ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۱۰-۴۰۳

کلونینگ، بیان و خالص سازی آنزیم لیپاز جهش یافته *Geobacillus thermocatenulatus* در مخمر *Pichia pastoris*

Cloning, expression and purification of mutated form of *Geobacillus thermocatenulatus* lipase in *Pichia pastoris*

مژده السادات غفوری*[۱]، علی‌اصغر کارخانه[۱]، محمدرضا عظیمی[۲]، باقر یخچالی[۱]، مهدی شمس آرا[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیار، دانشیار، استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۲- استادیار، دانشگاه زنجان

Ghafoori MS*[1], Karkhaneh AA[1], Azimi MR[2], Yakhchali B[1], Shamsara M[1]

1. MSc Student, Assistant Professor, Associate Professor, Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)
2. Assistant Professor, Zanjan University, Zanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mojdeh.ghafoori@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱)

چکیده

لیپازها یکی از پرکاربردترین آنزیم‌ها در صنایع بیوتکنولوژی و شیمی آلی هستند به طوری که به عنوان سومین آنزیم صنعتی اهمیت فراوانی داشته و مطالعات بسیاری بر روی آنها در حال انجام می‌باشد. لیپازهای باکتریایی از خانواده α/β هیدرولازها بوده که تری‌گلیسریدها را در حدفاصل آب و چربی کاتالیز و هیدرولیز می‌کنند. اغلب لیپازهای گرمادوست پایداری بالایی در دماهای بالا و حلال‌های آلی نشان می‌دهند و به همین علت در بررسی‌های ساختاری و کاربردهای صنعتی در مرکز توجه قرارگرفته‌اند. مقایسه ساختاری α/β هیدرولازها با لیپازهای باسیلوس نشان داده که دمین X_3 طی تکامل وارد ساختار لیپازهای باسیلوس شده است. در این تحقیق دمین X_3 از ساختار ژن لیپاز باکتری *Geobacillus thermocatenulatus* به منظور بررسی اثر آن بر فعالیت آنزیم با روش SOE-PCR حذف شد. ژن جهش‌یافته *btl2* در وکتور کلونینگ pPTZRT/57 و سپس وکتور بیانی pPICZαB کلون و پس از خطی شدن با روش الکتروپوریشن به مخمر *Pichia pastoris* GS115 انتقال داده شد. مخمر نوترکیب *Pichia pastoris* در محیط YPD کشت داده و با افزودن متانل به محیط کشت بیان لیپاز القا شد. بررسی محیط کشت با الکتروفورز SDS-PAGE و تست پارانیتروفنیل پالمیتات تولید و ترشح لیپاز به محیط کشت را تایید کرد. لیپاز ترشحی در محیط کشت توسط یک مرحله کروماتوگرافی تعویض یونی خالص شد و آنزیم با روش وسترن بلات تایید شد. بررسی‌ها نشان داد که آنزیم لیپاز جهش‌یافته BTL2 به خوبی توسط مخمر *Pichia pastoris* بیان و به خارج سلول ترشح می‌شود. نتایج نشان داد که *Pichia pastoris* احتمالا سیستمی مطلوب در بیان بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب در صنعت است.

