Archive of SID

بیان هترولوگ آنزیم کیتیناز ۳۶ کیلو دالتونی از قارچ *Trichoderma atroviride* در میزبان پروکاریوتی

مهسا یزدان‌پناه سامانی، محمد رضا زمانی*، مصطفی مطلبی و زهرا مقدسی جهرمی

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۷

چکیده

آنزیمهای کیتینولیتیک در تجزیه پسماندهای کیتینی نظیر پوسته سخت‌پوستان و دیواره سلولی قارچها و تولید الیگوساکاریدها از کیتین نقش دارند. خصوصیات کاتالیتیک آنها، این آنزیمها را هدف مناسبی جهت استفاده درصنعت یا به عنوان بیوکنترل قرار داده است. در این مطالعه جهت تکثیر و همسانه‌سازی ژن *chit36* از جدایه بومی ایران *Trichoderma atroviride* PTCC5220، آغازگرهای اختصاصی (chit36pf/chi36r) طراحی و پس از تکثیر قطعه مورد نظر، به منظور تولید پری‌پلاسمی در وکتور pET26b(+) همسانه‌سازی و جهت بیان به باکتری *E. coli* BL21-DE3 انتقال داده شد. در بررسی نتایج حاصل از SDS-PAGE هیچ گونه باندی دال بر بیان پروتئین در هیچکدام از شرایط دمایی و میزان متفاوت IPTG در بخشهای متفاوت سلولی مشاهده نشد. لذا در ادامه، بیان پروتئین Chit36 با حذف پپتید نشانه pelB (جهت تولید به صورت سیتوپلاسمی) همراه با توالی هیستیدین در انتهای کربوکسیلی دردستور کار قرارگرفت. باکتری حاوی سازه نوترکیب تحت شرایط القایی متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. علیرغم عدم مشاهده هیچ گونه باندی در هیچکدام از شرایط القایی با روش SDS-PAGE، بیان اندک پروتئین در ۲ کلنی با استفاده از روش Western blot مورد تأیید قرار گرفت. به منظور بهینه سازی شرایط بیان، میزان بیان پروتئین نوترکیب نسبت به پروتئین تام باکتری درشرایط متفاوت القایی، به روش سنجش کمی باند های پروتئینی روی ژل SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که بهترین شرایط بیان در زمان القاء 0.3 : OD_{600} و میزان IPTG یک میلی‌مولار و زمان انکوباسیون ۶ ساعت می‌باشد، دراین شرایط میزان بیان پروتئین نوترکیب نسبت به پروتئین تام برابر ۴۵/۵۷ درصد می‌باشد.

واژه های کلیدی : *Trichoderma* . بیان هترولوگ . آنزیم Chit36

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۹۶، پست الکترونیکی: zamani@nigeb.ac.ir

مقدمه

کیتین، پلیمر خطی نامحلول از زیرواحدهای N-βacetylglucosamine(1®4)، یکی از غالب‌ترین پلی‌ساکاریدها در طبیعت می‌باشد و در بیشتر قارچهای بیماریزا به عنوان یک پلیمر ساختاری عمل می‌کند (۱۷ و ۳۳).

آنزیمهای کیتینازی در تولید منو و الیگوساکاریدها از کیتین نقش دارند. این آنزیمها در گستره وسیعی از موجودات شامل باکتریها، قارچها، گیاهان عالی، حشرات، سخت‌پوستان و برخی از مهره‌داران دیده شده‌اند(۳۲). همچنین گزارش شده است که برخی گونه‌های تریکودرما در حضور کیتین یا دیواره سلولی جدا شده از قارچها قادر به تولید کیتیناز می‌باشند (۱۵، ۲۷).

اندوکیتینازها کاربردهای گسترده‌ای در زمینه‌های کشاورزی، دارو، تصفیه آب و صنایع آرایشی و بهداشتی دارند (۱۶). خصوصیات کاتالیتیک ایده‌آل کیتینازها جهت استفاده درصنعت یا به عنوان بیوکنترل منجر به مطالعات بیشتر بر روی این پروتئینها شده است(۳). اندوکیتینازهای تخلیص شده از گونه‌های تریکودرما نه تنها قادر به تجزیه

www.SID.ir

Archive of SID

ساختار نرم نوک هیفها می‌باشند، بلکه می‌توانند دیواره کیتینی محکم هیفهای بالغ، کونیدیا واسکلروتیا را نیز تجزیه کنند(۲۲)، لذا در سیستم بیوکنترل این مایکوپارازیت‌ها، به عنوان یک آنزیم کلیدی محسوب می‌شوند. بنابراین ژنهای کیتینازی این قارچهای مایکوپارازیت، نظیر تریکودرما، به عنوان منبعی برای تولید صنعتی آنزیمهای کیتیناز توجه زیادی را به خود معطوف داشته است (۳). این قارچهای مفید از مقاوم‌ترین میکروبها به مواد شیمیایی طبیعی و سنتزی و سمها می‌باشند و می‌توانند برخی از این مواد را تجزیه کنند، با توجه به محدودیتهای اکوسیستمی جهت رشد این میکروارگانیسم‌ها از یک طرف (۹) و میزان اندک آنزیم کیتیناز تولید شده به صورت طبیعی توسط آنها، لذا استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب می‌تواند روش مناسبی برای افزایش میزان تولید این آنزیمها در مقیاس صنعتی باشد.

