ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحه ۱۰-۱

کلونینگ و بیان خارج سلولی آنزیم لاکاز از باکتری باسیلوس بومی چشمه‌های آب گرم ایران درمخمر *Pichia pastoris*

Cloning and extracellular expression of laccase enzyme from bacillus of Iranian hot spring into yeast cell *Pichia pastoris*

محمد پرند[۱]، سید امید رعنایی‌سیادت[۲]، احد یامچی[*۱]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- استادیار، دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی

Parand M[1], Ranaei Siadat SO[2], Yamchi A[*3]

1. PhD student and Assistant professor, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Assistant professor, Faculty of Energy and New Technologies, Shahid Beheshti University, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: yamchi@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۵- تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

لاکازها (EC 1.10.3.2) توانایی اکسیداسیون دامنه وسیعی از سوبستراهای فنولی و غیر فنولی را دارند. میزبان مخمری با توجه به مزیت‌هایی که در قدرت راه‌انداز، کارایی ترشح، رشد سریع و آسان و عدم سمیت غذایی نسبت به سایر میزبان‌های سلولی دارند، به طور قابل توجهی در تولید مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این تحقیق ژن کد کننده آنزیم لاکاز که از باکتری باسیلوس سویه HR30 جداسازی شده بود با ترجیح کدونی برای مخمر *Pichia pastoris* سنتز شده و سپس در پلاسمید بیانی مخصوص مخمر پیکیا پاستوریس کلون شده و از طریق روش الکتروپوریشن به داخل مخمر انتقال یافت. برای تائید کلونینگ از روش کلونی PCR و هضم آنزیمی استفاده شد و قطعه ۱۵۴۲ جفت بازی مشاهده شد. سپس ژن مورد نظر تحت شرایط دمایی و غلظت‌های متفاوت از سولفات مس بیان شد. نتایج نشان داد که میزان تولید پروتئین در غلظت‌های یک، یک و نیم و دو میلی‌مولار از سولفات مس (به عنوان کوفاکتور برای آنزیم) و درجه حرارت‌های ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد محیط کشت متغیر بود. کاهش دمای محیط کشت تا مرز ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت دو میلی‌مولار ازسولفات مس توانست باعث بهبود فرایند تاخوردگی مجدد و فعالیت آنزیم لاکاز شود.

واژه‌های کلیدی

بیان خارج سلولی
پیکیا پاستوریس
سولفات مس
لاکاز
مخمر

Archive of SID

مقدمه

لاکازها (EC: 1.10.3.2) اکسیدازهای چند مسی n-گلیکوزیله شده می‌باشند که متعلق به گروهی از پروتئین‌های حاوی مس هستند (Xu 1996). لاکازها به طور گسترده در قارچ‌ها و گیاهان عالی یافت شده اما به نسبت کمتر در حشرات و باکتری‌ها نیز دیده می‌شوند. لاکاز برای اولین بار توسط فردی به نام Yoshida در سال ۱۸۸۳ معرفی شد (Thurston 1994). در سال‌های اخیر حضور آنزیم لاکاز در آسکومیست‌ها، دئترومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها نشان داده شده است. علاوه بر این لاکازها به طور ویژه‌ای در قارچ‌های white-rot fungi که در متابولیسم لیگنین درگیر هستند، یافت می‌شوند (Thurston 1994). مولکول لاکاز قارچی به طور معمول شامل چهار اتم مس است، در حالی‌که بعضی از انواع آنزیم لاکاز نیز یافت می‌شود که حاوی سه اتم مس در ساختار خود می‌باشد. لاکازها وزن مولکولی در حدود ۱۰۰-۵۰ کیلو دالتون دارند و وقتی ABTS[1] به عنوان سوبسترا به کار برده می‌شود pH بهینه آنزیم در دامنه ۵-۳ قرار می‌گیرد (Heinzkill et al. 1998). لاکازها می‌توانند به صورت پلیمریک باشند و شکل آنزیمی و فعال آن نیز می‌تواند به صورت یک مونومر، دایمر، تریمر و یا تترامر باشد. آنزیم مذکور اگر از منبع یوکاریوتی بدست آید سطح بالایی از گلیکوزیلاسیون را نشان می‌دهد که این می‌تواند باعث افزایش پایداری آنزیم از طریق ایجاد پیوندهای کووالانسی با کربوهیدرات شود و در حدود ۱۰ تا ۴۵ درصد کل وزن پروتئین را به خود اختصاص می‌دهد (Kunamneni et al. 2007). برای لاکازها شماری از کاربردهای صنعتی پیشنهاد می‌شود که شامل تهیه کاغذ، سمزدایی از آلاینده های محیطی، اکسیداسیون رنگ‌ها و پیش ماده آنها، ایجاد تغییرات آنزیمی در واسطه‌های شیمیایی می‌باشد. دو مورد از مهمترین کاربردهای آنزیم لاکاز که بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌است، عبارتست از ۱) لیگنین زدایی و سفید کردن خمیر چوب ۲) پاک سازی زیستی آلاینده‌های محیطی (Schlosser et al. 1997).