واژه‌های کلیدی

ژن *BTL2*
کلونینگ
لیپاز
Geobacillus thermocatenulatus
Pichia pastoris

Archive of SID

مقدمه

استفاده از فرایندهای آنزیمی به تمدن‌های باستانی برمی‌گردد. امروزه، حدودا ۴۰۰۰ آنزیم شناسایی شده و حدود ۲۰۰ آنزیم کاربرد تجاری دارند و اکثرا از منابع میکروبی حاصل شده‌اند. تا دهه ۱۹۶۰، فروش کلی آنزیم‌ها سالانه فقط چند میلیون دلار بود، اما تجارت آن به طور چشمگیری رشد کرده‌است (Godfrey and West 1996). دانش آنزیم‌شناسی پیشرفت مهمی در صنعت زیست‌فناوری ایجاد کرد به طوری‌که در سال ۲۰۰۰ تجارت صنعتی آنزیم‌ها نزدیک به ۱/۵ میلیارد دلار رسید (Gupta et al. 2004). تخمین زده می‌شود که بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی با نرخ رشد سالانه ۶ درصد در طول یک دوره پیش‌بینی ۵ ساله از ۳/۳ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۰ به ۴/۴ میلیارد دلار در سال ۲۰۱۵ برسد (BCC research biotechnology report 2002). به علت پیشرفت و گسترش دانش تولیدات بیوشیمیایی، فرایندهای تخمیری و روش‌های بازیافت، تعداد زیادی از آنزیم‌ها می‌توانند به سهولت تولید شوند. فرآیندهای آنزیمی ذخیره‌کننده انرژی بوده و وسعت تخریب دمایی را کاهش می‌دهند. همچنین به علت آنکه آنزیم‌ها می‌توانند واکنش‌های مختلفی را کاتالیز کنند، تعداد آنزیم-هایی که در تجارت استفاده شده‌اند هر روزه افزایش می‌یابد (Sharma et al. 2001) و تولید آنزیم‌ها به صورت خالص، در مقیاس وسیع و با ویژگی‌های بهینه شده بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است. استفاده از فناوری DNA نوترکیب فرآیندهای دست-ورزی ژن را بهبود بخشیده و تجاری‌سازی آنزیم‌هایی که پیش از این نمی‌توانستند تولید شوند را فراهم کرده‌است. علاوه بر این پیشرفت‌های اخیر در زیست‌فناوری، با معرفی مهندسی پروتئین و تکامل هدفمند، انقلابی در پیشرفت آنزیم‌های تجاری ایجاد کرده-است (Kirk et al. 2002). این پیشرفت‌ها امکان تولید آنزیم‌هایی با فعالیت‌های جدید و یا سازگاری نسبت به شرایط جدید واکنش را فراهم کرده و موجب شده کاربردهای صنعتی آنزیم‌ها بسیار گسترده شود.

بخش عمده تجارت آنزیم‌های صنعتی توسط آنزیم‌های هیدرولیتیک همچون پروتئازها، آمیلازها، آمیدازها، استرازها و لیپازها تصرف شده است. در بین آنزیم‌ها، لیپازها از اهمیت بیشتری برخوردارند (Houde et al. 2004). بر اساس میزان فروش کل، لیپازها بعد از پروتئازها و کربوهیدرازها به عنوان سومین گروه بزرگ آنزیم‌ها شناخته شده‌اند. استفاده تجاری لیپازها یک میلیارد دلار است که گستره متنوعی از کاربرد در صنایع مختلف از جمله تولید شوینده‌ها، صنایع غذایی، دارو سازی، کشاورزی و ... را شامل می‌شود. اخیرا لیپازها بسیار مورد توجه قرار گرفته طوری که این افزایش توجه، با افزایش حجم اطلاعات در مورد لیپازها در مقالات منتشر شده همراه بوده است. توجه به این گروه از آنزیم‌ها به علت بررسی نقش آنها در بیماریزایی و افزایش استفاده آن‌ها در کاربردهای زیست فناوری می‌باشد. لیپازها به علت فعالیت تحت شرایط معمولی، پایداری بسیار بالا در محلول‌های آلی، نشان دادن اختصاصیت سوبسترایی گسترده کاتالیزورهای زیستی ارزشمندی هستند (Hasan et al. 2006). همچنین این آنزیم‌ها به سهولت در مقادیر زیاد موجود هستند به علت آنکه بسیاری از آن‌ها با بازده بالا از ارگانیسم‌های میکروبی، به ویژه قارچ‌ها و باکتری‌ها حاصل شده و ساختار کریستاله این لیپازها بدست آمده، که طراحی روش‌های مهندسی هدفمند را تسهیل می‌کند. آنها معمولا به کوفاکتور نیاز ندارند و هنگام کاتالیز واکنش‌های جانبی انجام نمی‌دهند. این ویژگی‌ها لیپازها را به عنوان گروهی از کاتالیزورهای حیاتی با کاربرد بسیار متنوع در شیمی آلی قرار می‌دهد (Jaeger and Eggert 2002). لیپازها (EC (3.1.1.3 یا تری‌اسیل‌گلیسرول‌ها هیدرولیز و سنتز انواع روغن‌های طبیعی، تری‌گلیسریدها و استرهای اسیدهای چرب را کاتالیز می‌کنند و به طور گسترده‌ای در گیاهان و جانوران، همچنین در میکروارگانیسم‌ها پراکنده شده‌اند. اما پرمصرف‌ترین لیپازها از لحاظ تجاری لیپازهای با منشا میکروبی بوده که بیشتر باکتریایی، مخمری و قارچی هستند (Li and Zong 2001). خصوصا لیپازهای باکتریایی نقش مهمی در تجارت دارند. تقاضا برای کاتالیزرهای حیاتی و استفاده از آن‌ها در فرآیندهای صنعتی زیاد است. آنزیم‌ها نه تنها باید به طور موثر واکنش مورد نظر را کاتالیز کنند بلکه باید در شرایط دشوار واکنش مثل درجه حرارت بالا، حلال‌های آلی، pH بالا و شرایط اکسیداتیو پایدار باشند. تولید آنزیم‌ها و هزینه‌های خالص‌سازی آنها باید پایین باشد. اما، همواره عملکرد آنزیمی که در واکنش معینی فعال است برای استفاده در فرآیندهای صنعتی مناسب و کافی نیست