آنزیمهای کیتیناز بر اساس تشابه در توالی آمینواسیدی به پنج گروه تقسیم‌بندی می‌شوند و این پنج گروه بر اساس ساختار دومین کاتالیتیک کیتینازی در خانواده‌های ۱۸ و ۱۹ گلیکوزید هیدرولازها دسته‌بندی می‌شوند. لازم به ذکر است که کیتینازهای قارچی در خانواده ۱۸ این گروه قرار دارند(۳۱)، اما اطلاعات در مورد بیان هترولوگ اندوکیتینازهای قارچی مخصوصاً Chit36 بسیار اندک می‌باشد. لذا در این مطالعه با استفاده از ژن *chit36* همسانه سازی شده از جدایه بومی ایران به نام *Trichoderma atroviride* اقدام به بیان و بهینه سازی شرایط بیان این پروتئین نوترکیب در میزبان *E. coli* شد.

مواد و روشها

روش استخراج DNA : به منظور استخراج DNA ژنومی قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ *Trichoderma atroviride* PTCC(5220) به صورت معکوس بر روی محیط کشت MY(Malt extract 2% , Yeast extract 0.2%) قرارداده شد و پس از رشد قارچ، میسلیومها جمع‌آوری و توسط ازت مایع به صورت پودر درآمده و استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام شد (۱۴). DNA به دست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در ۲۰- درجه سانتی گراد برای استفاده بعدی نگهداری گردید.

سویه‌های باکتریایی و پلاسمیدها: سویه *E. coli* DH5α از شرکت فرمنتاز خریداری و به منظور تهیه سلولهای مستعد، سپس نگهداری پلاسمیدها در آن مورد استفاده قرار گرفت. برای بیان در سیستم پروکاریوتی نیز از سویه *E. coli*strain BL21(DE3) استفاده شد. جهت رشد این باکتریها از محیط Luria Bertani استفاده شد. پلاسمید pET-26b(+) به منظور بیان در سیستم پروکاریوتی از شرکت Novagen تهیه شد.

آنزیمهای DNA پلیمرازی *Taq* و *Pfu*، آنزیمهای محدودالاثر *Nco*I، *Eco31*I، *Eco*RI، *Nde*I، *Xho*I، آنزیم DNA لیگاز T4 مارکر DNA و مارکر پروتئین از شرکت فرمنتاز تهیه شدند.

مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک و کیت تخلیص محصول PCR از ژل، آنتی بادی منوکلونال Anti His-tag peroxidase و سوبسترای آن (POD(BM (Chemiluminescence Blotting Substrate) از شرکت Roche خریداری شد.

آغازگرهای مورد استفاده: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به شرح جدول ۱ می‌باشد.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک: بررسی مشابهت توالی ژن *chit36* با اطلاعات موجود در بانک ژنی توسط برنامه نرم‌افزاری Blast انجام شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای ژن *chit36* با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی توسط برنامه نرم‌افزاری CLUSTAL W انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورداستفاده دراین تحقیق

نام آغازگر	توالی
Chit36pf	5′-GGGTCTCGCATGACACGCCTTCTTGAC-3′
Chi36r	5′-CGAATTCTAACCAATGCGAGTAAGCA-3′
Chit36Hf	5′-GCGCATATGACACGCCTTCTTGACG-3′
Chit36Hr	5′-GCGCTCGAGCTCACCAATGCGAGTAAGCA-3′

تهیه پلاسمید نوترکیب: به منظور همسانه سازی ژن *chit36*، واکنش PCR اختصاصی با استفاده از پرایمرهای / Chit36pf Chi36r انجام شد. تخلیص محصول *Pfu*-PCR با استفاده از کیت PCR product purification Kit(Roche) انجام گرفت. DNA خالص شده و وکتور pET26b (+) پس از هضم آنزیمی و انجام واکنش اتصال، به سلولهای تازه تهیه شده باکتری *E. coli* DH5α منتقل گردید.

انتخاب کلنیهای نوترکیب با استفاده از با تکنیک PCR based RFLP(PBR): کلنیهای حاصل در 20 µl آب مقطر حل گردید و پس از ۷-۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، به عنوان نمونه برای انجام واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت(۳۰).