چهار یون مس در ساختار آنزیم لاکاز در سه نوع طبقه‌بندی می‌شوند: مس نوع یک (T1)، مس نوع دو(T2) و مس نوع سه (T3) (Yaropolov et al. 1994). مس نوع T1 مسئول رنگ آبی آنزیم است و طیف جذبی آن در حدود ۶۱۰ نانومتر است. مس نوع T2 فاقد طیف جذبی خاصی می‌باشد و با استفاده از روش طیف سنجی قابل شناسایی نمی‌باشد اما می‌تواند با ایجاد یک خصوصیت رزونانس القایی پارامغناطیسی (EPR)[2] مورد شناسایی قرار گیرد (Leontievsky et al. 2000). مس نوع T3 به صورت دو هسته‌ای بوده و دارای خاصیت پارامغناطیسی است و دارای طیف جذبی در محدوده ۳۳۰ نانومتر می‌باشد و همچنین یک خصوصیت طیف فلورسنسی را هم از خود نشان داد (Shin et al. 2000). مس‌های نوع T2 و T3 در یک خوشه سه هسته‌ای قرار می‌گیرند و در این مکان احیای اکسیژن مولکولی و آزادسازی آب اتفاق می‌افتد (Gianfreda et al. 1990). مس نوعT1 که در مرکز قرار می‌گیرد در اکسیداسیون سوبستراهای کاهنده و انتقال الکترون‌ها به مس نوع T2 و T3 نقش دارد. مس نوع T1 دارای یک رابطه سه گانه با اسید آمینه‌های هیستیدین و سیستیین است در حالی‌که در انواع باکتریایی آنزیم لاکاز چهار موقعیت مختلف همراه با یک متیونین فراهم می‌شود و در انواع قارچی این موقعیت چهارم با یک لوسین و یا یک فنیل آلانین فراهم می‌شود. به هر حال پتانسیل احیای مکان T1 در لاکازهای مختلف در محدوده ۷۸۰-۴۳۰ mv قرار می‌گیرد (Xu 1996). این موضوع ثابت شده که کارایی کاتالیتیکی آنزیم لاکاز برای بعضی از سوبستراهای کاهنده یک رابطه خطی با پتانسیل احیای مکان T1 دارد. بنابراین آنزیم لاکازی که دارای پتانسیل احیای بالایی در مکان T1 باشد، برای کاربردهای زیست فناوری می‌تواند بسیار مفید واقع شود. چرخه کاتالیتیک آنزیم لاکاز (به همراه چهار اتم مس) که به وسیله Yaropolov et al. (1994) توصیف شد، احیای اکسیژن مولکولی به دو مولکول آب را نشان می‌داد. به منظور احیای اکسیژن مولکولی به آب، آنزیم لاکاز مانند یک باطری عمل می‌کند و الکترون‌ها را از واکنش‌های اکسیداسیون منحصر به فردی ذخیره می‌کند. اکسیداسیون سوبسترا به وسیله لاکاز یک واکنش تک الکترونی محسوب می‌شود که باعث آزادسازی رادیکال‌های آزاد می‌شود. بنابراین اکسیداسیون چهار مولکول سوبسترای کاهنده برای احیای کامل اکسیژن مولکولی به دو

[1] 2,2′-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate)

[2] Electron paramagnetic resonance

Archive of SID
www.SID.ir

مولکول آب ضروری می‌باشد. بنابراین جزئیات احیای اکسیژن مولکولی هنوز به طور کامل شفاف نشده و تحقیقات در این زمینه همچنان ادامه دارد.

مخمرها بدلیل مزیت‌هایی که در رشد سریع و آسان و کارآمدی ترشح دارند، به عنوان میزبانان بسیار کارآمد در زمینه بیان ژن خارجی مطرح می‌باشند و به عنوان یک ارگانیسم غذایی برای تولید پروتئین‌های دارویی و غذایی بسیار مورد قبول می‌باشند. در سال‌های اخیر محققان علاقه زیادی به شناسایی و تعیین خصوصیات لاکاز از منبع باکتریایی نشان داده‌اند. در این تحقیق ژن کد کننده آنزیم لاکاز از باکتری باسیلوس سویه HR03 جداسازی شد (Dalfard et al. 2006) و تحت شرایط میکروبی و درجه حرارت‌های خاصی به منظور به دست آوردن مقادیر بالا از پروتئین قابل حل در مخمر پیکیا پاستوریس بیان شد.

مواد و روش‌ها

DNA پلیمراز Taq، آنزیم‌های محدودگر و سایر آنزیم‌ها در این تحقیق از شرکت فرمنتاز تهیه شد. سرین گالدازین[1] به عنوان سوبسترای آنزیمی از شرکت سیگما تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده نیز از شرکت مرک، ساخت کشور آلمان سفارش داده شد.

تولید و همسانه‌سازی ژن لاکاز

ژن کد کننده آنزیم لاکاز با شماره ثبت *FJ663050* در بانک اطلاعاتی ژن (NCBI) با ترجیح کدونی مخمر پیکیا پاستوریس سنتز شد و ژن سنتز شده در قالب پلاسمید PUC-LCC دریافت شد. این پلاسمید ابتدا جهت تکثیر به باکتری *E.coli* DH5α انتقال داده شد و سپس جهت تایید حضور ژن لاکاز واکنش PCR و هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *Xho*I و *Kpn*I انجام شد. ژن کد کننده آنزیم لاکاز بعد از جداسازی از پلاسمید PUC به همراه پلاسمید Ppink-α که پلاسمید بیانی مخصوص پیکیا پاستوریس است، ابتدا توسط آنزیم‌های *Kpn*I و *Xho*I (سایت‌های برشی برای این آنزیم‌ها در ابتدا و انتهای ژن طراحی شد و در پلاسمید بیانی وجود داشت) مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و سپس توسط کیت تخلیص DNA (شرکت فرمنتاز) تخلیص شد. هر دو محصول بدست آمده از تخلیص در حضور آنزیم T4 DNA لیگاز (شرکت فرمنتاز) به یکدیگر متصل شدند و محصول این اتصال به داخل سلول مستعد *E.coli* DH5α منتقل شد. در تمامی مراحل از پروتوکول شرکت اینویتروژن به نام PichiaPink™ Expression System استفاده شد. محصول ترانسفورماسیون به روی پلیت‌های LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین در غلظت 100 µg/ml انتقال داده شد تا نتیجه تراریختی قابل مشاهده باشد. از کلونی‌ها پلیت مستر تهیه شد و در نهایت این کلونی‌ها با روش کلونی PCR از جهت تایید حضور ژن مورد بررسی قرار گرفتند و سرانجام جهت استخراج پلاسمید از این کلونی‌ها کشت LB مایع گذاشته شد و استخراج پلاسمید نیز با کیت شرکت سیناژن و ویوانتیس انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از کیت شرکت سیناژن و پلاسمید استخراج شده مربوطه به‌عنوان الگو، آغازگر رفت با توالی '5- GAGCTCGAGTCAAAGGGTTATCGACA-3' و در نهایت آغازگر برگشت نیز با توالی '5-GGTACCGCATGCCTACTATCTGGAACC-3' و بر اساس برنامه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه/ دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه/ اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه/ مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه/ و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. (مراحل سه‌گانه در ۳۰ چرخه) انجام شد.