Archive of SID
www.SID.ir

(Bornscheuer et al. 2002). مهندسی پروتئین می‌تواند پاسخ-گوی تقاضای استفاده از کاتالیزورهای حیاتی باشد. امروزه مهندسی پروتئین به یکی از ابزارهای قدرتمند در زمینه زیست-فناوری تبدیل شده است طوری که با بهره گیری از تکنولوژی DNA نوترکیب بر محدودیت‌های آنزیم های طبیعی غلبه کرده و ویژگی‌های مطلوب موردنظر را با توجه به نیاز مصرف‌کننده و فرآیندهای صنعتی در آنها به وجود می‌آورد (Derwenda et al. 1992). همچنین به علت آنکه میزان لیپازی که از میکروارگانیسم-های حرارت دوست به دست می‌آید کم بوده و از نظر اقتصادی برای کاربردهای صنعتی مقرون به صرفه نخواهد بود پژوهشگران به دنبال میزبان‌های مناسبی هستند که بتوانند ژن‌های مربوط به این نوع لیپازها را در آنها کلون و مقادیر بالایی از آنزیم را توسط آنها تولید کنند (Leow et al. 2007). امروزه مخمر متیلوتروف پیکیا پاستوریس[1] به طور گسترده‌ای برای بیان خارج سلولی بسیاری از لیپازها به ویژه انواع نوترکیب استفاده می‌شود. دارا بودن ویژگی‌هایی همچون راه‌انداز قوی برای القای بیان ژن خارجی، محیط کشت ساده، توانایی تاخوردگی در پروتئین، تغییرات پس از ترجمه و دستکاری ژنتیکی آسان و ... باعث شده تا این مخمر به میزبانی ایده‌آل برای بیان پروتئین‌ها تبدیل شود (Daly and Hearn 2005).

در سال‌های اخیر تقاضای زیادی برای آنزیم‌های مقاوم به حرارت در زمینه‌های صنعتی ایجاد شده است لیپازهای مقاوم به حرارت و قلیادوست، اخیرا در جنس جدیدی به نام *Geobacillus* در زیرخانواده I.5 مجددا طبقه‌بندی شده‌اند. باکتری *Geobacillus thermocatenulatus* حرارت دوست (گرم مثبت، هوازی، میله‌ای شکل)، دو لیپاز BTL1[2] و BTL2[3] با اندازه‌های متفاوت تولید می‌کند. BTL2 یک پروتئین kD ۴۳ است که در دماهای میانی (۵۰°C)، pH قلیایی (۱۱-۹)، و در محلول‌های آلی (۲-پروپانول، استون، متانول) پایداری دارد (Carrasco-Lo´pez et al. 2009). BTL2 ساختاری مشابه با α/β هیدرولازها دارد که دارای ۸ صفحه بتای مرکزی بوده که توسط مارپیچ‌های آلفا احاطه شده است. اما در ساختار لیپاز BTL2 دمین جایگاه اتصال فلز روی (x3 و x5) علاوه بر جایگاه اتصال کلسیم اضافه شده است. مقایسه ساختار آنزیم BTL2 با α/β هیدرولازها نشان می‌دهد دمین x3 که احتمال می‌رود در پایداری دمایی آنزیم اثر داشته باشد در α/β هیدرولازها وجود ندارد و در طی تکامل وارد ساختار لیپازهای باسیلوسی شده است. لذا هدف از انجام این پژوهش حذف دمین x3 با استفاده از روش مهندسی پروتئین، کلون‌سازی و بیان ژن نوترکیب لیپاز BTL2 در مخمر *Pichia pastoris* می‌باشد. اخیرا لیپازهای بسیاری به صورت پروتئین خارج سلولی در پیکیا پاستوریس بیان شده‌اند. با توجه به اهمیت آنزیم لیپاز در صنایع گوناگون کار بر روی مهندسی پروتئین، کلون‌سازی و بیان آنزیم فوق ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور دستیابی به روش مناسبی که قادر به فراهم کردن شرایطی مناسب برای تولید آنزیم تغییریافته مطلوب و خالص‌سازی آسان‌تر باشد، ضروری است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده

باکتری *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL2) (شرکت DSMZ)، باکتری *E. coli* سویه Top10 (شرکت اینویتروژن[4])، مخمر *Pichia pastoris* سویه GS115 (شرکت اینویتروژن)، پلاسمیدهای pTZ57R/T (فرمنتاز) و pPICZαB (اینویتروژن)

کلونینگ ژن لیپاز جهش یافته

به منظور انجام مطالعات بیوانفورماتیکی، پیشگویی ساختار پروتئین و طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت حذف دمین x3 از ژن لیپاز، ابتدا توالی ژن لیپاز *G. thermocatenulatus* (*btl2*) از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[5] (NCBI) با شماره X95309 در GeneBank گرفته شد. ژن لیپاز BTL2 باسیلوس ترموکاتنولاتوس با آغازگرهای مناسب تکثیر و در پلاسمید pPTZRT/57 کلون شد. سپس با روش SOE-PCR و با استفاده از آغازگرهای جهش‌زا دمین X3 حذف شد- طی سه مرحله PCR متوالی، یک جفت آغازگر اختصاصی و یک جفت آغازگر همپوشان جهت اعمال جهش دمین X3 حذف شد. ابتدا توسط PCR اول توالی

[1] *Pichia pastoris*
[2] *Bacillus thermocatenulatus 1* (*BTL1*)
[3] *Bacillus thermocatenulatus 2* (*BTL2*)
[4] Invitrogene
[5] National Center of Biotechnological Information

Archive of SID
www.SID.ir

نوکلئوتیدی قبل از مارپیچ X3 با جهش در انتهای ´۳ توالی تکثیر شد و در PCR دوم توالی نوکلئوتیدی بعد از توالی مارپیچ X3 با جهش در ابتدای ´۵ این توالی تکثیر شد. سپس از خصوصیت همپوشانی انتهای محصول PCR اول و ابتدای محصول PCR دوم استفاده و محصول هر دو PCR بدون استفاده از آنزیم لیگاز در PCR سوم به یکدیگر متصل شد، و مجددا ژن لیپاز جهش‌یافته *btl2* در وکتور کلونینگ pPTZRT/57 کلون شد. وکتور نوترکیب pKGH-TX3 به باکتری *E.coli* TOP10 انتقال داده شد و سلول های نوترکیب بر روی پلیت LB حاوی آمپی سیلین، X-Gal و IPTG انتخاب شدند. پس از تایید صحت کلونینگ با روش‌های هضم آنزیمی، PCR و تعیین توالی، ژن *btl2* جهش‌یافته با آنزیم-های *Xba*I و *Pst*I از وکتور نوترکیب pKGH-TX3 خارج و در وکتور بیانی pPICZαB بریده شده با آنزیم‌های فوق کلون شد. سپس وکتور نوترکیب pKGH-PX3 به باکتری *E.coli* TOP10 انتقال داده شد و بر روی محیط LB کم نمک (۰/۵ درصد نمک) حاوی µg/ml ۲۵ آنتی‌بیوتیک زئوسین غربال شد.

انتقال پلاسمید نوترکیب pKGH-PX3 به مخمر *pichia pastoris*

پلاسمید pKGH-PX3 با آنزیم *Sac*I خطی شد، و به وسیله الکتروپوریشن (طبق دستورالعمل دستگاه) به درون *P.pastoris* GS115 انتقال و در پلیت YPD (یک درصد عصاره مخمر، دو درصد پپتون، دو درصد گلوکز، دو درصد آگار) حاوی µg/ml ۲۵ آنتی‌بیوتیک زئوسین کشت داده شد. پلیت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کلونی‌ها ظاهر شوند. کلون‌های دارای فنوتیپ Mut^+ با کشت بر روی دو محیط MMH (۱/۳۴ درصد YNB، ۴×۱۰^{-۵} بیوتین و ۰/۵ درصد متانول) و MDH (۱/۳۴ درصد YNB، ۴×۱۰^{-۵} بیوتین و دو درصد گلوکز) شناسایی و با واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای AOX تایید شدند.

