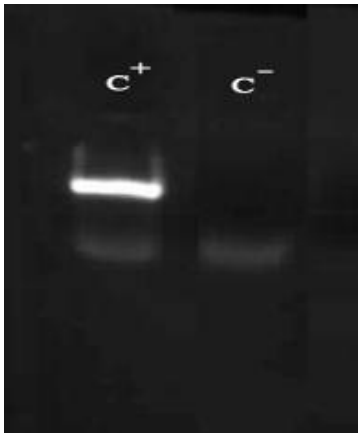
- نتیجه ترانسفورماسیون

نتایج حاصل از ترانسفورماسیون نشان‌دهنده این واقعیت بود که در اثر سرما و با کمک یونهای دو ظرفیتی موجود، قطعات DNA به سطح سلول متصل شدند و در اثر کاهش جنبش مولکولی، توسط freeze-thaw method به درون سلول زنده منتقل شدند. به دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک کانامایسین که جهت انتخاب باکتری‌های واجد پلاسمید موردنظر به کار گرفته شده بود، کلنی‌های مناسبی از باکتری‌های ترانسفورم‌شده ایجاد شد.

با توجه به اینکه ناقل pET۲۸(a) دارای پروموتر T۷ است و بیان پروتئین قابل القاء توسط IPTG ممکن است، اقدام به بیان پروتئین موردنظر در این ناقل نمودیم.

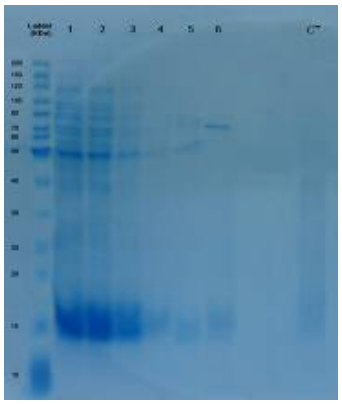
- نتیجه بیان، استخراج وخالص‌سازی

نتایج حاصل از بیان و خالص‌سازی نشان دادند که با جدا کردن آنزیم از سایر بقایای باکتری توسط امواج اولتراسوند و نگهداری سوپ حاصله در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پروتئین مورد نظر فقط در سوپرناتانت مشاهده شد. در ادامه با اضافه کردن Elution buffer به ستون، آنزیم خالص حاصل گردید. در ارزیابی تکمیلی، عملکرد آنزیم حاصل با استفاده از DNA و پرایمر شناخته شده ۱۶srRNA در واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) در تکثیر قطعه DNA بکار رفته در واکنش، موفقیت‌آمیز بود (شکل ۱) .



شکل ۱: کیفیت آنزیم تولیدشده در تکثیر قطعه DNA در واکنش PCR

برای تعیین وزن مولکولی پروتئین، الکتروفورز پروتئین‌ها در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات انجام گرفت. نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان‌دهنده وجود یک باند پروتئینی در ژل بوده که وزن مولکولی پروتئین موردنظر با استفاده از مارکر پروتئینی[9] ،۷۶KDa برآورد گردید و نمونه کنترل منفی که یقین داشتیم پلاسمید نوترکیب را دریافت نکرده، فاقد باند موردنظر بود (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین تخلیص‌شده با استفاده از ستون کروماتوگرافی

نمونه‌ها از چپ به راست: مارکر پروتئینی- Elution II- Elution I- Wash II- Wash I- Super flow- Crude lysis- نمونه کنترل منفی (فاقد پلازمید نوترکیب)

- نتیجه سنجش غلظت پروتئین

به منظور سنجش غلظت پروتئین، رقت‌های مختلف محلول پروتئینی BSA(µg/µl) تهیه شد و در طول موج ۵۹۵nm میزان OD هر یک از آن‌ها اندازه گیری گردید که نتایج آن در جدول ۱ آمده است. از روی این اعداد منحنی استاندارد برادفورد ترسیم شد (نمودار۱).

