تولید باکتریایی پروتئین نوترکیب کیتیناز از باکتری ترموفیل *Paenibacillus* sp A01

مهدی مرتضوی[۱و۲]، سعید امین‌زاده[۱*]، علیرضا قنبری[۲]، ناصر فرخی[۳]، علی اصغر کارخانه[۱] و زهره جواهری صفا[۱]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرایند

[۲] تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم کشاورزی

[۳] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی فناوریهای نوین، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

ONLINE FIRST

چکیده

کیتین، دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت بعد از سلولز و جزء اصلی کوتیکول حشرات و پوسته سخت پوستان است و دیواره سلولی بیشتر قارچها و بعضی از جلبکها و نیز نماتدها را تشکیل می‌دهد. مقادیر زیادی کیتین به شکل باقیمانده تجزیه ناپذیر بدن بسیاری از جانداران وارد طبیعت می‌شود که باعث آلودگی محیط زیست می‌گردد. می‌توان پس از تجزیه این پلی ساکارید با آنزیم کیتیناز از آن در جنبه‌های مختلف زندگی بهره جست. کیتینازها یکی از آنزیم هایی هستند که نقش تجزیه کیتین نامحلول را بر عهده دارند. برخی از باکتری ها کیتیناز را برای هضم کیتین تولید می‌کنند. در این تحقیق ژن کیتیناز ترموفیل با شماره دسترسی JQ675723 از جدایه باکتریایی *Paenibacillus* sp. A01 جداسازی و پس از همسانه‌سازی در pET26b به باکتری *اشرشیا کلی* برای تولید پروتئین نوترکیب منتقل شد. آنزیم هترولوگ تولیدی توسط ستون میل ترکیبی نیکل- سفاروز خالص گردید؛ آنزیم تولیدی نشان داد که در حضور کیتین کلوییدی و پس از افزودن ۳ و۵-دی نیترو سالیسلیک اسید در ۵۳۰ نانومتر و در دمای ۶۰ °C دارای فعالیت هیدرولازی است. دمای بالا، پتانسیل کاربردی شدن آن در صنعت را خاطر نشان می‌سازد. همچنین توالی نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده برای ژن کتیناز به‌صورت تئوری مورد مطالعه قرار گرفت که تشابه زیادی را به کیتینازهای دسته-بندی شده در خانواده ۱۸ گلیکوزیل هیدرولازها نشان داد. بررسی توالی آمینواسیدی آنزیم کیتیناز به‌ترتیب از ناحیه آمینی به سمت ناحیه کربوکسیل وجود سه دُمین کاتالیتیکی گلیکوزیل هیدرولاز ۱۸، شبه فیبرونکتین و متصل‌شونده به کیتین را مشخص نمود.

واژه های کلیدی: باکتری ترموفیل، کیتین، کیتیناز، *Paenibacillus* sp. A01

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۴۱۲-۰۲۱ ، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

کیتین فراوانترین بیوپلیمر در محیط دریایی و ترکیب اصلی اسکلت خارجی بندپایان، دیواره سلولی قارچ‌ها، و جلبک-هاست. مشتقات کیتین، زیست سازگار، زیست تخریب‌پذیر هستند (۴). کیتینازها (EC: 3.2.1.14) پیوند میان کربن‌های شماره ۱ و ۴ بین دو ملکول پشت‌سر هم N- استیل‌گلوکز-آمین (GlcNAc) در زنجیرهای کیتین را که اندازه آن‌ها بین ۲۰ کیلودالتون تا حدود ۹۰ کیلودالتون متغیر است؛ هیدرولیزمی‌کنند (۱۶). کیتینازهای ترشحی را می‌توان در موجوداتی که در ساختمان خود، واجد کیتین - (حشرات، سخت‌پوستان و قارچ‌ها) و یا فاقد کیتین هستند (گیاهان و باکتری‌ها) یافت. کیتینازها را می‌توان براساس نوع سوبسترا به اگزو- و اندو کیتینازها تقسیم نمود (۱۳) که تجزیه مؤثر کیتین به عملکرد هر دوی این آنزیم‌ها نیاز دارد که منجر به آزادسازی واحدهای N- استیل- گلوکزآمین می‌شود (۲۱). اندوکیتینازها به کاتالیز کیتین و تقسیم آن به مولتی‌مونومرهای با وزن مولکولی کم دنباله‌های