روش استخراج پلاسمید: استخراج پلاسمید به روش Alkaline lysis صورت گرفت(۳۰) و DNA حاصله برای هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط بیان پروتئین نوترکیب Chit36: کلنیهای نوترکیب در محیط LB مایع حاوی 50µg/µlکانامایسین در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶، غلظتهای متفاوت IPTG(0.2mM,0.5mM, 0.7mM, 1mM)، در شرایط استریل اضافه شده و در شیکر انکوباتور نگهداری شدند.

پس از اتمام زمان انکوباسیون مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از هرکدام از لوله‌های کشت درون میکروتیوبهای ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به کمک سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سلولها جمع شدند. سلولهای جمع شده با sample buffer با رقت 2.5 X مخلوط و پس از جوشانیدن به مدت ۵ دقیقه، در ژل اکریل آمید دناتوره ۱۲ درصد (SDS-PAGE) الکتروفورز شد (۸). پس از الکتروفورز، ژل اکریل آمید اسکن شده و درصد پروتئین باند مورد نظر نسبت به پروتئین تام سلول مشخص گردید.

بهینه سازی شرایط بیان پروتئین نوترکیب: برای تعیین شرایط بهینه بیان، عوامل اثرگذار بر بیان پروتئین ازجمله مرحله رشد باکتری(میزان کدورت محیط کشت باکتری) در زمان القاء و میزان IPTG در زمانهای متفاوت انکوبه‌گذاری بررسی گردید، بدین منظور پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به اعداد۰/۷، ۰/۵، ۰/۳، IPTG در شرایط استریل با غلظتهای (0.2mM,0.5mM, 0.7mM, 1mM) اضافه و در شیکر انکوباتور نگهداری شدند.

روش انجام وسترن بلات: به منظور انجام روش وسترن بلات پروتئینهای الکتروفورز شده، به روش نیمه خشک از ژل اکریل آمید به غشاهایی از جنس PVDF(Polyvinylidene Fluoride) منتقل شدند و پس از مسدود کردن غشاء با محلول شیر خشک بدون چربی ۵ درصد به مدت دو ساعت، آنگاه غشاء در معرض آنتی

www.SID.ir

Archive of SID

بادی Anti His-tag peroxidase قرار گرفت. پس از مدت ۲ ساعت غشاء با بافر شستشو (PBS 1X,TWEEN20 0.05%) شسته و به مقدار ۲-۳ میلی‌لیتر سوبسترا (POD) به آن اضافه شد و پس از ظهور رنگ، غشاء با آب شسته و بین کاغذ صافی خشک و در جای تاریک نگهداری گردید تا خشک شود (۸).

نتایج و بحث

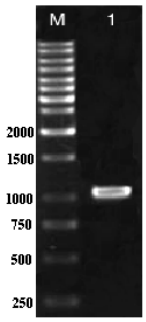
آنزیمهای کتینازی مایکوپارازیت‌ها، نسبت به انواع تولید شده در گیاه دارای مزایایی می‌باشند، ازجمله اثر بر گستره وسیعی از پاتوژنها، عدم سمیت برای گیاهان (۲۲ و ۳۴)و قدرت بالای این آنزیمها در تجزیه انواع ترکیبات کیتینی (۲، ۱۳ و ۲۲). این خصوصیات، آنزیمهای کیتیناز را به ابزار قدرتمندی جهت استفاده در کشاورزی و صنعت تبدیل نموده است.

طی مطالعات گذشته مشخص شده است که بیان آنزیمهای تجزیه کننده کیتین در میزبانهای هترولوگ ازجمله *E. coli* مانع از عملکرد آنها نمی‌شود (۴). عوامل مختلفی همچون تکثیر سریع، به صرفه بودن و بیان بالای پروتئین، *E. coli* را به میزبان مناسبی برای بیان پروتئینهای نوترکیب تبدیل کرده است (۲۶ و ۲۸).

در این مطالعه به منظور بیان آنزیم Chit36 در سیستم پروکاریوتی، این ژن از جدایه *Trichoderma atroviride* (PTCC5220)(جدایه بومی ایران) شناسایی و مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات گذشته حاکی از داشتن فعالیت کیتینازی مطلوب و نیز توانایی این جدایه در تجزیه دیواره سلولی قارچ *Rhizoctonia solani* می باشد (۱، ۲، ۱۸ و ۱۹).

جهت شناسایی وتکثیر ژن کیتیناز ۳۶ (*chit36*)، از DNA ژنومی قارچ *T. atroviride* استفاده شد. مطالعات بیوانفورماتیک درخصوص عدم وجود اینترون در ژن *chit36* و همچنین نتایج حاصل از تعیین توالی، نشان داد که این ژن فاقد اینترون می‌باشد، لذا در این تحقیق از DNA ژنومی به طور مستقیم جهت جداسازی آن استفاده شد.