جدول ۱: ODهای بدست‌آمده برای ترسیم منحنی استاندارد برادفورد

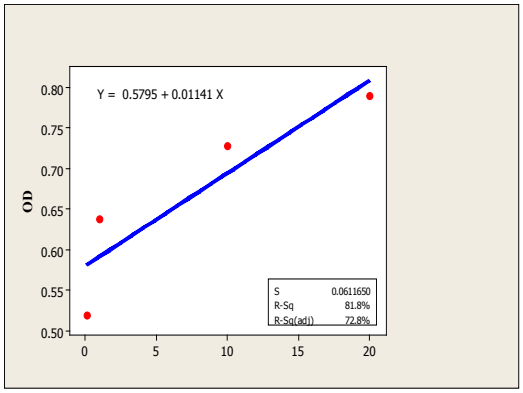
غلظت محلول پروتئینی BSA برحسب میکروگرم	میزان OD بدست آمده در طول موج 595nm
0.1	0.519
1	0.638
10	0.772
20	0.789

9 - Ladder protein

Archive of SID

www.SID.ir

نمودار ۱: منحنی استاندارد تست برادفورد



معادله حاصل برازش به صورت زیر بدست آمد:

$y = ۰.۵۷۹۵ + ۰.۰۱۱۴۱x$

$R^۲ = ۸۱.۸٪$

جدول ۲: میزان جذب پروتئین مجهول در طول موج ۵۹۵nm

Name	*Purified Protein* OD
Taq	1.533

با توجه به معادله خطی به دست آمده از منحنی استاندارد و OD پروتئین مجهول (جدول ۲)، غلظت نهایی پروتئین تخلیص‌شده نیز محاسبه گردید. به این صورت که بعد از قرار دادن OD پروتئین مجهول در معادل حاصل برازش، غلظت نهایی پروتئین تخلیص‌شده، (µg/µl)(µg/µl) ۰.۵۹۷ بدست آمد.

- نتیجه بررسی خاصیت Cold Sensitivity

با توجه به شکل ۳، بعد از بررسی خاصیت Cold Sensitivity آنزیم تولیدشده و مقایسه آن با آنزیم Taq تجاری (CinnaGen)، نتایج نشان‌دهنده مقاومت آنزیم موردنظر به دمای محیط بوده به طوری که با استفاده از پرایمر یونیورسال ۱۶srRNA، یک باند در ناحیه ۱۴۰۰bp مشاهده شده است. به طوری که آنزیم تجاری فاقد این خاصیت می‌باشد.

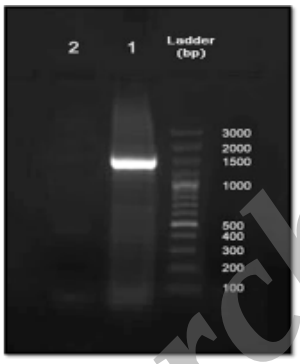
شکل ۳: نتایج حاصل از سنجش فعالیت Cold Sensitivity آنزیم تولیدشده در مقایسه با آنزیم تجاری

$S_۱$: پایداری آنزیم تولیدشده نسبت به دمای محیط

$S_۲$: ناپایداری آنزیم تجاری نسبت به دمای محیط

- نتیجه بررسی خاصیت اندونوکلئازی

نتایج حاصل از بررسی خاصیت اندونوکلئازی آنزیم تولیدشده نشان داد که به علت تشکیل باند و عدم شکستگی DNA بعد از انکوبه شدن در دمای ۶۵°C به مدت ۱۶ ساعت، آنزیم موردنظر، فاقد خاصیت اندونوکلئازی می‌باشد. شکل ۴ نمایانگر این واقعیت است.