Archive of SID

www.SID.ir

گلوکوزآمین از قبیل کیتوتریوز، کیتوبیوز و دی‌استیل کیتوبیوز می‌پردازند (۹). در عوض اگزوکیتینازها بر دو نوع کیتوبیوزیداز (موثر مؤثر درجدا سازی واحدهای دی-استیل کیتوبیوز از انتهای غیراحیایی میکروفیبرهای کیتین) و β-*N*-استیل گلوکزآمینیداز تقسیم میشوند؛ که محصول الیگومری حاصل از اندوکیتیناز و کیتوبیوزیداز را به مونومرهای *N*-استیل گلوکزآمین تجزیه می‌کند (۱۶). این آنزیم در بعضی از گونه‌های باکتریایی از جمله گونه‌های موجود در جنس *آئرومونااس*، *سراشیا*، *میکسوباکتر*، *ویبریو*، *استرپتومایسس* و *باسیلوس* به فراوانی یافت می‌شود (۱۵). به دلیل کاربردهای وسیع صنعتی، کشاورزی و پزشکی، آنزیم کیتیناز توجه زیادی را به خود معطوف کرده است و جداسازی این آنزیم‌ها از موجودات ذره‌بینی کاربردهای گسترده‌ای در بیوکنترل قارچ‌ها و نماتودهای آفت محصولات کشاورزی یافته است (۱و۵).

کیتینازهای باکتریایی از نظر ساختمانی از چندین دُمین مختلف تشکیل شده‌اند که شامل دُمین اتصال به کیتین (CBD) در انتهای کربوکسیلی، دُمین مشابه با فیبرونکتین نوع ۳ (FnIII) و دُمین مشابه کادهرین می‌باشد. دُمین CBD نقش اتصال آنزیم به سوبسترا را ایفا می‌نماید که باعث افزایش کارآیی آنزیم می‌گردد، ولی در فقدان حضور این دُمین نیز، آنزیم قادر به تخریب کیتین می‌باشد، نقش دو دُمین دیگر هنوز روشن نشده است (۱۴). کیتینازها بر اساس توالی اسید آمینه‌ای در سه خانواده ۱۸ ، ۱۹ و ۲۰ گلیکوزیل هیدرولازها قرار می‌گیرند. خانواده ۱۸ کیتینازها درویروس‌ها، باکتری ها، قارچ ها، حیوانات و برخی از گیاهان عالی و خانواده ۱۹ کیتینازها درگیاهان و استرپتومایسس یافت می‌شوند. خانواده ۲۰ شامل N-استیل گلوکزآمینیدازهای مشتق از باکتری‌ها، برخی از قارچ‌ها و انسان‌ها است (۱۶و۱۹). مطالعات کریستالوگرافی اشعه X نشان داده است که آنزیم های کیتیناز خانواده ۱۸ دارای ساختار سبد مانند $(\alpha/\beta)_8$ (۱۷) و خانواده ۱۹ از لحاظ مارپیچ آلفا بسیار غنی و دو قسمتی می باشند. کیتینازهای خانواده ۱۸ در هیدرولیز اتصال گلیکوزیدی بتا ۱ و ۴، قطعات الیگوساکاریدی آنومر بتا را تولید می‌نمایند (۲)، در صورتی که کیتینازهای خانواده ۱۹ دارای مکانیزم معکوس بوده و آنومرهای آلفا را ایجاد می‌کنند (۲۰).