تایید صحت کلونینگ با روش هضم آنزیمی و کلونی PCR انجام شد. جهت تراریزش و انتقال ناقل pPink-LCC به درون مخمر، لازم است که این پلاسمید توسط آنزیم محدود کننده *Bspt*I به صورت خطی در آید. برای انجام هضم آنزیمی ۶۰ میکرولیتر از پلاسمید، ۵ میکرولیتر از آنزیم *Bspt*I، ۱۰ میکرولیتر از بافر و ۲۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند و نمونه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. نتایج هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز یک درصد تایید و مخلوط هضم آنزیمی برای تغلیظ شدن در انکوباتور ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و حجم نهایی از ۱۰۰ میکرولیتر به ۳۰ میکرولیتر کاهش یافت. در مرحله بعد پلاسمید خطی شده برای جلوگیری از جرقه زدن در

[1] Syringaldazine

Archive of SID
www.SID.ir

حین الکتروپوریشن با استفاده از کیت شرکت ویوانتیس خالص شد. جهت تهیه سلول‌های مستعد مخمر برای انجام تراریزش، نیاز به تهیه کشت مخمر از سویه مورد نظر می باشد. در این راستا از سویه شماره ۴ مخمر پیش کشت تهیه شد به این ترتیب که ۱۰ میلی‌لیتر، محیط YPD مایع حاوی آمپی سیلین درون ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و توسط لوپ تک کلونی از کشت خطی سویه مخمر (که از قبل کشت داده شده بود)، برداشته و در ارلن حاوی محیط YPD کشت شد. سپس ارلن‌ها درون انکوباتور شیکردار با دور ۲۷۵ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، بعد از حدود ۲۴-۲۰ ساعت با در نظر گرفتن OD حاصله، نمونه‌ها تا رسیدن به OD =۰/۲ رقیق شدند. سپس ارلن های جدید درون انکوباتور با شرایط قبلی قرار داده شدند تا OD آنها به ۱/۳ تا ۱/۵ برسد (تقریبا حدود ۱۴-۹ ساعت طول می‌کشد).

پس از رسیدن OD محیط کشت پیکیا به حد مورد نیاز، سلول‌های مستعد مخمر جهت تراریختی تهیه شد و سپس الکتروپوریشن (برای الکتروپوریشن از دستگاه شرکت Bio-Rad استفاده شد) با استفاده از روش زیر انجام شد:

الف- پلاسمید خطی و خالص شده با سلول‌های مستعد مخلوط شده و ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت (۲۰ میکرولیتر از ناقل بر روی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد ریخته شد)

ب- مخلوط فوق در کووت‌های سرد ریخته شد و سپس کووت به طور کامل خشک شد.

ج- الکتروپوریشن با ولتاژ ۱۷۶۰ ولت و زمان ۴/۶ میلی ثانیه انجام شد.

د- یک میلی‌لیتر سوربیتول سرد به کووت اضافه شد و بعد از مخلوط کردن، محلول به داخل فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد.

ه- فالکون به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد.

و- یک میلی لیتر از محیط YPD (باید فاقد آمپی سیلین باشد) به فالکون اضافه شد و به مدت یک ساعت در شیکر-انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد.

ز- سانتریفیوژ در $4500\times g$ به مدت زمان ۵ دقیقه انجام شد و سپس ۱۷۰۰ میکرولیتر از محلول رویی دور ریخته شد و رسوب در ۳۰۰ میکرولیتر باقی‌مانده از محلول حل شد.

ح- محلول به پلیت انتخابی PAD انتقال و به مدت ۸-۳ روز در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

در کیت پودر آماده محیط PAD موجود می‌باشد که پودر در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب حل شد و محیط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و پس از اتمام اتوکلاو و سرد شدن محیط (زمانی که دما حدود ۵۰-۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید)، ۱۰۰ میلی‌لیتر دکستروز یا گلوکز ۱۰X و حدود ۵۰۰ میکرولیتر آمپی سیلین به محیط اضافه شد و در زیر هود استریل حدود ۱۵ میلی لیتر از محیط درون هر پلیت ریخته شد.

راه کارهای بیان پروتئین

در ادامه با توجه به دستورالعمل شرکت اینویتروژن به منظور بیان ژن لاکاز، کلونی‌های تایید شده در محیط BMGY (محیط حاوی گلیسرول) در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۳۰۰ رشد داده شدند. بعد از گذشت دو تا سه روز و رشد سلول‌ها، آن‌ها به محیط BMMY (محیط حاوی متانول ۵ درصد) منتقل شدند و ارلن‌ها دوباره با همان درجه حرارت و دور به شیکر انکوباتور برگردانده شدند و به مدت پنج روز هر ۲۴ ساعت به هر ارلن ۰/۵ درصد حجمی متانول اضافه شد (متانول القاء کننده پروموتر AOX1 است). در نهایت بعد از گذشت پنج روز محیط BMMY به مدت ۱۰ دقیقه با $3000\times g$ رسوب داده شد و سوپرناتانت‌های به دست آمده بر روی ژل پلی آکریل آمید برده شدند.

سنجش فعالیت آنزیمی

فعالیت آنزیمی لاکاز با استفاده از روش طیف سنجی و در درجه حرارت اتاق با سوبسترای سرین گالدازین مورد سنجش قرار گرفت. در مخلوط سنجش آنزیمی، اکسیداسیون سوبسترای سرین گالدازین (غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار و قابل حل در متانول مطلق) در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH = ۷ به وسیله میزان افزایش در جذب ۵۲۵ نانومتر نشان داده شد. مقادیر مورد استفاده در سنجش فعالیت آنزیمی در جدول یک آورده شده‌است.