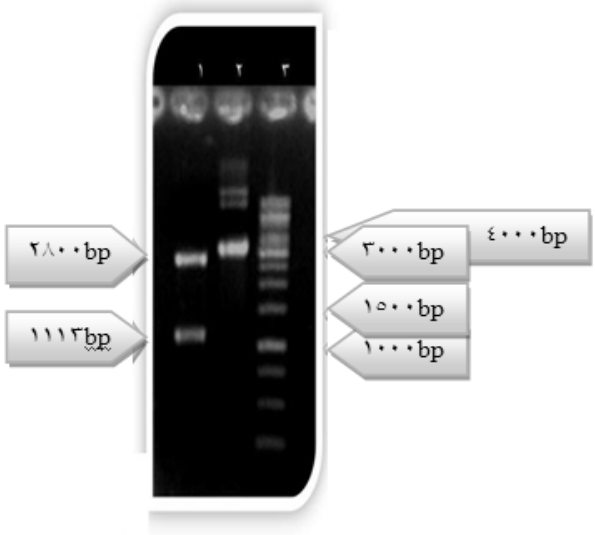
بیان لیپاز جهش یافته در مخمر *Pichia pastoris*

یک کلون از کلونی‌های نوترکیب Mut^+ پیکیا پاستوریس در ml ۱۰۰ محیط YPG به مدت ۲۴ ساعت، دمای ۳۰ درجه و دور rpm ۲۰۰ کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری، محیط کشت سانتریفیوژ شد و رسوب سلول‌ها در محیط BMMH (۱/۳۴ درصد YNB، ۴×۱۰^{-۵} بیوتین، ۰/۵ درصد متانول، ۱۰۰ mM فسفات پتاسیم، pH =۶) حل شدند. جهت القا راه‌انداز AOX1 هر ۲۴ ساعت متانل در غلظت نهایی ۰/۵ درصد اضافه شد. در حین آنکه هر ۲۴ ساعت ۰/۵ درصد متانول به محیط اضافه می‌شد، دو میلی‌لیتر از محیط کشت برای تعیین رشد سلولی و تعیین فعالیت لیپاز برداشته می‌شد. بررسی بیان در کلون‌های نوترکیب القا شده با استفاده از تست پارانیتروفنیل پالمیتات (pNPP) انجام شد. برای تفکیک و تعیین جرم مولکولی پروتئین‌ها، از الکتروفورز با ژل SDS-PAGE استفاده شد. به منظور خالص‌سازی پروتئین‌ها از ستون تعویض یونی استفاده شد. رسوب سلولی توسط سانتریفوژ کاملا از سوپرناتانت جدا شد. محیط کشت حاوی لیپاز از ستون حاوی DE52 که با بافر فسفات میلی‌مولار در pH به تعادل رسیده بود، عبور داده شد و در نهایت با توسط نمک کلرید سدیم ۵۰۰ میلی‌مولار شستشو صورت گرفت و سپس فراکشن‌های حاصل جمع‌آوری شد و با ژل SDS-PAGE بررسی شد. برای تایید پروتئین لیپاز BTL2 (لیپاز جهش‌یافته)، ابتدا ژل الکتروفورز از لیپاز در حضور شاهدهای مثبت و منفی تهیه شد. سپس ژل با ایمنوبلات با استفاده از آنتی‌بادی ضد لیپاز تهیه شده از خرگوش بررسی شد.