آنزیم کیتیناز به‌عنوان قارچ‌کش زیستی و حشره‌کش زیستی بسیار مورد توجه است. کیتینازها در تولید SCP برای حیوانات و تغذیه موجودات آبزی، جداسازی پروتوپلاست قارچ‌ها، آماده‌سازی کیتو-الیگوساکاریدهای بیواکتیو و مهار پاتوژن‌های گیاهی کاربرد دارد. در این مطالعه، از جدایه بومی باکتری گرم مثبت *Paenibacillus* sp. A01 از استخرهای پرورش میگو در جنوب کشور برای تولید پروتئین نوترکیب کیتیناز استفاده گردید. در این مطالعه با توجه به کاربردهای ذکر شده، آنزیم کیتیناز انتخاب شد. از آنجاییکه برخی باکتری ها می توانند کیتین را هضم کنند؛ باکتری *Paenibacillus* sp. A01 به منظور جداسازی ژن کیتیناز ترموفیل انتخاب شد. پس از تکثیر ژن توسط پرایمرهای اختصاصی و برای بیان هترولوگ آنزیم نوترکیب، همسانه سازی در وکتور بیانی pET26b انجام شد و به باکتری *اشرشیا کلی* به منظور تولید پروتئین مورد نظرانتقال داده شد. تخلیص پروتئین نیز با ستون میل ترکیبی نیکل-سفارز انجام شد و همچنین فعالیت بیولوژیک آن نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

آنزیم پلیمرازی *Taq* وآنزیم‌های برش‌دهنده با اثر محدودکننده *Bamh*I و *Hind*III، آنزیم T_4 DNA ligase، نشانگر اندازه DNA، نشانگر پروتئینی و IPTG از شرکت Fermentas(Burlington, Canada) خریداری شدند. کیت High Pure PCR Product Purification برای خالص‌سازی محصول PCR و نیز خالص‌سازی قطعات DNA از روی ژل آگارز، و نیز کیت High Pure Plasmid Isolation برای استخراج نوکلئیک اسید ناقلی از شرکت Roche (Indianapolis, USA) خریداری گردیدند. *N*-

Archive of SID

www.SID.ir

3,5-Dinitrosalicylic acid، Acetyl-D-glucosamine آنتی‌بیوتیک کانامایسین، آگارز وکیتین از شرکت Sigma (Steinheim, USA) خریداری شدند. ستون نیکل(Ni-NTA Agarose) از شرکت Invitrogen (Carlsbad, USA) و کیت استخراج نوکلئیک اسید برای استخراج نوکلئیک اسید ژنومی از شرکت BioNEER (Anaheim, USA) خریداری شدند. ایمیدازول، آکریل آمید، بیس آکریل آمید، APS و TEMED و آگار از شرکت (Darmstadt, Germany) Merck تهیه شدند. آغازگرها از شرکت (Anaheim, USA) BioNEER تهیه گردیدند.

در این تحقیق، از باکتری *Paenibacillus* sp. A01 که از استخرهای پرورش میگو در حله بوشهر جداسازی شده بود؛ به‌منظور استخراج نوکلئیک اسید ژنومی استفاده شده است. باکتری *اشرشیا کلی* سویه DH5α به‌عنوان میزبان در مراحل کلون‌سازی و نیز جهت تکثیر و نگهداری DNA پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت بیان آنزیم کیتیناز، از باکتری *اشرشیا کلی* سویه BL21(λDE3) استفاده شد.

تشخیص و شناسایی سویه جدا شده: سویه جداشده برای آزمون های بیوشیمیایی از قبیل ژلاتین، سیترات، متیل رد و سایر فاکتورها مورد ارزیابی قرار گرفت و تست های میکروبی نیز طبق پروتکل های استاندارد انجام شد.