Archive of SID

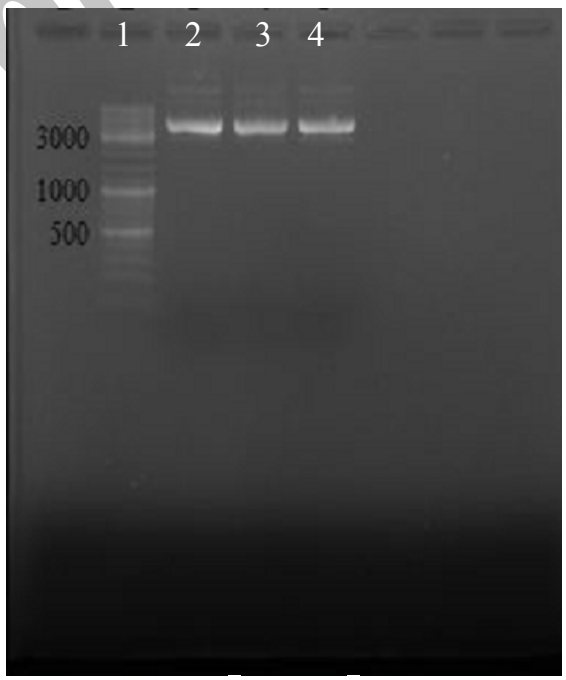
www.SID.ir

جدول۱- مواد لازم جهت آماده‌سازی محلول سنجش فعالیت آنزیمی با سوبسترای سرین گالدازین

ردیف	ماده مورد استفاده	نمونه شاهد	نمونه تست
۱	آب دیونیزه	۵۰۰ µl	-
۲	بافر	۲/۲ ml	۲/۲ ml
۳	محلول آنزیمی	-	۵۰۰ µl
۴	سرین گالدازین	۳۰۰ µl	۳۰۰ µl

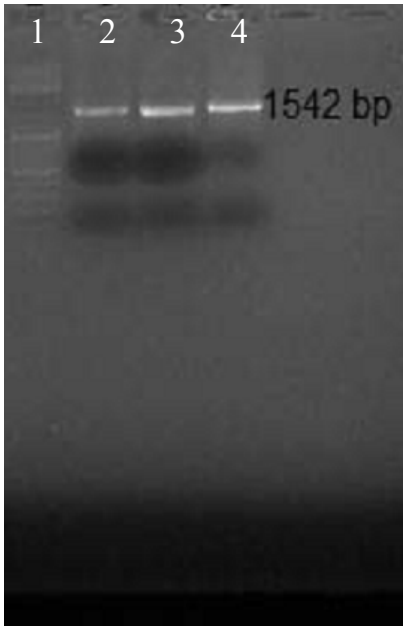
نتایج و بحث

پلاسمید PUC-LCC بعد از تکثیر در میزبان باکتریایی با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Kpn*I مورد هضم آنزیمی و همچنین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در واکنش PCR مورد تکثیر قرار گرفت. از باکتری‌های تراریخت شده استخراج پلاسمید انجام شد و برای تعیین کیفیت پلاسمیدها، دو میکرو لیتر از نمونه استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد برده شد (شکل۱).



شکل۱- استخراج پلاسمید PUC-LCC از باکتری‌های تراریخت شده. چاهک۱) GenRuler#SM0331 DNA Ladder Mix، چاهک ۲، ۳ و ۴) پلاسمیدPUC-LCC.

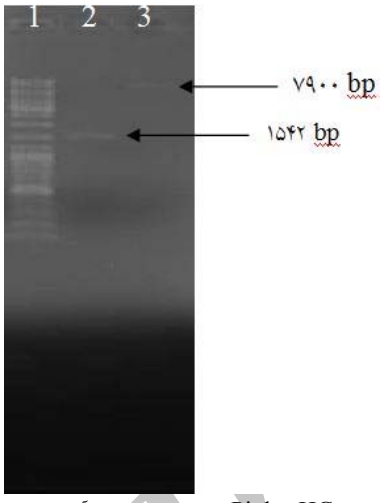
تایید حضور ژن لاکاز در پلاسمیدهای PUC-LCC توسط PCR بر روی پلاسمیدهای استخراج شده PUC-LCC جهت تایید حضور ژن آنزیم لاکاز، PCR انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد برده شد که حضور قطعه ۱۵۴۲ جفت بازی تایید کننده حضور ژن آنزیم لاکاز در پلاسمیدهای استخراج شده بود (شکل۲). همچنین برای کنترل مثبت از پلاسمید دیگری که حاوی ژن مورد نظر بود استفاده شد.



شکل۲- تایید حضور ژن لاکاز در پلاسمیدهای استخراج شده با استفاده از PCR بر روی پلاسمیدهای PUC-LCC؛ چاهک۱) GenRuler# SM0331 DNA Ladder Mix؛ چاهک ۲) کنترل مثبت(TA-LCC)؛ چاهک ۳ و ۴) محصول PCR.

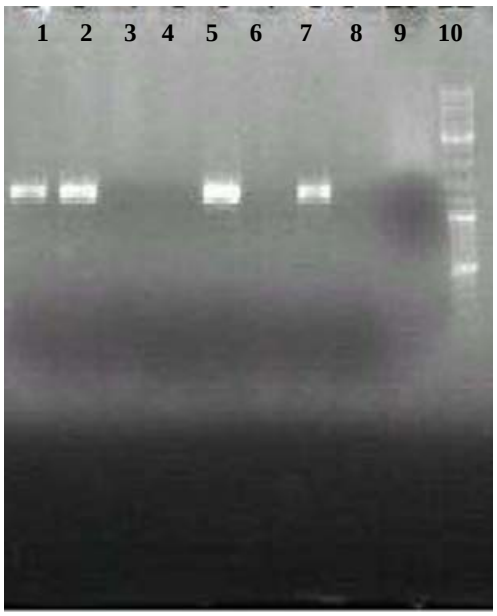
برای انتقال ژن لاکاز ابتدا هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Kpn*I بر روی پلاسمید pPinkα-HC انجام شد. این کار جهت تولید پلاسمید خطی pPinkα-HC با دو انتهای مربوط به این آنزیم‌ها انجام شد. سپس پلاسمید PUC-LCC نیز با استفاده از همین آنزیم‌ها مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و در نهایت پلاسمید بیانی و ژن لاکاز از روی ژل آگارز مورد بازیابی قرار گرفتند. برای اطمینان از اینکه DNAها در مراحل خالص‌سازی از دست نرفته باشند، محصول خالص‌سازی‌ها بر روی ژل آگارز برده شد (شکل ۳) و وجود باندهای مربوط به ژن لاکاز و پلاسمید خطی شده pPinkα-HC حاکی از صحت مرحله خالص-سازی بود.