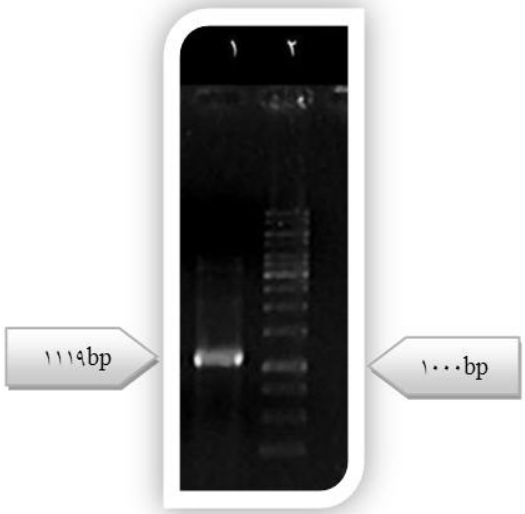
نتایج و بحث

به منظور بررسی اثر دمین X3 بر فعالیت آنزیمی لیپاز، این دامنه با روش SOE-PCR حذف شد. اعمال حذف مورد نظر با استفاده از توالی‌یابی DNA تایید شد. پس از کلونینگ ژن جهش‌یافته *btl2* (۱۱۱۹ bp) در پلاسمید pTZ57R/T، صحت کلونینگ با واکنش هضم آنزیمی (شکل۱) و PCR (شکل۲) و روش تعیین توالی تایید شد. سپس ژن جهش‌یافته *btl2* در وکتور بیانی pPICZαB (۳۶۰۰ bp) تحت کنترل راه‌انداز AOX1 کلون شد. تایید کلونینگ به روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Pst*I و *Xba*I و PCR انجام شد. جهت انتقال ژن *btl2* تغییر یافته به مخمر *Pichia pastoris* GS115 وکتور نوترکیب pKGH-PX3 با آنزیم *Sac*I خطی شد و با الکتروپوریشن به سلول‌های مستعد مخمر انتقال یافت. برای تایید تراریخت شدن مخمر از PCR استفاده شد که علاوه بر حضور ژن در ژنوم مخمر، فنوتیپ آن را نیز مشخص می‌کند (شکل۳). همان‌گونه که پیش از این اشاره شد برای تعیین

Archive of SID
www.SID.ir



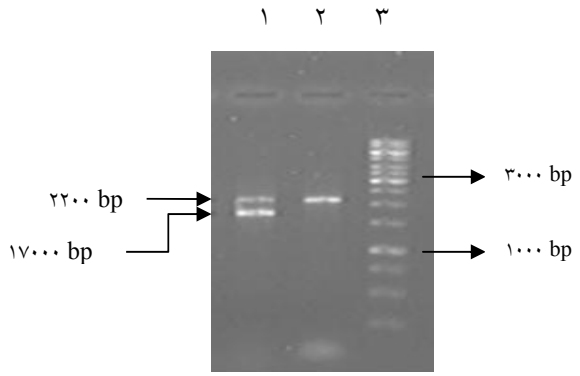
شکل۱- الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pKGH-Tα3 با آنزیم‌های *Xba* I و *Pst* I؛ چاهک ۱) محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب؛ چاهک۲) پلاسمید نوترکیب بریده نشده؛ چاهک ۳) نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb DNA ladder Fermentas).



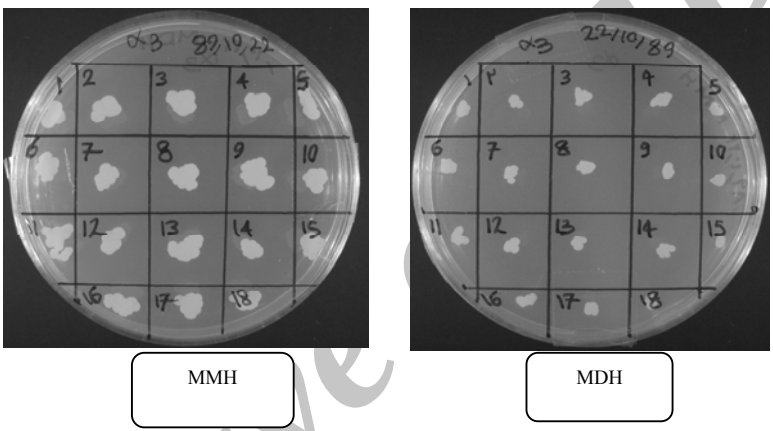
شکل۲- تایید صحت همسانه‌سازی با واکنش PCR؛ چاهک ۱) تکثیر قطعه bp ۱۱۱۹ در پلاسمید نوترکیب pKGH-Tα3؛ چاهک ۲) نشانگر وزن مولکولی DNA (1 kb DNA ladder Fermentas).