استخراج نوکلئیک اسید ژنومی از *Paenibacillus* sp. A01 **و تکثیر ژن کیتیناز** : DNA از تک کلونی باکتری ترموفیل رشدیافته در دمای ۶۰ °C در محیط کشت LB (۰/۵٪ عصاره مخمر، ۱٪ پپتون، ۱٪ کلرید سدیم) توسط کیت استخراج نوکلئیک اسید، به‌دست آمد و از نظر کمّی و کیفی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگاروز تایید گردید.

براساس توالی‌های گونه‌های باکتریایی نزدیک به *Paenibacillus* sp. A01 در NCBI، آغازگرهای اختصاصی طراحی و به‌منظور همسانه‌سازی در ناقل بیانی pET26b نواحی برشی آنزیم‌های محدودالاثر *Bam*H I و *Hind* III به‌ترتیب در آغازگرهای پیش‌بر (5′CCATTGGATCCATGACGAGCTATACG3′) و معکوس (5′CCTATTAAGCTTTGAGCGACAGCGAC3′) با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 طراحی گردیدند. برای حفظ سایت برشی (بازهای آلی که زیر آنها خط کشیده شده است) در مراحل همسانه‌سازی و همچنین افزایش کارآیی برش، تعداد ۶ باز آلی در ′5 هر آغازگر در نظر گرفته شد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای فوق با برنامه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشتی اولیه، ۳۲ چرخه {مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه و ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد} و یک دور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. انجام شد و محصول PCR به حجم ۱۰۰ µl بر روی ژل آگارز (w/v) ٪ ۱برده شد و باند اختصاصی از ژل با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، تخلیص شد. برای سنجش میزان غلظت DNA تخلیص‌شده، دو میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ٪ ۱قرار گرفت .

همسانه‌سازی ژن کیتیناز در ناقل بیانی pET26b : هضم آنزیمی محصول PCR و ناقل بیانی pET26b (سه میکروگرم) با یک واحد از هر یک از آنزیم‌های برشی *BamH* I و *Hind* III در حضور ۲/۵ میکرولیتر بافر مشترک R در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت دو ساعت) صورت گرفت و بر روی ژل آگارز ۱٪ (w/v) جدا شد و به کمک کیت تخلیص محصول PCR خالص گردید.

با استفاده از یک واحد از آنزیم *T_4 DNA ligase*، محصولات برش‌یافته (۰/۴ میکروگرم از هر محصول) در حضور بافر ×۵ (۵ میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به مدت ۱۶ ساعت و در دمای ۱۴ درجه سانتی-

Archive of SID

www.SID.ir

گراد به هم ملحق شدند. باکتری مستعد *اشرشیاکلی* سویه BL21 به روش شوک حرارتی (در دمای ۴۲ درجه سانتی-گراد به مدت دو دقیقه) ترانسفورم گردید و پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB و نگهداری به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، بر روی محیط کشت LB حاوی ۱٪ (w/v) آگار و آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۱۶ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گردید.

تک کلونی حاصله، در محیط کشت LB به مدت ۱۶ ساعت و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با هوادهی کشت شد و از سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation و مطابق با دستورالعمل آن، پلاسمید حاوی ژن کیتیناز جدا و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناقل توسط شرکت ژن فن‌آوران توالی یابی گردید و حضور ژن در ناقل و قرار گرفتن آن به درستی در پایین‌دست پروموتور تعبیه‌شده در ناقل تایید شد (۱۵ و ۱۶).

بیان هترولوگ ژن کیتیناز: کلونی توالی‌یابی شده در ۵ میلی لیتر محیط LB دارای کانامایسین (۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) تلقیح یافت و به مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. حجم یک میلی‌لیتر از این محیط کشت به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت جدید LB حاوی کانامایسین در داخل ارلن تلقیح شد و در شیکرانکوباتور تا رسیدن جذب نوری آن به ۰/۴ الی ۰/۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرارگرفت. قبل از القاء توسط IPTG، یک میلی‌لیتر از هر کدام از نمونه‌ها، به‌عنوان کنترل منفی برداشته شد و در ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به هر ارلن ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت LB و آنتی‌بیوتیک کانامایسین IPTG ۰/۸ مولار اضافه گردید به‌طوریکه غلظت نهایی IPTG به ۱ میلی‌مولار برسد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با شیک ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و پس از ۳ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و به‌عنوان رسوب حاوی پروتئین القاء شده در نظر گرفته شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۶).