با استفاده از توالیهای مربوطه در بانک ژن آغازگرهای اختصاصی (chit36pf/chi36r) برای تکثیر ژن کامل *chit36* طراحی و واکنش PCR با استفاده از آنزیم *pfu* پلیمراز انجام شد. طول قطعه مورد انتظار بر اساس اطلاعات موجود در بانک ژن ۱۰۳۵ جفت باز می‌باشد. بررسی دقیق محصول PCR، صحت انجام واکنش توسط آغازگرهای اختصاصی را نشان داد(شکل ۱).



شکل ۱- محصول PCR به دست آمده از ایزوله قارچ *T. atroviride* با استفاده از دو پرایمر Chit36pf و Chi36r، M : مارکر1kb

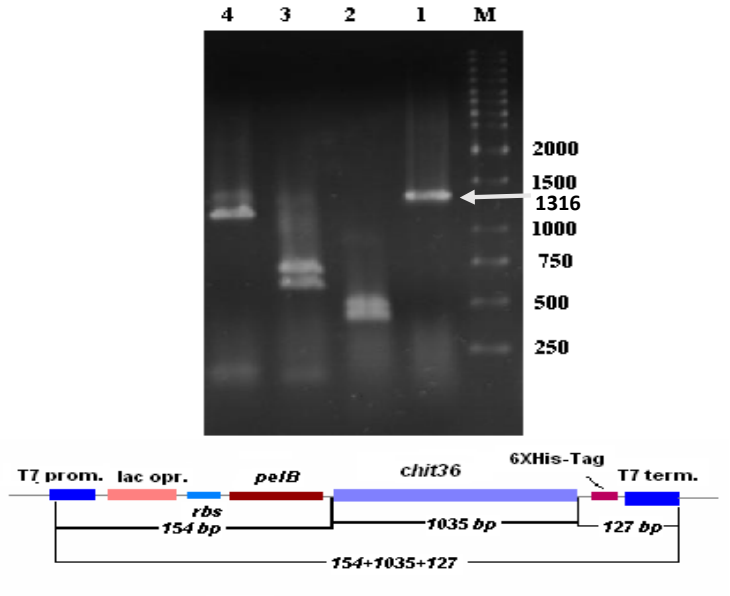
ترشح پروتئین نوترکیب به فضای پری‌پلاسمی یا محیط کشت نسبت به تولید درون سلولی دارای مزایای متعددی می‌باشد که از جمله می‌توان به تسهیل فرآیندهای پس از تولید، افزایش فعالیت بیولوژیکی، افزایش پایداری و حلالیت پروتئین تولید شده اشاره کرد(۱۲، ۲۳ و ۲۵).

لذا به منظور بیان پری پلاسمی آنزیم Chit36 در سیستم پروکاریوتی از ناقل بیانی pET-26b(+) حاوی توالی پپتید نشانه pelB استفاده شد. جهت همسانه‌سازی، پس از استخراج و تخلیص محصول PCR از ژل آگارز، مخلوط واکنش اتصال شامل DNA خالص شده و ناقل بیانی pET-26b(+) به سلولهای مستعد تازه تهیه شده باکتری *E. Coli* DH5α منتقل شد. پس از استخراج DNA از کلنیهای

www.SID.ir

Archive of SID

نوترکیب، صحت قطعه همسانه سازی شده توسط الگوی PCR و تکنیک PCR based RFLP(PBR) با آنزیمهای *Hind*III, *Hind*II و *Pvu*II تأیید شده (شکل۲) و برای تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات حاصل ازتعیین توالی، طول قطعه (۱۰۳۵جفت باز) و عدم تغییر در قالب خواندن (ORF) را تأییدکرد (داده ها نشان داده نشده است). سازه تأیید شده به نام pETMY2 نامگذاری و سپس به میزبان بیانی *E. coli* BL21-DE3 منتقل شد. صحت تکثیر ژن *chit36* در کلنیهای نوترکیب حاصل، با استفاده از الگوی PCR تأیید گردید.



شکل ۲- تأیید الگوی هضم انزیمی محصول PCRپلاسمید نوترکیبpETMY2 (پرایمرهای T7r/T7f)با استفاده از آنزیمهای *Pvu*II, *Hind*II, *Hind*III. ۱-محصول PCR پلاسمید pETMY2 با استفاده از پرایمرهای T7f/T7r، ۲- الگوی هضم آنزیمی محصول PCRپلاسمید نوترکیبpETMY2 با استفاده از آنزیم *Pvu*II (جایگاههای ۳۱۴،۳۴۰،۷۶۴)، ۳- الگوی هضم آنزیمی محصول PCRپلاسمید نوترکیب pETMY2با استفاده از آنزیم *Hind*II (جایگاه ۴۹۲)، ۴- الگوی هضم آنزیمی محصول PCRپلاسمید نوترکیبpETMY2با استفاده از آنزیم *Hind*III(جایگاه ۹۱۰)، M: مارکر1kb . شکل شماتیک قطعه تکثیر شده توسط پرایمرهای T7f/T7r (بالادست وپایین دست قطعه همسانه سازی شده در پلاسمید نوترکیب) را که شامل قسمتی از منطقه پروموتر، اپراتور lac، محل اتصال ریبوزوم، پپتید نشانه، قطعه همسانه سازی شده، 6X His tag و قسمتی از خاتمه دهنده می‌باشد را نشان می‌دهد.