Archive of SID
www.SID.ir



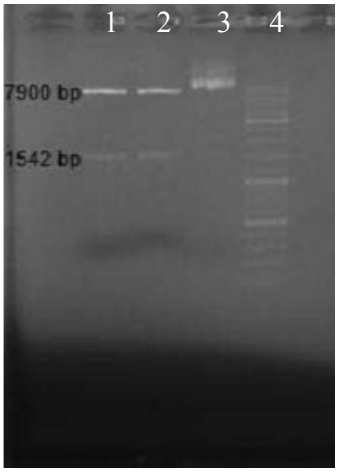
شکل۳- پلاسمید pPinkα-HC بریده شده با آنزیم‌های محدود کننده، *Xho*I و *Kpn*I و ژن لاکاز خالص‌سازی شده از روی ژل آگارز. چاهک۱) GenRuler#SM0331 DNA Ladder Mix؛ چاهک۲) ژن لاکاز بریده شده با آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Kpn*I؛ چاهک۳) پلاسمید pPinkα-HC بریده شده با آ نزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Kpn*I که از روی ژل آگارز خالص‌سازی شده است.

برای تایید حضور ژن لاکاز در پلاسمید بیانی و اطمینان از اتصال صحیح ژن در آن با استفاده از PCR از روش کلونی PCR استفاده شد. نتایج کلونی PCR بر روی ژل آگارز برده شده و در شکل ۴ نتایج آن نشان داده شد.



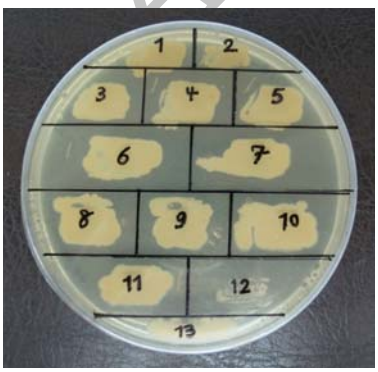
شکل۴- محصول کلونی PCR. چاهک ۱) کنترل مثبت (پلاسمید pPinkα-HC-PUC)؛ چاهک ۲ الی ۸) نمونه‌های کلون‌ها؛ چاهک ۹) کنترل منفی (فاقد نمونه DNA)؛ چاهک ۱۰) GenRuler#SM0331 DNA Ladder Mix.

برای کنترل نهایی هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Kpn*I بر روی پلاسمیدهای pPinkα-HC-LCC انجام شد و محصول بر روی ژل آگارز یک درصد برده شد و اندازه باندها حضور ژن لاکاز را تایید کرد (شکل ۵)



شکل۵- هضم آنزیمی پلاسمید pPinkα-HC-LCC با آنزیم‌های محدود کننده *Xho*I و *Kpn*I؛ چاهک ۱ و ۲) هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم‌های برشی؛ چاهک ۳) پلاسمید هضم نشده؛ چاهک ۴) GenRuler#SM0331 DNA Ladder Mix.

از آنجا که پلاسمیدهای pPinkα-HC-LCC از طریق نوترکیبی هومولوگ وارد ژنوم مخمر خواهند شد، ابتدا پلاسمیدها با آنزیم محدود کننده *BspT*I خطی شدند و سپس با استفاده از روش الکتروپوریشن پلاسمید pPinkα-HC-LCC به داخل مخمر پیکیا پاستوریس انتقال یافت. مخمرهای تراریخت شده بر روی محیط انتخابی PAD برده شدند و ۳ تا ۵ روز بعد از کلونی‌های بدست آمده پلیت Master بر روی همین محیط‌های انتخابی حاوی آمپی سیلین تهیه شد (شکل۶).

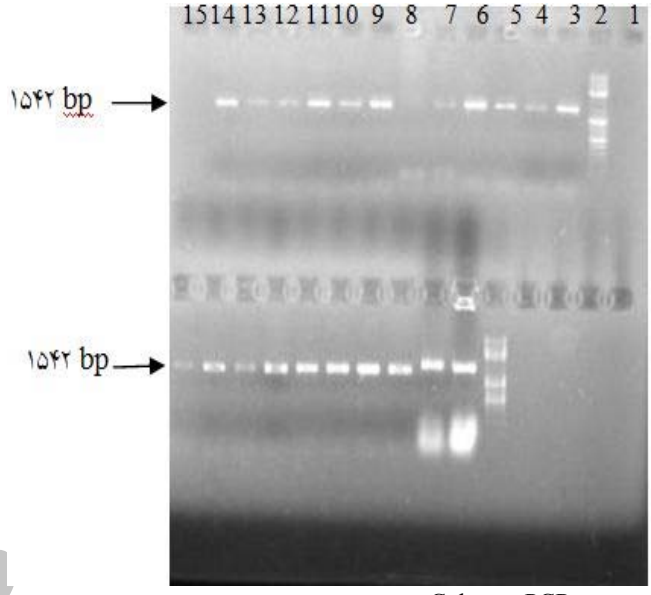


شکل۶- یکی از پلیت‌های Master تهیه شده از مخمرهای تراریخت شده پیکیا پاستوریس در محیط انتخابی PAD+ampicilin.