فنوتیپ مخمرهای تراریخت، کلونی آنها بر روی محیط‌های MMH و MDH کشت داده شد. کلونی‌هایی که بر روی هر دو محیط MMH و MDH رشد کردند (شکل۴) و در واکنش PCR آنها نیز دو قطعه bp ۲۲۰۰ مربوط به ژن *AOX1* در مخمر و bp ۱۷۰۰ مربوط به ژن *btl2* تکثیر شده با آغازگرهای AOX دیده شد، Mut^+ (استفاده از متانول با سرعت بالا به دلیل وجود ژن *AOX1* در مخمر و ورود ژن خارجی بدون تخریب آن)، انواعی که فقط بر روی MDH رشد کردند و تنها قطعه bp ۱۷۰۰ را در PCR نشان دادند، Mut^s. (استفاده از متانول با سرعت پایین به دلیل تخریب ژن *AOX1* ناشی از جایگزین شدن با ژن خارجی) و انواعی که روی هیچ یک رشد نکردند، Mut^- (عدم استفاده از متانول) بودند.

www.SID.ir



شکل۳- تایید الحاق ژن *btl2* جهش یافته در ژنوم *P.pastoris* GS115 چاهک ۱) محصول PCR تکثیر ژن لیپاز قرار گرفته در ژنوم مخمر با آغازگرهای AOX1؛ ۲) کنترل منفی؛ ۳) نشانگر 1 KB

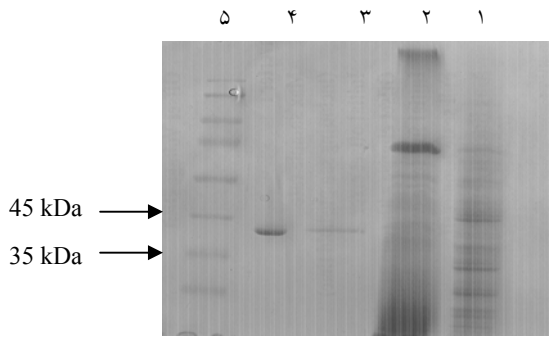


شکل ۴- کشت کلونی بر روی محیط به ترتیب از راست به چپ MDH و MMH

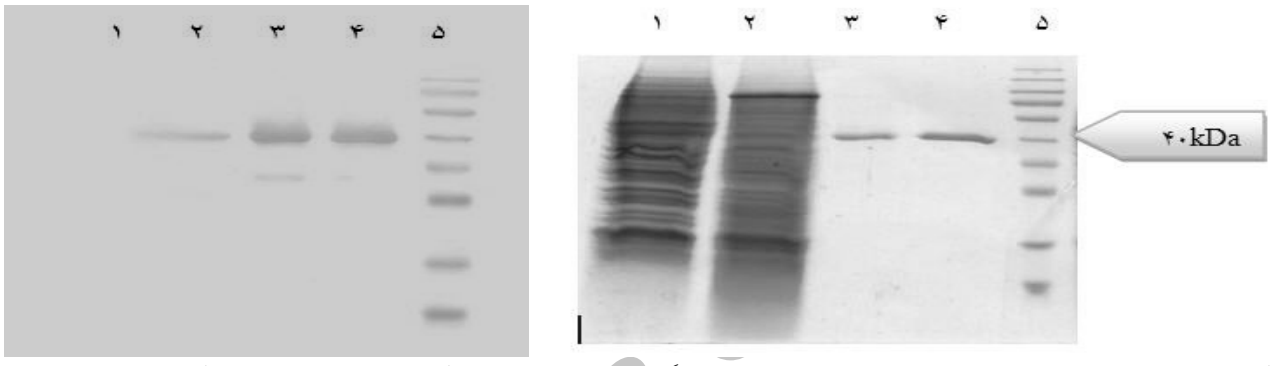
برای بیان یک کلون از کلونی‌های نوترکیب دارای فنوتیپ Mut^+ ابتدا در محیط YPG و سپس BMMH کشت داده شد و بیان لیپاز با متانول القا شد. آنالیز محیط کشت مخمر بعد از ۹۶ ساعت با ژل SDS-PAGE و تست پارانیتروفنیل پالمیتات، ترشح لیپاز با وزن مولکولی حدود kDa ۳۹ به محیط کشت را تایید کرد (شکل۵). در بررسی بیان با تست پارانیتروفنیل پالمیتات رنگ زرد تولید شده نشان‌دهنده بیان و ترشح لیپاز در محیط کشت بود. جهت خالص‌سازی لیپاز جهش‌یافته ۲۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی لیپاز با استفاده از یک مرحله کروماتوگرافی تعویض یونی خالص‌سازی شد و با الکتروفورز ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل۷). نتایج الکتروفورز نشان داد که لیپازهای خالص شده با کروماتوگرافی یک مرحله‌ای از خلوص مناسبی برخوردارند. در این پژوهش لیپاز خام تا ۳/۶ برابر با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی خالص شد، هنگامی که محتوای پروتئینی اندازه‌گیری شد یک پیک تشکیل شد. همانگونه که در شکل۶ نشان داده شده، لیپاز خالص شده یک تک باند در ژل ۱۳ درصد SDS-PAGE در محدوده وزن مولکولی kDa ۳۹ نشان داد. در بررسی پروتئین با روش ایمنوبلات، لیپاز خالص شده در ردیف کنترل مثبت قرار گرفت و در موقعیت کنترل منفی باندی مشاهده نشد. پروتئین BTL2 با وزن مولکولی حدود KDa ۴۰ در شکل مشاهده می‌شود.