شکل ۴: نتایج حاصل از بررسی خاصیت اندونوکلئازی آنزیم تولیدشده

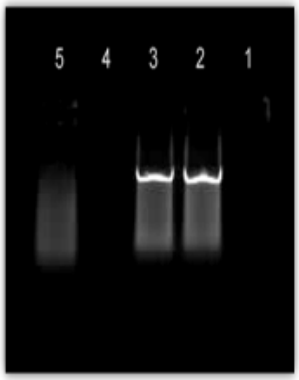
۱- عدم شکستگی DNA بعد از انکوبه شدن در دمای ۶۵°C به مدت ۱۶ ساعت، ۲- نمونه کنترل منفی °C °C

- نتیجه بررسی خاصیت پایداری حرارتی

نتایج حاصله از بررسی خاصیت Heat Stability آنزیم Taq DNA polymerase تولید شده در مقایسه با آنزیم سیناژن در بازه‌های زمانی ۲۰ و ۳۰ دقیقه، نشان می‌دهد که آنزیم موردنظر برخلاف آنزیم سیناژن، در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نه تنها تخریب نمی‌شود بلکه صد در صد یک آنزیم مقاوم به حرارت بوده و قادر به تحمل دمای بالا در این بازه زمانی نیز می‌باشد. شکل ۵ و کیفیت باندهای تشکیل شده نمایانگر این واقعیت

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد.



شکل ۵: نتایج حاصل از بررسی خاصیت Heat Stability آنزیم تولیدشده
۱) کنترل منفی، ۲) ۳۰ دقیقه دناتوراسیون برای آنزیم تولید شده،
۳) ۲۰ دقیقه دناتوراسیون برای آنزیم تولید شده،
۵) ناپایداری آنزیم تجاری و عدم تشکیل باند در ناحیه موردنظر بعد از ۲۰ دقیقه دناتوراسیون

بحث و نتیجه‌گیری

طراحی و ساخت پروتئین و تغییر خصوصیات آن با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیب، روش نوینی است که با استفاده از آن می‌توان ساختار، دینامیک و عملکرد یک پروتئین را به نحوه مطلوب و موردنظر، تغییر داد. امروزه مهندسی ماکرومولکول‌ها به عنوان یک روش کارا برای گسترش و تولید دارو مطرح است. از آنجایی که معمولاً پروتئین‌های طبیعی برای اهداف صنعتی مناسب نیستند (به عنوان مثال شرایط سخت دمایی و PH که در طول پروسه‌های صنعتی اجتناب‌ناپذیرند) و برای اهداف دارویی نیز بهینه نشده‌اند، نمی‌توان از آن‌ها در صنعت استفاده کرد و باید به نحوی آن‌ها را تغییر داد که قابل استفاده در صنعت باشند. از طرفی به کمک روش‌های مهندسی پروتئین می‌توان ساختار و عملکرد پروتئین طبیعی را نیز بهتر شناسایی کرد. کاربردهای متعددی برای مهندسی پروتئین مطرح شده است. در مورد آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت با روش‌های مهندسی پروتئین می‌توان کارایی آنزیم را در واکنش آنزیمی افزایش داد (۱). یکی از این آنزیم‌ها، آنزیم Taq DNA polymerase می‌باشد.

Taq DNA polymerase متعلق به خانواده pol I از DNA polymerase است که همسانی ساختاری و عملکردی با pol I باکتری E.coli و DNA polymerase فاژ $T7^{10}$ دارد (۲۰).

انتخاب یک وکتور و میزبان بیانی بطور قابل توجهی در افزایش فعالیت و میزان تولید پروتئین هدف موثر است. وکتورهای سیستم pET از مناسب‌ترین سیستم‌های شناخته شده جهت بیان بالا و کنترل بیان می باشند که به دو دسته Transcription vectorsها (شامل(+)pET۲۱، (+)pET۲۳ و (+)pET۲۴) که برای بیان ژن‌های هدفی که واجد بخش اتصال به ریبوزوم باکتریایی هستند، نامزد می‌شوند. این دسته از وکتورها فاقد rbs (ribosome binding site) پروکاریوتی و همچنین کدون AUG شروع هستند و چنانچه ژنی واجد این نواحی باشد، می‌تواند درون آن‌ها کلون شود. دسته دیگر Translation vectorsها (غالب pETها) می باشند که این دسته واجد rbs قوی از RNA پروتئین بزرگ کپسیدی فاژ T۷ هستند که برای ژن‌های فاقد rbs پروکاریوتی استفاده می‌شوند (Novagen, ۲۰۰۵).