برای استخراج پروتئین نوترکیب، ابتدا رسوب حاصل از هر ۵۰ میلی‌لیتر سلول‌های جمع‌آوری‌شده با ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده طبیعی (۵۰ میلی‌مولار سدیم دی هیدروژن فسفات، ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی‌مولار ایمیدازول و ۰/۰۵٪ Tween 20) مخلوط و ۴۵ دقیقه درون یخ قرار داده شد، سپس دیواره و غشاء پلاسمایی باکتری از طریق سونیکاسیون با قدرت ۷۰ درصد و ۰/۵ پالس در پنج چرخه زمانی(هر کدام شامل ۴۵ ثانیه سونیکاسیون و ۱ دقیقه استراحت درون یخ) با استفاده از نیروی امواج مافوق صوت شکسته شدند. محلول بدست آمده بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محلول (رویی) شفاف در مراحل بعدی برای تخلیص پروتئین نوترکیب مورد نظر استفاده گردید.

خالص‌سازی پروتئین نوترکیب: ستون کروماتوگرافی نیکل به حجم یک میلی لیتر آماده و دو بار با آب مقطر(به حجم کل ستون) شستشو داده شد. سپس برای به تعادل رساندن ستون، از بافر اتصال (جدول ۱) استفاده شد و ستون سه بار در حجم ۵ میلی‌لیتر (۵ برابر حجم ستون) شستشو گردید. بعد از خروج بافر اول از ستون، محلول شفاف حاصل از مرحله قبل(سوپ پروتئینی) به ستون تزریق و سه بار از ستون عبور داده شد و محلول خروجی (flow) آن در یک ظرف جمع‌آوری گردید. تکرار تزریق و افزایش زمان در این مرحله باعث برقراری اتصال بهتر پروتئین‌های نوترکیب به ستون می‌شود. پروتئین‌های میزبان با تزریق ۵ میلی‌لیتر بافر شستشو (جدول ۱) به ستون از

Archive of SID

www.SID.ir

رزین شسته شد و محلول خروجی آن در یک ظرف مجزا جمع‌آوری گردید. با رسیدن سطح بالایی بافر قبلی به یک چهارم انتهایی ستون، بافر خارج کننده (جدول ۱) در حجم ۵ میلی‌لیتر به ستون تزریق شد. پروتئین‌های نوترکیب در این مرحله در رقابت با غلظت بالای ایمیدازول از رزین‌ها جدا شدند و با جریان بافری به خارج هدایت شدند و محلول خروجی در حجم ۵۰۰ میکرولیتردر ۱۰ میکروتیوب جمع‌آوری شد.

جدول ۱- مواد لازم برای تهیه محلول های مورد نیاز جهت خالص‌سازی آنزیم کیتیناز توسط ستون نیکل

Binding buffer (pH=8)	washing buffer(pH=8)	Elution buffer(pH=8)
(۵۰ mM) NaH_2PO_4	(۵۰ mM) NaH_2PO_4	(۵۰ mM) NaH_2PO_4
(۵۰۰ mM)NaCl	(۵۰۰ mM) NaCl	(۵۰۰ mM) NaCl
pH= 8, Tween 20, % ۰/۰۵	Tween 20, % ۰/۰۵	Tween 20, % ۰/۰۵
ایمیدازول (۱۰ mM)	ایمیدازول (۲۰ mM)	ایمیدازول (۲۵۰ mM)

بخش‌های مختلف فرآیند تولید و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب با استفاده از ژل سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) به انجام رسید (Laemmli 1970) و ژل‌ها با استفاده از رنگ کوماسی آبی R-250 در آب، متانول و اسید استیک (۱:۵:۴) برای مدت یک ساعت رنگ‌آمیزی شد (۳).