Archive of SID

www.SID.ir

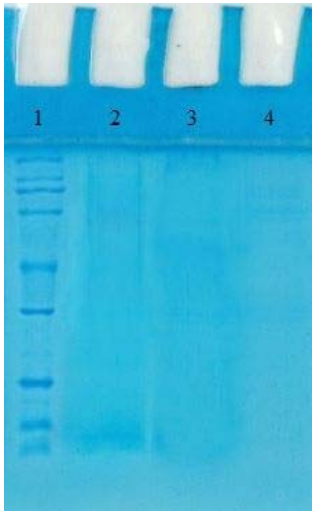
برای تایید حضور ژن لاکاز در کلونی‌های مخمر نوترکیب، از کلونی‌های رشد کرده بر روی پلیت Master استفاده شد و به صورت مستقیم، Colony –PCR انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد برده شد و با رویت باند مربوط به ژن لاکاز حضور ژن در مخمرها تایید شد (شکل ۷).



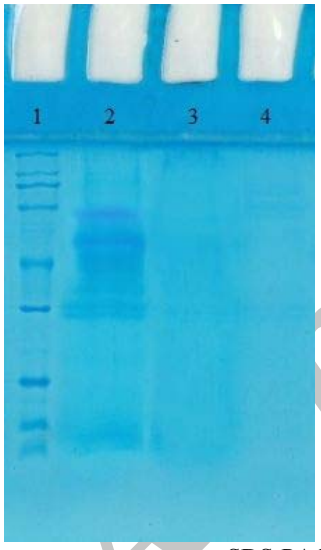
شکل۷- Colony –PCR بر روی کلونی های پیکیا پاستوریس نوترکیب. ازبالا و راست. چاهک۱) کنترل منفی (فاقد نمونه DNA)؛ چاهک۲) GenRuler#SM0331 DNA Ladder Mix؛ چاهک۳) کنترل مثبت (پلاسمید PUC-LCC)؛ چاهک ۴ الی ۱۵ و چاهک‌های پایینی) محصولات Colony –PCR.

نتایج سنجش فعالیت آنزیمی همراه با سوپرناتانت‌ها و محلول حاصل از شکست دیواره مخمر پیکیا پاستوریس و سوبسترای سرین گالدازین حاکی از عدم وجود فعالیت آنزیمی داشت. از همین رو در مرحله بعد محلول‌های بدست آمده به وسیله ژل پلی آکریل آمید تجزیه شد و باند مربوط به پروتئین لاکاز مشاهده نشد (شکل ۸ و ۹).

سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبسترای سرین گالدازین، سوپرناتانت‌های بدست آمده و محلول‌های حاصل از شکست دیواره مخمر پیکیا انجام شد. منحنی فعالیت آنزیمی حاصل از روش طیف سنجی حاکی از عدم وجود فعالیت آنزیمی در هر سه دما بود. نتایج به دست آمده از تجزیه ژل پلی‌آکریل آمید نشان داد



شکل۸- ژل SDS-PAGE از سوپرناتانت‌های محیط بیانی با غلظت یک میلی مولار از سولفات مس. چاهک ۱) مارکر پروتئینی؛ چاهک۲) سوپرناتانت محیط بیانی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، چاهک ۳) سوپرناتانت محیط بیانی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و چاهک ۴) سوپرناتانت محیط بیانی ۳۰ درجه‌سانتی گراد.



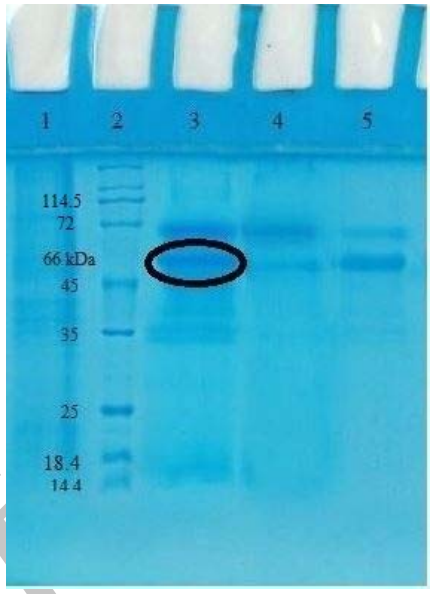
شکل۹- ژل SDS-PAGE از سوپرناتانت‌های محیط بیانی با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار از سولفات مس؛ چاهک ۱) مارکر پروتئینی؛ چاهک ۲) سوپرناتانت محیط بیانی ۲۰ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۳) سوپرناتانت محیط بیانی ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۴) سوپرناتانت محیط بیانی ۳۰ درجه سانتی‌گراد.

که نمونه بیان شده در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد باند مربوط به پروتئین لاکاز را نشان می‌دهد (شکل ۱۰).

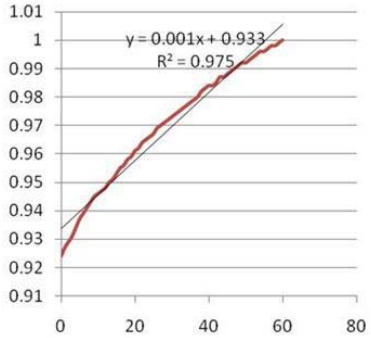
سوپرناتانت حاصل با استفاده از دستگاه تغلیظ کننده، به میزان نصف حجم اولیه تغلیظ شدند و سپس با استفاده از کیت شرکت اینویتروژن مورد آزمایش تاخوردگی مجدد قرار گرفتند. در نهایت

www.SID.ir

سوسپانسیون حاصل از فرآیند تاخوردگی مجدد و تغلیظ با استفاده از سویسترای سرین گالدازین مورد سنجش فعالیت آنزیمی قرار گرفت و نتایج بدست آمده نشان‌دهنده برگشت فعالیت آنزیمی داشت (شکل ۱۱).



شکل۱۰- ژل SDS-PAGE از سوپرناتانت‌های محیط بیانی با غلظت دو میلی‌مولار از سولفات مس؛ چاهک۱) پروتئین‌های ترشحی پیکیا پاستوریس پذیرنده وکتور خالی pPink (کنترل منفی)؛ چاهک ۲) مارکر پروتئینی؛ چاهک ۳) سوپرناتانت محیط بیانی ۲۰ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۴) سوپرناتانت محیط بیانی ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ چاهک ۵) سوپرناتانت محیط بیانی ۳۰ درجه سانتی‌گراد.