قدرت جذب DNA خارجی برای همه باکتری‌ها به یک میزان نمی‌باشد. به عنوان مثال E.coli، که پرکاربردترین باکتری در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی میکروبی است، در شرایط عادی قدرت جذب کمی دارد و میزان وقوع تراریختی در این شرایط مطلوب نخواهد بود. از این رو برای بهینه‌سازی میزان تراریختی، باید باکتری را تحت تیمارهای خاصی قرار داد تا قدرت جذب آن افزایش یابد (۲۳).

تاکنون کارهای مهندسی پروتئین زیادی بر روی آنزیم DNA پلیمراز به خصوص Taq DNA پلیمراز در جهان با اهداف مختلف صورت گرفته است (۱۲).

- Desai and Pfaffle در سال ۱۹۹۵ کلونینگ Taq DNA polymerase را در داخل پلازمید pUC۱۸ گزارش کردند (۷). نتایج آزمایشات این محققین نشان داد که تکثیر ژن Taq DNA polymerase با موفقیت در آزمایشگاه انجام شد و این تحقیق شرایط را برای انجام مطالعات بعدی در زمینه بیان این ژن، تولید انبوه آنزیم و معرفی جهش‌های مهم برای افزایش کارایی آنزیم فراهم می‌کند.

- Mohammad Roayaei و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطالعاتی در زمینه کلونینگ ژن Taq DNA polymerase از Thermus aquaticus در باکتری E.coli انجام دادند. آن‌ها از پلازمید pTTQ که دارای دو سایت برشی EcoRI و SalI بوده و سویه TOP۱۰F' باکتری E.coli استفاده نمودند. بیان با IPTG صورت

10 - T_7 phage

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت. فعالیت آن با نوع تجاری مقایسه شد. وزن مولکولی این پروتئین ۹۴ کیلودالتن بود که با سیستم SDS-PAGE تعیین شد (۲۱).

- Mir Mohammad Sadeghi. H و همکارانش در سال ۲۰۰۶ آزمایشاتی را در زمینه کلون سازی و افزایش ژن Taq DNA polymerase از Thermus aquaticus سویه YT-۱ انجام دادند. این دانشمندان از پرایمرهای خاص cDNA برای افزایش Taq DNA polymerase در داخل وکتورهای pTZ۵۷R با استفاده از تکنیک TA کلونینگ استفاده کردند. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آنزیم‌های محدودگر شناسایی شدند. حضور ژن Taq DNA polymerase توسط توالی‌یابی DNA تائید شد. در نتیجه سنتز ژن Taq DNA polymerase در آزمایشگاه صورت گرفت و توانستند از این ژن برای تولید مقادیر زیادی از این آنزیم استفاده نمایند (۱۷).

- Barbes. M و همکارانش در سال ۲۰۰۳ از جهش‌های حساس به سرما در Taq DNA polymerase برای تهیه آنزیم Hot Start در PCR استفاده کردند. آن‌ها بیان داشتند که حدود ۳۸۰۰ کلنی Klentaq جهش یافته در پروموتر Lac افزایش می‌یابد. آن‌ها از پلازمید Pwb۳۰۲mk استفاده کردند. این محققین از جهش‌های احتمالی حساس به سرما در Klentaq، برای افزایش تولید آنزیم Hot Start استفاده کردند. ابتدا ۴ جهش در نزدیکی سطح خارجی آنزیم، جایی که نزدیک سایت فعال است، اتفاق افتاد. آن‌ها نشان دادند که جهش‌های حساس به سرما می تواند آنزیم Hot start را برای بهترشدن در واکنش PCR آماده کند (۲).

- Yan و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با یک استراتژی جدید موفق به مهندسی Taq پلیمراز به منظور افزایش processivity آن و افزایش کارکرد آن در محیط in vitro شدند. در این تحقیق، با استفاده از یک DNA binding protein که به صورت فیوژن با انواع DNA پلیمرازهای A و B قرار می‌گرفت میزان processivity آنزیم به طور قابل توجهی افزایش یافته بود و هیچ‌گونه تاثیر منفی روی فعالیت کاتالیتیکی و پایداری آنزیم نداشت.