لیپازها به عنوان سومین آنزیم صنعتی دنیا و کاربرد گسترده در صنایع مختلف به عنوان موضوعی مهم تحت مطالعه و بررسی هستند. با توجه به تقاضا برای کاتالیزورهای حیاتی و کاربرد

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۵- بررسی بیان لیپاز در مخمر *P.pastoris* GS115. چاهک ۱) مخمر GS115 قبل از القا؛ چاهک ۲) مخمر GS115 بعد از القا؛ چاهک ۳) سوپ محیط کشت BMMH؛ چاهک ۴) لیپاز استاندارد؛ چاهک ۵) نشانگر وزنی SMO671.



شکل۶- مطالعه لیپازهای طبیعی و جهش یافته تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی تعویض یونی توسط الکتروفورز و وسترن بلات. چاهک ۱) محیط کشت مخمر Gs115 (کنترل منفی)؛ چاهک ۲) محیط کشت بعد از القا؛ چاهک ۳) لیپاز طبیعی خالص (کنترل مثبت)؛ چاهک ۴) لیپاز جهش‌یافته خالص؛ چاهک ۵) نشانگر وزنی SMO671.

گسترده آنها در فرایندهای صنعتی، مهندسی پروتئین یکی از راه-های موثر برای تهیه آنزیم‌هایی با ویژگی‌های مطلوب است. استفاده از مخمر متیلوتروف *P.pastoris* به عنوان میزبان سلولی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب نظیر لیپاز نوترکیب در حال حاضر افزایش یافته‌است. این مخمر داری راه‌اندازهای قوی بوده که بیان ژن خارجی را القا می‌کند بنابراین قادر به تولید مقادیر فراوانی از پروتئین هدف خواهد بود. در پژوهش حاضر انتظار می‌رود که حذف دامنه X3 اثراتی بر خصوصیات و فعالیت آنزیم داشته باشد. بررسی ویژگی‌های آنزیمی با توجه به تغییر اعمال شده در دست انجام می‌باشد.

منابع

Bornscheuer UT, Bessler C, Srinivas R, Krishna SH (2002) Optimizing lipases and related. enzymes for efficient application. TRENDS in Biotechnology 20: 433-437.

Carrasco-Lo´pez C, Godoy C, Rivas BDL, Fernandez-Lorente G, Palomo J, Guisan J, Fernandez-Lafuente R, Martinez-Ripoll M and Hermoso JA (2009) Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. Journal of Biological Chemistry 284: 4365-4372.

Daly R, Hearn MTW (2005) Expression of hetrologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. Journal of Molecular Recognition 18: 119-138.

Godfrey T, West S (1996) Industrial enzymology. Macmillan press. London. UK.

Drewenda ZS, Derewenda U (1991) Relationships among serine hydrolases: evidence for a common structural motif in triacylglycerol lipases and esterases. Biochemistry and Cell Biology 69: 842-851.

Archive
www.SID.ir

Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. Li N, Zong MH (2001) Lipases from the genus Penicillium: Production, purification, characterization and applications. Journal of Molecular Catalysis 66: 43-54.
Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnology Advances 19: 627-662.
Shu ZY, Jiang H, Lin RF, Jiang YM, Lina L, Huang JZ (2010) Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. Journal of Molecular Catalysis 62: 1-8.

Current Opinion in Biotechnology 13: 390-397.
Houde A, Kademi A, Leblanc D (2004) Lipases and their industrial applications. Applied Biochemistry and Biotechnology 118:155-170.
Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology 13: 345-351.
Leow TC, Zaliha RN, Rahman RA, Basri M, Salleh AB (2007) A thermoalkaliphilic lipase of Geobacillus sp. T1. Extremophiles 11: 527-535.

Archive of SID

www.SID.ir