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز: ماده N- استیل D- گلوکز آمین که در اثر فعالیت آنزیم کیتیناز تولید می‌شود، در حضور معرف ۳ و ۵ – دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) تشکیل رنگ نارنجی مایل به قرمز می‌دهد. کیتین کلوئیدی به‌عنوان سوبسترا در سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز و به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت، از استفاده شد (۶).

نتایج و بحث

جداسازی و تشخیص سویه جدا شده: تست های مورفولوژیکی، میکروبیولوژی و بیوشیمیایی (جدول۲) سویه مورد نظر انجام گرفت و باکتری مورد نظر یک سویه جدید از *Paenibacillus* تشخیص داده شد.

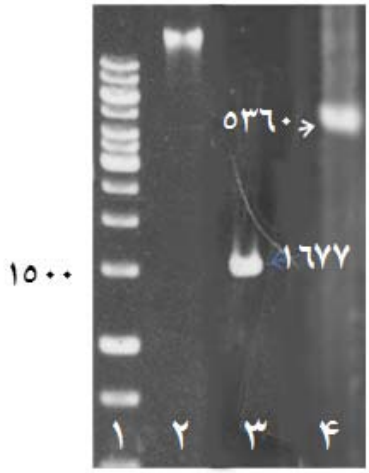
همسانه سازی ژن کیتیناز باکتری *Paenibacillus* sp. A01: پس از تهیه کشت تازه از سویه ایزوله شده، DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA استخراج شد (شکل۱ چاهک ۲). ژن کیتیناز (۱۶۷۷ جفت باز) با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با سایت برشی مهندسی شده تکثیر شد (شکل ۱ چاهک۳). با برش قطعه تکثیری، ژن در ناقل خطی شده pET26b با همان آنزیم‌های برشی (شکل ۱ چاهک ۴) الحاق گردید و به باکتری BL21 منتقل شد و با ترادف‌یابی حضور ژن و استقرار آن به درستی در محل تایید گردید (Accession No. JQ675723). توالی حاصله با ژن کیتیناز از باکتری *P. ehimensis* ٪۸۷ شباهت داشت.

بیان، خالص سازی نسبی ژن کیتیناز و سنجش فعالیت آنزیمی: با القا باکتری، پروتیین هترولوگی با وزن ملکولی نسبی ۵۰ کیلو دالتون (شکل ۲، چاهک۳) تولید گردید و پروتیین تولیدی به کمک ستون نیکل سفاروز به‌طور نسبی خالص گردید (شکل ۲، چاهک ۴). آنزیم کیتیناز در حضور سوبسترای مخصوص خود یعنی کیتین کلوئیدی در محیط، اقدام به تجزیه آن نموده و آنرا تبدیل به گلوکز آمین و دیگر الیگوساکارید های کیتینی می نماید، واکنش گلوکز آمین با معرف رنگی دی نیترو سالیسیلیک اسید باعث تغییر رنگ محیط از زرد به نارنجی شد که این نشان از فعالیت آنزیم کیتیناز دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

کیتین دومین منبع آلی و تجدیدپذیر در طبیعت است. کیتینازهای آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین بوده و عملکردهای مهم بیوفیزولوژیکی و کاربردهای بالقوه فراوانی دارند (۵).



شکل ۱- DNA ایزوله شده از باکتری (چاهک شماره ۲) ، محصول PCR ژن کیتیناز (چاهک شماره ۳) ، ناقل خطی شده pET26b (چاهک شماره ۴)، چاهک شماره ۱ مارکر DNA می‌باشد (Fermentas, Burlington, Canada).