شکل۱۱- سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبسترای سرین گالدازین و روش طیف سنجی) شیب خط حاصل از میزان جذب در طول ۶۰ ثانیه همراه با سوبسترای سرین گالدازین.

سوپرناتانت‌های بدست آمده از محیط کشت ۳۰ درجه سانتی‌گراد در مخمر پیکیا پاستوریس از نظر فعالیت آنزیمی مورد سنجش قرار گرفتند و نتایج نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت آنزیمی داشت. این موضوع می‌تواند به دلایل زیر باشد:

الف) میزان پروتئین ترشح شده کم بوده و بنابراین به سختی قابل شناسایی است؛ ب) پروتئین قادر به ترشح نیست و در سلول باقی می‌ماند؛ ج) پروتئین ترشح شده ناپایدار بوده و تحت‌تاثیر پروتئازها تخریب می‌شود؛ د) مرحله ترشح پروتئین نسبت به درجه حرارت حساس می‌باشد؛ ه) حساسیت نسبت به غلظت متانول (به دلیل تاثیر بر روی پایداری و تاخوردگی صحیح پروتئین)؛ و) عدم تاخوردگی صحیح پروتئین.

Feng Hong et al. (2002) سه راهکار را برای افزایش تولید پروتئین و همچنین افزایش فعالیت آنزیمی لاکاز در مخمر پیکیا پاستوریس گزارش کردند بدین ترتیب که در راهکار اول دمای بیان ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت متانول یک درصد در نظر گرفته شد، در راهکار دوم دمای بیان ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت متانول یک درصد و نهایتا در راهکار سوم دمای بیان ۲۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت متانول ۰/۵ درصد در نظر گرفته شد. در نهایت راهکار سوم بهترین نتیجه را از نظر میزان پروتئین قابل حل و فعالیت ویژه آنزیم داشت. نتایج نشان داد که آنزیم در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه برای رشد پیکیا پاستوریس است، تا حد زیادی فعالیت خود را از دست می‌دهد. در این تحقیق نیز برای بهبود فعالیت آنزیمی و بهبود تولید پروتئین لاکاز در مخمر پیکیا پاستوریس راهکارهای زیر انجام شد:

الف) سوپرناتانت های بدست آمده قبل از سنجش فعالیت آنزیمی تغلیظ شدند.

ب) برای کسب اطمینان از اینکه پروتئین در داخل سلول به دام نیفتاده باشد، دیواره مخمر شکسته شده و کل پروتئین آن بررسی شد.

ج) بیان در حضور مخلوطی از مهارکننده‌های پروتئازها مانند PMSF تکرار شد.

د) بیان در دماهای پایین تکرار شد.

ه) بهترین غلظت از سولفات مس برای بدست آوردن بیشترین فعالیت دو میلی‌مولار در نظر گرفته شد.

و) تاخوردگی مجدد سوپرناتانت‌های بدست آمده انجام شد.

ز) دیالیز سوپرناتانت نیز انجام شد.

Archive of SID

A.I. Ruiz et al. (2000) نشان دادند که پیش تیمار سوپرناتانت با دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش فعالیت آنزیمی می شود. در این تحقیق این راهکار نیز باعث احیای فعالیت آنزیمی لاکاز نشد.

امروزه از میکروارگانیسم‌های مختلفی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها برای تولید آنزیم‌ها استفاده می‌شود. به طور سنتی، برای بیان پروتئین‌های فاقد گلیکوزیلاسیون از *E. coli* استفاده می‌کنند، اما برای تولید پروتئین‌های دارای گلیکوزیلاسیون از سیستم‌های باکتریایی نمی‌توان استفاده کرد. قارچ‌ها نیز رشد نسبتا کندی دارند. امروزه مخمر به عنوان یک سیستم بیانی بسیار مناسب و مقرون به صرفه مورد توجه محققان قرار گرفته است. مخمر پیکیا پاستوریس یک سیستم موفق برای بیان ژن‌های هترولوگ به شمار می‌آیند. این موفقیت مرهون وجود چند عامل است. یکی وجود پروموتورهای قوی و قابل تنظیم است که به گونه‌ای منحصر به فرد برای کنترل بیان ژن‌های خارجی مناسب به شمار می‌آید. سادگی تکنیک و کار کردن با این مخمر نسبت به مخمرهایی مانند ساکارومایسس سرویزیه نیز از دلایل توجه به آنهاست. آمادگی بالای این مخمرها به رشد در محیط هوازی، کشت و بازدهی تولید پروتئین در آنها را به گونه چشمگیری افزایش داده است. عوامل تاثیر گذار بر روی تولید پروتئین نوترکیب لاکاز در مخمر پیکیا به شرح ذیل هستند:

الف) مشکل عدم تاخوردگی صحیح پروتئین لاکاز در میزبان باکتریایی. بسیاری از پروتئین‌ها بعد از خالص‌سازی در محیط آزمایشگاهی به صورت خود به خودی تا می‌خورند و ساختار سه بعدی پروتئین را تشکیل می‌دهند. شکل‌گیری ساختار سه بعدی پروتئین تا حد زیادی تحت‌تاثیر عوامل محیطی است. در شرایط آزمایشگاهی، گاهی اوقات به علت کم محلول بودن زنجیره‌های پلی‌پپتیدی غیر طبیعی و احیا شده، تشکیل پیوند دی سولفیدی مشکل می‌شود و به نظر می‌رسد که این امر در پروکاریوت‌ها و میزبان‌های پروکاریوتی با فراوانی بیشتری اتفاق می‌افتد. انتخاب ژن‌های مورد نیاز، وارد کردن آنها در میزبان‌های معین، بدست آوردن و تخلیص محصول ژنی، در صورتی که کارایی لازم را داشته باشد (پروتئین به صورت صحیح تا خورده باشد) از جمله مراحلی است که هر یک در مقیاس صنعتی جزئیات کاری بیشتری داشته و متعاقب آن مشکلات زیادی را هم پیش روی دارد. با انتخاب مخمر پیکیا پاستوریس و با توجه به متفاوت بودن مولکول‌های چاپرون درگیر در تاخوردگی پروتئین‌ها و تغییرات بعد از ترجمه و همچنین این موضوع که پروتئین‌های نوترکیب تولید شده در مخمر پیکیا پاستوریس عمدتا از نوع ترشحی خواهند بود انتظار می‌رفت که مشکل عدم تاخوردگی صحیح پروتئین لاکاز در میزبان باکتریایی، در میزبان مخمر حل شود. به نظر می‌رسد که اگر پروتئین در سیتوزول به صورت نامناسبی تاخورده باشد، تا حد زیادی توانایی عبور از غشا را از دست خواهد داد. البته کارایی مولکول‌های چاپرون در چنین زمانی بسیار تعیین‌کننده خواهد بود چرا که یک پروتئین برای اینکه بتواند از غشا عبور کند، باید به شکل تانخورده نگه داشته شود و سپس در سمت دیگر غشا برای انجام فعالیت زیستی خود به صورت مناسبی تا بخورد و این مهم به وسیله‌ی مولکول‌های چاپرون انجام می‌شود؛