- Khalaj- Kondori و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مطالعه‌ای بر مبنای کلونینگ، توالی‌یابی و بیان ژن DNA پلیمراز I از سوشهای ترموفیل و بومی انجام دادند. آن‌ها در این تحقیق سویه‌های ترموفیل بومی را مورد مطالعه قرار دادند. با توجه به ناشناخته بودن سویه‌های بومی، ابتدا سویه‌های مورد مطالعه به روش فیلوژنی مولکولی با استفاده از توالی ژن ۱۶SrDNA بررسی و تعیین هویت شد. این بررسی‌ها نشان دادند که سویه‌های مورد مطالعه متعلق به جنس Geobacillus می‌باشند. سپس از روش همولوژی و با الگو قراردادن توالی DNA پلیمرازهای نزدیک به سویه‌های مورد مطالعه، پرایمرهای دژنره برای تکثیر و دستیابی به توالی کامل ژن پلیمراز بومی استفاده شد.

در نهایت، با توجه به مطالعات گسترده‌ای که داشتند دریافتند که DNA پلیمراز I تازه شناخته شده، با توجه به وقوع حذف‌شدگیها در سه ناحیه نسبت به کلنو و جایگزین شدن سه گروه از چهار گروه کربوکسیلات ضروری برای عمل اگزونوکلئازی، به احتمال زیاد فاقد خاصیت Proofreading می‌باشد (۱۳).

به دلیل اینکه Taq DNA polymerase مقاوم به حرارت، یکی از آنزیم‌هایی است که کارایی بالایی دارد و به طور متداول مورد استفاده قرار می‌گیرد، همچنین این آنزیم می‌تواند برای اهداف بیوتکنولوژی به خصوص در تکنیک DNA Sequencing کاربرد داشته باشد (۴)، ما تصمیم به تکثیر این ژن گرفتیم که با موفقیت در آزمایشگاه انجام شد. در این طرح از جهش‌های حساس به سرما در Taq DNA polymerase جهت Hot Start شدن، استفاده نمودیم. جهش‌های حساس به سرما می‌تواند آنزیم Hot Start را برای بهتر شدن در واکنش PCR آماده کنند (۲۲).

چندین آزمایش در شرایط مختلف و با درجه حرارت متغیر انجام گرفت که تعیین کننده بهترین شرایط برای تکثیر این آنزیم بوده است. Taq DNA polymerase مقاوم به حرارت و حساس به سرمای نوترکیب بیان شده در E.coli، برتری قابل توجه و عملکرد بهتری در مقایسه با آنزیم تجاری از نظر فعالیت و مقاومت در برابر حرارت نشان داده است.

با توجه به اهمیت و سطح کاربرد آنزیم Taq در مطالعات زیست‌شناسی مولکولی، روش مورد استفاده در تولید این آنزیم، روشی کاربردی و مقرون به صرفه می‌باشد. علاوه بر این، سهولت تولید این آنزیم در روش به کار رفته و نیز صحت و دقت عمل آنزیم تولید شده، دلیل مناسب و قابل قبولی برای تولید

Archive of SID

www.SID.ir

آزمایشگاهی و محلی آنزیم Taq با خلوص بالا می‌باشد.

به طور خلاصه نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که برای اولین بار بعضی از اسیدآمینه‌های کلیدی برای افزودن خاصیت Cold Sensitivity در یک مولکول جهش‌یافته Taq DNA Polymerase تغییر داده شدند و این فعالیت در آنزیم ایجاد گردید و در نهایت آنزیم جدیدی ساخته شد که علاوه بر ثابت ماندن فعالیت پلیمرازی ’۳-’۵ و خاصیت اگزونوکلئازی ’۳-’۵، خاصیت پایداری حرارتی نیز به آن افزوده شد.

سپاسگزاری

از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر علی ناظمی که ضمن راهنمایی و همکاری بی‌دریغ، سخاوتمندانه امکانات موردنیاز این تحقیق را فراهم نمودند، بی‌نهایت سپاسگذارم. همچنین از مسئولان محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن که امکان اجرای این پروژه را در اختیار این‌جانب قرار داده‌اند، قدردانی می‌نمایم.