در این مطالعه، ژن کیتیناز از باکتری *Paenibacillus* sp. A01 که از استخرهای پرورش میگو در آبادان جداسازی شده بود؛ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جداسازی و در ناقل بیانی pET26b همسانه‌سازی گردید (شکل ۱) و توسط شرکت ژن فن‌آوران تعیین توالی شد. علت انتخاب ناقل pET26b برای همسانه سازی ژن کیتیناز داشتن مزایایی بود که این ناقل دارای آن می باشد که از جمله آن می توان به داشتن پروموتور قدرتمند T7 برای بیان ژن خارجی اشاره نمود یکی دیگر از مزایای این ناقل، داشتن پپتید نشانه برای انتقال پروتئین نوترکیب به فضا ی پری پلاسمی می باشد، این فضا دارای مزایای متعددی برای بیان پروتئین‌های نوترکیب از جمله ایجاد انتهای آمینی صحیح، امکان تاخوردگی بهتر، تشکیل پیوندهای صحیح دی‌سولفیدی با وجود شرایط اسیدی در این ناحیه، تعداد کم پروتئازها در محیط پری‌پلاسمی و تخلیص ساده‌تر پروتئین نوترکیب است (۱۸). سپس در باکتری *اشرشیا کلی* سویه B121 بیان شد که نتایج به‌دست آمده حضور و صحت قرارگیری ژن کیتیناز را در این باکتری تأیید کرد (شکل ۱).

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری Paenibacillus sp. A01

نام باکتری	واکنش گرم	مورفولوژی	تولید رنگدانه	حرکت	متیل رد	تولید اسپور	voges-Proskauer	پروتئاز	آمیلاز	ژلاتیناز	سیتراتاز
Paenibacillus	مثبت	میله ای	سفید	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی

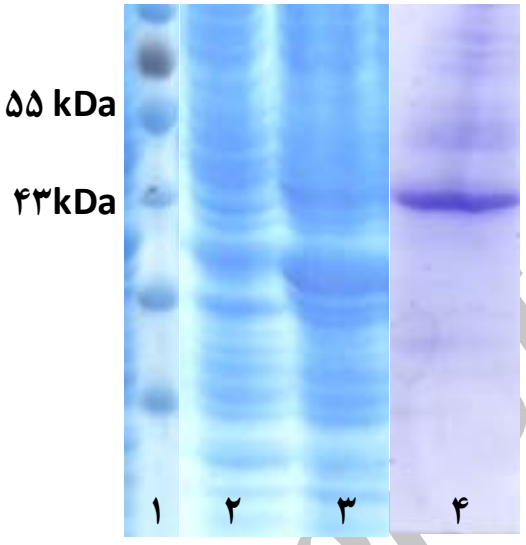
تعیین توالی ژن کیتیناز بصورت دو طرفه و به‌وسیله پرایمرهای یونیورسال اختصاصی برای ابتدا و انتهای پروموتور T7 انجام گرفت و سپس توالی به دست آمده با توالی ژن های ثبت شده در بانک جهانی NCBI مقایسه شد و نتیجه حاصل نشان داد ژن کیتیناز جدا شده از سویه بومی *Paenibacillus* sp. A01 دارای ۸۷ درصد همولوژی با ژن کیتیناز chit60 باکتری *paenibacillus ehimensis* می‌باشد. پیش از اقدام برای بیان ژن کیتیناز توالی به‌دست آمده از ژن کیتیناز همسانه‌سازی شده به‌صورت مجازی به توالی اسید آمینه‌ای ترجمه شد که پروتئین کامل به دست آمد. سپس آنزیم کیتیناز با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل خالص گردید که با استفاده از SDS-PAGE و رنگ-آمیزی کوماسی آبی وزن تقریبی ۵۰٪ را نشان داد (شکل ۲). در انتها فعالیت آنزیم کیتیناز به‌وسیله رنگ‌سنجی با معرف DNS سنجیده شد و تغییر رنگ محیط از رنگ زرد به نارنجی نشان‌دهنده فعالیت آنزیم کیتیناز بود (شکل ۳).