ب) بررسی تاثیرات تغییرات بعد از ترجمه بر روی تولید پروتئین لاکاز در مخمر پیکیا پاستوریس. یکی از مهمترین تغییرات بعد از ترجمه که بررسی اثرات آن بر روی تولید آنزیم لاکاز در مخمر پیکیا پاستوریس مطرح بود، گلیکوزیلاسیون از نوع N بود. نتایج حاصل از ژل SDS-PAGE نشان داد که گلیکوزیلاسیون چندان زیادی بر روی پروتئین لاکاز انجام نشده است؛

ج) بررسی غلظت‌های مختلف سولفات مس بر روی تولید پروتئین لاکاز. در بعضی موارد، پیوند یون فلزی به پروتئین موجب تقویت پایداری ساختاری آن می شود و یا به عنوان کوفاکتور در تولید آنزیم فعال نقش ایفا می‌کند. حضور یون مس در ساختار آنزیم لاکاز و نقش آن در تنظیم فعالیت آنزیم، این یون را به عنوان یک کوفاکتور حیاتی برای آنزیم لاکاز مطرح می‌کند. نحوه اثر یون مس بر روی آنزیم لاکاز هنوز به صورت جزیی مورد مطالعه قرار نگرفته است اما این موضوع به اثبات رسیده است که زمان اضافه کردن سولفات مس و غلظت آن در رسیدن به سطوح بالای لاکاز فعال بسیار مهم و تعیین کننده است. در مخمر پیکیا پاستوریس و هانسنولا پلی مرفا، سولفات مس در غلظت دو میلی‌مولار و در محیط بیانی(قبل از شروع فاز ساکن) اضافه شد؛

Archive of SID
www.SID.ir

د) بررسی اثرات درجه حرارت محیط بیانی بر روی تولید آنزیم لاکاز. Feng Hong et al. (2002) در تحقیقی نشان دادند که فعالیت آنزیم لاکاز به خصوص فعالیت ویژه آن می‌تواند بوسیله کاهش دمای محیط بیان بهبود پیدا کند. مکانیسم‌هایی که منجر به اثرات درجه حرارت بر روی فعالیت آنزیم لاکاز می‌شود، می‌تواند به عواملی مانند کاهش پایداری، آزادسازی بیشتر پروتئازها از سلول‌های مرده و مشکلات تاخوردگی، همگی در درجه حرارت-های بالا نسبت داده شود.

Leif Johnson et al. (1997) ژن لاکاز را از قارچ *Trametes versicolor* با استفاده از روش RT-PCR جدا کردند و در مخمر پیکیا پاستوریس بیان کردند. استفاده از محیط کشت با pH 6 و کنترل pH در طول مدت زمان کشت برای بدست آورن فعالیت ضروری تشخیص داده شد. در این تحقیق نیز سنجش فعالیت آنزیمی در pH های مختلف انجام شد. Liu W et al. (2003) نیز بعد از کلون کردن و تعیین خصوصیات آنزیمی لاکاز از میزبان قارچ Lignosus، آن را در پیکیا پاستوریس بیان کردند. حضور مس در غلظت ۰/۴ میلی‌مولار برای بدست آمدن فعالیت بهینه به اثبات رسید و بیشترین فعالیت هم به میزان در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد حاصل شد.

منابع

Dalfard A, Khajeh K, Soudi M, Naderi-Manesh H, Ranjbar B, Sajedi R (2006) Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. Enzyme and Microbial Technology 39: 1409-1416.

Gianfreda L, Xu F, Bollag J (1999) Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal J 3: 1-26.

Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T (1998) Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). Applied and Environment Microbiology 64: 1601-1606.

Hong F, Meinander N, Jönsson L (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 79: 438-449.

Kunamneni A, Ballesteros A, Plou F, Alcalde M (2007) Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology 1: 233-245.

Leontievsky A, Myasoedova N, Baskunov B, Evans C, Golovleva L (2000) Transformation of 2, 4, 6-trichlorophenol by the white rot fungi Panus tigrinus and Coriolus versicolor. Biodegradation 11: 331-340.

Levine D, Cooney C (1973) Isolation and characterization of a thermotolerant methanol-utilizing yeast. Applied Microbiology and Biotechnology 26: 982-990.

Liu W, Chao Y, Liu S, Bao H, Qian S (2003) Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete Fome lignosus and expression in Pichia pastoris. Applied Microbiology and Biotechnology 63: 174-181.

Ruiz A, Malave I, Felby A, Griebnow C (2000) Improved activity and stability of an immobilized recombinant laccase in organic solvents. Biotechnology Letters 22: 229-233.

Shin K, Lee Y (2000) Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot. Archives of Biochemistry and Biophysic 384: 109-115.

Thurston C (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiological Research 140: 19-26.

Xu F (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemical Journal 35: 7608-7614.

Yaropolov, Skorobogat O, Vartanov S, Varfolomeyev S (1994) Laccases. Applied Biochemistry and Biotechnology 49: 257-280.

Archive of SID

www.SID.ir