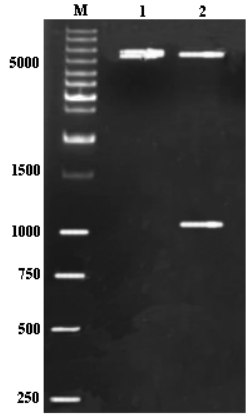
تعداد ۲۱ کلنی نوترکیب در شرایط دمایی متفاوت (۱۵،۱۸،۲۳،۲۸،۳۳و۳۷ درجه سانتی گراد) و غلظتهای متفاوتIPTG(0.2mM,0.5mM,0.7mM,1mM) مورد بررسی قرارگرفت. بررسی نتایج به دست آمده هیچ باند پروتئینی مبنی بر بیان پروتئین نوترکیب در هیچ یک از شرایط مذکور در پروتئینهای استخراجی از بخشهای مختلف سلول شامل پروتئین تام، پروتئین پری‌پلاسمی و محیط کشت نشان نداد و به دلیل عدم تأیید بیان پروتئین با روشهای حساس‌تر، تصمیم به تغییر سازه بیانی گرفته شد.

تلاش برای ترشحی کردن پروتئینهای نوترکیب علی رغم مزایای ذکر شده می‌تواند مشکلات عدیده‌ای نیز به همراه داشته باشد که مهم‌ترین آنها شامل تجزیه پروتئولایتیک (۲۱)، عدم عبور پروتئین نوترکیب از غشای داخلی و تجمع در سیتوپلاسم (۶) و عدم وجود ظرفیت کافی پریپلاسمی (۲۵ و ۲۹) می‌باشد. عوامل مختلفی در این فرآیند دخیل هستند که می‌تواند شامل طول قطعه، توالی آمینواسیدی پپتید نشانه و توالی آمینواسیدی پروتئین هدف باشد (۲۴).

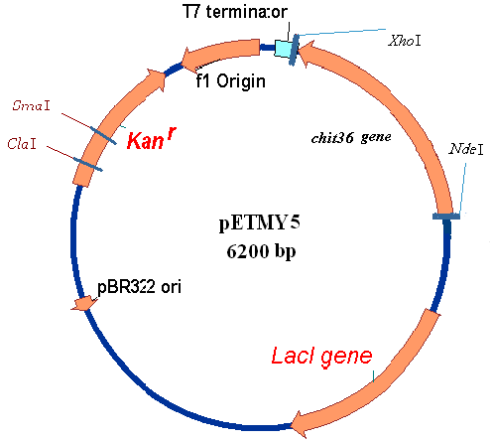
www.SID.ir

Archive of SID

لذا در ادامه، بیان پروتئین Chit36 با حذف پپتید نشانه (جهت تولید به صورت سیتوپلاسمی) همراه با توالی هیستیدین در انتهای کربوکسیلی دردستور کار قرارگرفت. بدین منظور آغازگرهای جدیدی جهت همسانه‌سازی ژن مذکور در ناقل بیانی pET-26b(+)، بدون پپتید نشانه و دارای 6xHis-tag در انتهای کربوکسیلی ژن و تبدیل توالی کدون خاتمه TAG به GAG طراحی گردید.



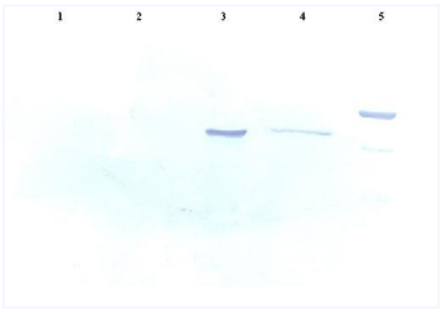
شکل ۳- تأییدالگوی هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pETMY5 حاوی ژن *chit36* ۱- هضم وکتور pET26b(+) با استفاده از آنزیمهای *NdeI/XhoI*، ۲- قطعه ۱۰۳۵bp خارج شده از پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیمهای *NdeI/XhoI*. M: مارکر1kb



شکل۴- پلاسمید pETMY5حاوی ژن *chit36*

قطعه تکثیر شده توسط آغازگرهای مذکور و آنزیم *pfu*، در ناقل بیانی pET-26b(+) همسانه سازی و به میزبان بیانی *E. coli* BL21(DE3) منتقل شد. صحت تکثیر ژن *chit36* در کلنیهای نوترکیب حاصل، با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی (*NdeI/XhoI*) تأیید شد (شکل۳). سازه جدید پس از تأیید تحت عنوان pETMY5 نامگذاری گردید(شکل۴).