منابع:

1- Arnold F, H Volkov. Directed evolution of biocatalysts. Current Opinion in Chemical Biology, 1999; 3:54–59.
2- Barbes M and et al. Cold sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR, 2003; Vol 31, No 21: 6139-6147.
3- Barnes WM. The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by n N-terminal deletion, Gene. 1992; 112: 29-35.
4- Bebenek K, Kunkel TA. Functions of DNA polymerases. Adv.Protein, Chem, 2004; 69:137–165.
5- Braithwaite DK, Ito J. Compilation, alignment and phylogenetic relationships of DNA polymerases. Nucleic Acids Res, 1993; 21:787–802.
6- Cariello NF, Swenberg JA. and Skopek TR. Fidelity of Thermococcus litoralis DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res, 1991; 19: 4193-4198.
7- Desai U, Pfaffle P. Single-step purification of thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. Biotechniques, 1995; 19:780- 784.
8- Garcia-Diaz M, Bebenek K, Krahn JM, Pedersen LC, Kunkel TA. Structural analysis of strand misalignment during DNA synthesis by a human DNA polymerase. Cell, 2006; 124:331–342.
9- Goodman MF, Tippin B. The expanding polymerase universe. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol, 2000; 1:101–109.
10- Innis MA, Myabo KB, Gelfand DH, Brow MA. DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA. Procceding of the Natural Acaddemy of Sciences of the USA, 1988; 85:9436-9440.
11- Ito J, Braithwaite DK. Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. Nucleic Acids Res, 1991; 19:4045–4057.
12- Kermekchiev MB, Tzekov A, and Barnes WM. Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR. Nucleic Acids Res, 2003; 31(21): 6139–6147.
13- Khalaj-Kondori M, Sadeghizadeh M. Cloning, Sequence Analysis and Three- dimensional Structure Prediction of DNA Pol I from Thermophilic Geobacillus sp. MKK Isolated from an Iranian Hot Spring, 2007; 142: 200-208.
14-Komori K, Ishino Y. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3’-5’ exonucleolytic activities in Pyrococcus furiosus DNA polymerase I. protein engineering, 2000; 13(1): 41-47.
15- Lawyer F, Stoffel S, Saiki R. Isolation, characterization, and expression in Escherichia coli of the DNA polymerase gene from Thermus aquaticus. J. Biol. Chem, 1989; 264: 6427-6437.
16- Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from Escherichia coli. J. Biol. Chem, 1985; 233:163–170.
17- Mir Mohammad Sadeghi H, and et al. Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from Termus Aquaticus strain YT-1. Reasearch in Pharmaceutical Sciences, 2006; 1:49-52.
18- Patel PH, Suzuki M, Adman E, Shinkai A, Loeb LA. Prokaryotic DNA polymerase I: evolution, structure, and “base flipping” mechanism for nucleotide selection. J. Mol. Biol, 2001; 308(5): 823-37.
19- Plutheo FG. Rapid purification of high activity Taq DNA polymerase. Nucleic Acids Res, 1993; 21:4850-4851.
20- Rastgoo N. 2008, Study on a thermostable DNA polymerase I from hyperthermophilic bacteria of hot spring area of Iran to screen a novel enzyme with 3’-5’ exonuclease activity by site directed mutagenesis, Tarbiat Modares University (Persian in text full).
21- Roayaei M, Galehdari H. Cloning and Expression of Thermus aquaticus DNA polymerase in Escherichia coli. Jundishapur Journal of Microbiology, 2008; 1(1): 1-5.
22- Suzuki M, Yoshida S, Adman ET, Blank A & Loeb LA. Thermus aquaticus DNA polymerase I mutants with altered fidelity: interacting mutations in the O helix. J. Biol. Chem, 2000; 275:32728-32735.
23- Xiaowei Li and et al. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. 2010; 9(50): 8549-8554.

Archive of SID

www.SID.ir