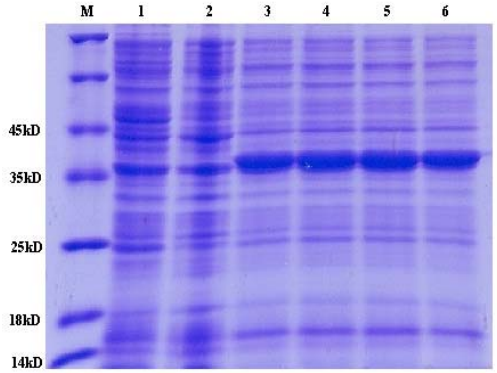
نتایج حاصل از بررسی بیان پروتئین نوترکیب در ۱۹ کلنی،پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ در دمای۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت IPTG:1mM به وسیله روش SDS-PAGE نشان داد که هیچ باند پروتئینی دال بر بیان پروتئین نوترکیب مشاهده نمی‌شود. استفاده از روش Western blot بیان اندک این پروتئین را دردو کلنی مورد مطالعه تأیید نمود(شکل۵). لذا به منظور بهینه‌سازی و افزایش بیان پروتئین نوترکیب نقش عوامل مؤثر بر تولید پروتئین نوترکیب شامل : غلظتهای متفاوت IPTG(0.2mM,0.5mM, 0.7mM, 1mM)، کدورتهای متفاوت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در زمان القاء (0.3, 0.5, 0.7) و زمانهای متفاوت انکوباسیون (۶ ساعت و ۱۶ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرارگرفت. پروتئین تام از باکتریهای القاء شده استخراج و توسط روش SDS-PAGE بررسی شد. از باکتری *E. coli* ترانسفورم شده با ناقل فاقد ژن کیتیناز به عنوان شاهد منفی استفاده شد (شکل۶).



شکل ۵- نتایجblot Westernحاصل از بیان پروتئین Chit36 در وکتور pETMY5، ۱- نمونه حاوی ناقل فاقد ژن کیتیناز، ۲- نمونه قبل از القاء، ۳ و ۴- نمونه‌های بعد از القاء (کلنیهای ۱۸ و ۱۹)، ۵- نمونه مثبت حاوی His-tag (فیوژن پروتئین GST-P21، پوشش پروتئینی 21 kDa ویروس *BNYVV* متصل شده به GST)

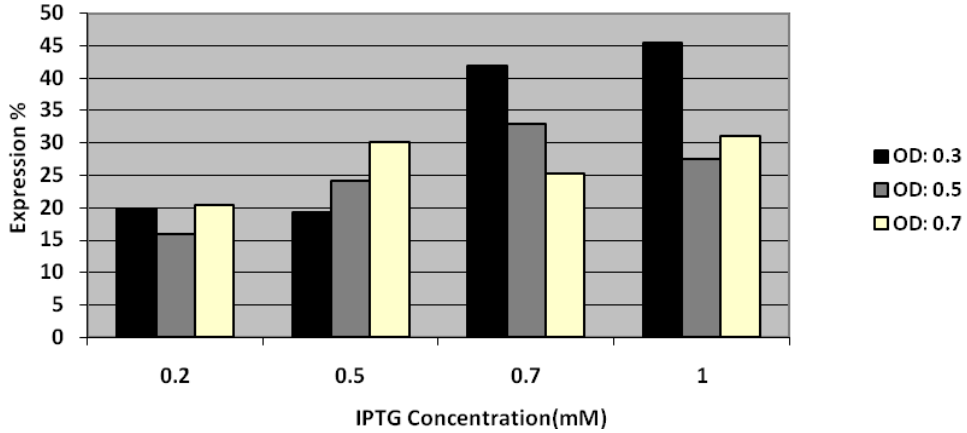
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- نتایج SDS-PAGE حاصل از بیان پروتئین Chit36 در pETMY5 و در شرایط القاء محیط کشت با OD_{600}: 0.3 و مقادیر متفاوت القاگر و در زمان ۶ ساعت پس ازالقاء. پروتئینهای استخراج شده در ژل SDS-PAGE (12% Resolving و 5% Stacking) الکتروفورز شده و با رنگ آمیزیکوماسی بلو رنگ گردیدند. M: مارکر پروتئینی، ۱-نمونه حاوی ناقل فاقد ژن کیتیناز ، ۲-نمونه قبل از القاء، ۳- نمونه القاء شده با ۰,۲ میلی‌مولار IPTG، ۴- نمونه القاء شده با ۰,۵ میلی‌مولار IPTG، ۵- نمونه القاء شده با ۰,۷ میلی‌مولار IPTG، ۶- نمونه القاء شده با ۱ میلی‌مولار IPTG

به منظور تعیین شرایط بهینه بیان پروتئین Chit36، روش سنجش کمی باندهای پروتئینی روی ژل SDS-PAGE مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور میزان بیان پروتئین نوترکیب نسبت به پروتئین تام باکتری به وسیله دستگاه Gel Scanner مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که بهترین شرایط بیان پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۳و میزان IPTG یک میلی‌مولار و زمان انکوباسیون ۶ ساعت می‌باشد. دراین شرایط بهینه میزان بیان پروتئین نوترکیب نسبت به پروتئین تام برابر ۴۵/۵۷ درصد می‌باشد (نمودار ۱). میزان بیان پس از ۶ ساعت انکوباسیون روند کاهشی طی می‌کند.



نمودار ۱- نمودار حاصل از بررسی کمی پروتئین نوترکیب با روش دنسیتومتری ۶ ساعت پس از القاء، میزان پروتئین بیان شده در شرایط بیانی متفاوت

بیان پروتئینهای کیتینازی از منابع مختلف از جمله گیاه، باکتری و قارچ در میزبانهای هترولوگ نظیر باکتری و مخمر و قارچ مورد بررسی قرار گرفته است (۴، ۵، ۷، ۱۱ و ۳۴)، به عنوان مثال بیان اندوکیتیناز قارچ *Trichoderma harzianum* (*ech42*) در *E. coli* منجر به فعالیت بالای کیتیناز شده است(۱۰). بیان کیتیناز ۴۲ (*chit42*) از قارچ *T. atroviride* PTCC(5220) در *E. coli*(۱۹) و کیتیناز ۴۲ (*chit42*) از قارچ *T. aureoviride* در *Saccharomyces cerevisiae* (۲۰) نشان داده است که همگی دارای فعالیت می‌باشند.

لذا با توجه به بیان بالای پروتئین Chit36 به میزان حدود ۵۰ درصد کل پروتئین سلول، در مطالعات آینده می توان با تخلیص این پروتئین و بررسی فعالیت آنزیمی آن، از این آنزیم به همراه فعالیت هم‌افزایی (سینرژیستی) دیگر آنزیمهای کیتینولیتیک در تجزیه پسماندهای کیتینی نظیر

www.SID.ir

Archive of SID

پوسته سخت‌پوستان و دیواره سلولی قارچها و تولید الیگوساکاریدها به طور صنعتی استفاده کرد.

منابع

۱. رضا نژاد ح.، زمانی م.ر.، مطلبی م.، حریقی م.ج.، ۱۳۸۸، کلون کردن ژن کیتیناز ۴۲ (*chit42*) از جدایه *Trichoderma atroviride* PTCC5220 و مطالعه ساختار آن، مجله زیست شناسی ایران، (1)22، ۶۱-۵۳

۲. حریقی م.ج.، مطلبی م.، زمانی م.ر.،۱۳۸۵، خالص سازی آنزیم کیتیناز ۴۲ از *Trichoderma atroviride* PTCC5220، مجله زیست شناسی ایران، (۲)۱۹،۲۱۴-۲۰۳

3. Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M., and Eijsink, V. G. (2010). Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. Mar Drugs 8, 1482-517.

4. Al-Rashed, S., Bakar, F., Said, M., Hassan, O., Rabu, A., Illias, R., and Murad, A. (2010). Expression and characterization of the recombinant*Trichodermavirens* endochitinase Cht2. Afr. J. Microbiol. Res 4, 1758-1767.

5. Andersen, M. D., Jensen, A., Robertus, J. D., Leah, R., and Skriver, K. (1997). Heterologous expression and characterization of wild-type and mutant forms of a 26 kDa endochitinase from barley (*HordeumvulgareL.*). Biochem.J. 322, 815-822.

6. Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichiacoli*. Curr Opin Biotechnol 10, 411-21.

7. Barboza-Corona, J. E., Gutierrez-Acosta, O. B., Imperial-Cervantes, M., Bideshi, D. K., de la Fuente-Salcido, N., Bautista-Justo, M., and Salcedo-Hernandez, R. (2008). Generation of antibacterial oligosaccharides derived from chitin using heterologous endochitinase synthesized in *Escherichiacoli*. J Appl Microbiol 105, 1511-20.

8. Bollag D. M., R. M. D., Edelstein S.J. (1996). Protein Methods pp. 432.

9. Brotman, Y., Kapuganti, J. G., and Viterbo, A. (2010). *Trichoderma*. Current Biology 20, R390-R391.

10. Carsolio, C., Gutierrez, A., Jimenez, B., Van Montagu, M., and Herrera-Estrella, A. (1994). Characterization of ech-42, a *Trichodermaharzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 10903-7.

11. Chernin, L. S., De la Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., and Chet, I. (1997). Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichiacoli* of a chitinase gene from Enterobacter agglomerans. Appl Environ Microbiol 63, 834-9.

12. Cornelis, P. (2000). Expressing genes in different *Escherichiacoli* compartments. Curr Opin Biotechnol 11, 450-4.

13. De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J. M., Benitez, T., Pintor-Toro, J. A., and Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichodermaharzianum*. Eur J Biochem 206, 859-67.

14. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19, 11-15.

15. Elad, Y., I. Chet, P. Boyle and Y. Henis (1983). Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctoniasolani* and Sclerotium rolfsii– Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathol 73, 85-88.

16. Felt O, B. P., Gurny R (1998). Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. Drug Dev Ind Pharm 24, 979–993.

17. Gokul B., L. J. H., Song K.B., Rhee S.K., Kim C.H., Panda T. (2000). Characterization and applications of chitinases from *Trichodermaharzianum* – A review. Bioprocess Engineering 23, 691-694.

18. Harighi, M. J., Motallebi., M. and Zamani, M. R. (2006a). Purification of chitinase 42 from *trichodermaatroviride* PTCC5220. Iranian Journal of Biology 19, 203-214.

19. Harighi, M. J., Motallebi M. and Zamani, M. R. (2006b). Antifungal activity of heterologous expressed chitinase42 (Chit42) from *Trichodermaatroviride* PTCC5220. Iranian Journal of Biotechnology 4, 95-103.

20. Jinzhu, S., Qian, Y., Beidong, L., and Dianfu, C. (2005). Expression of the chitinase gene from *Trichodermaaureoviride* in *Saccharomycescerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 69, 39-43.

21. Lin, W.-J., Huang, S.-W., and Chou, C. P. (2001). High-level extracellular production of penicillin acylase by genetic engineering of

www.SID.ir

Archive of SID

Escherichiacoli. Journal of Chemical Technology &Biotechnology 76, 1030-1037.

22. Lorito, M., Woo, S. L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7860-5.
23. Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichiacoli*. MicrobiolRev 60, 512-38.
24. Mergulhao, F. J., Summers, D. K., and Monteiro, G. A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichiacoli*. BiotechnolAdv 23, 177-202.
25. Mergulhao, F. J., Taipa, M. A., Cabral, J. M., and Monteiro, G. A. (2004). Evaluation of bottlenecks in proinsulin secretion by *Escherichiacoli*. JBiotechnol 109, 31-43.
26. Peti, W., and Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichiacoli* with minimal cost. ProteinExprPurif 51, 1-10.
27. Ridout C.J., C.-S. J. R. (1988). Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichodermaharzianum*. EnzymeMicrob. *Technol.* 10.
28. Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., and Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. Nat Struct Mol Biol 12, 340-9.
29. Rosenberg, H. F. (1998). Isolation of recombinant secretory proteins by limited induction and quantitative harvest. Biotechniques 24, 188-90, 192.
30. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Manniatis, T. (2001). "Molecular cloning: A laboratory mannual, 2nd edition." Cold Spring Harbor Laboratory Press.
31. Schrempf, H. (2001). Recognition and degradation of chitin by *streptomycetes*. Antonie van Leeuwenhoek 79, 285-289.
32. Shih, C. Y., Khan, A. A., Jia, S., Wu, J., and Shih, D. S. (2001). Purification, characterization, and molecular cloning of a chitinase from the seeds of *Benincasahispida*. Biosci Biotechnol Biochem 65, 501-9.
33. Viterbo, A., Ramot, O., Chemin, L., and Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. Antonie Van Leeuwenhoek 81, 549-56.
34. Wang, W., Vinocur, B., and Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218, 1-14.

www.SID.ir

Archive of SID

Heterologous expression of Chit36 from *Trichoderma atroviride* in prokaryotic system

Yazdanpanah-Samani M., Zamani M.R., Motallebi M. and Moghaddassi Jahromi Z.

National Institute for Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

Chitinolytic enzymes are involved to break down chitin waste products such as chitin shells of crustaceans and cell walls of fungi and production of chitin oligosaccharides. Ideal catalytic properties of these enzymes make them an attractive target for use in industry or as a biocontrol. In this study to amplify and cloning of *chit36*gene from native Iranian isolate, *Trichoderma atroviride* PTCC5220, Specific primers (chit36pf/chi36r) were designed and then intended to produce in periplasmic form, amplified fragment was cloned into pET26b(+) vector. The new construct was transformed into *E. coli* BL21-DE3 bacteria. The results of SDS-PAGE showed no evidence of protein expression in any of the conditions of temperature and different levels of IPTG at different cell fractions. So expression of Chit36 protein with the removal of signal peptide (to produce cytoplasmic form) with histidine sequence at the carboxyl end was planned. Bacteria containing recombinant construct were evaluated at different induction conditions. Despite detection of any band in any induction conditions using SDS-PAGE, low expression of proteins in two colonies were confirmed by Western blot assay. In order to optimize the expression condition, recombinant protein expression levels relative to the total bacterial protein in different induction conditions was evaluated using the quantitative measurements of protein bands on SDS-PAGE gels. The results showed that the best condition to induce expression is at OD600: 0.3 and 1 mM IPTG and incubation time of 6 hours. In these conditions expression level of recombinant protein relative to total protein was 45.57%.

Key words: *Trichoderma*, Heterologous expression, Chit36

www.SID.ir