کیتینازها جهت کنترل آفات با حل کردن غشای پری-تروفیک دستگاه گوارش میانی حشرات و همچنین اسکلت

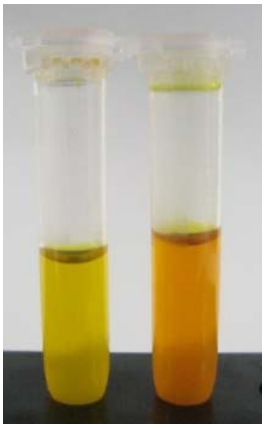
Archive of SID

www.SID.ir

خارجی آنها، کاربرد دارند. کیتینازهای حشره‌ای در حال حاضر جهت کاربرد به عنوان آفت‌کش‌های بیولوژیکی در تکمیل برنامه‌های کنترل و مدیریت آفات و حشرات در دسترس هستند. در سال ۱۹۹۷، Kramer و همکاران، به‌منظور استفاده از آنزیم کیتیناز به‌عنوان یک آفت‌کش گیاهی و حشره‌کش، ژن کیتیناز را از کرم تنباکو(*Mandula sexta*) جدا کردند و برخی خواص فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی آن را مورد بررسی قرار دادند.



شکل ۲- بررسی بیان پروتئین نوترکیب کیتیناز باکتری *Paenibacillus* توسط SDS-PAGE. عصاره باکتریایی قبل از القا (چاهک شماره ۲)، عصاره باکتریایی بعد از القا با ۱ میلی‌مولار IPTG (چاهک شماره ۳)، خالص سازی نسبی پروتیین نوترکیب با ستون نیکل سفاروز (چاهک شماره ۴). چاهک شماره ۱، مارکر پروتیینی است (Fermentas, Burlington, Canada).



شکل ۳- سنجش فعالیت آنزیمی کیتیناز به‌وسیله رنگ‌سنجی با DNS سمت چپ، شاهد و سمت راست ، نمونه حاوی آنزیم کیتیناز

گیاهان تراریخته‌ای که ژن کیتیناز جدا شده از کرم تنباکو به آنها منتقل شده بود، باززایی شدند و نسبت به حشرات و آفات گیاهی از خود مقاومت میزبانی نشان دادند. همچنین ویروس بیماری‌زایی در حشرات که توسط این ژن تراریخته شده بود، نسبت به نوع غیر تراریخته آن از خود فعالیت حشره‌کش بیشتری را نشان داد (۱۰). Sheng و همکاران در سال ۲۰۰۲، کیتیناز جدیدی را در *Bacillus brevis* شناسایی و جداسازی کردند که این کیتیناز بر روی ژل اکریل آمید وزن مولکولی ۸۵ کیلو دالتون را نشان داد؛ در حالی که با جوشاندن و تیمار آن با اوره یک مولار در دمای ۵۰°C به مدت ۱۰ دقیقه، این کیتیناز به ۴۸ کیلو دالتون میل می‌کرد (۱۴). در سال ۲۰۱۳، Saima و همکاران نشان دادند که دو گونه باکتریایی *A. hydrophila* HS4 و *A. punctata* HS6 قادر به تولید مقدار خیلی زیادی کیتیناز در زمان کم هستند و هر دو گونه جدا شده از آئروموناس قادر به تولید کیتیناز بین دمای ۲۲ و ۴۰ درجه سانتیگراد هستند که دمای لازم برای کشت محصول در هند می‌باشد که می‌توانند جهت ایجاد شرایط لازم برای مقابله با قارچ‌های پاتوژن گیاهی به‌کار روند (۱۱). در سال

Archive of SID

www.SID.ir

۲۰۱۲، Gomaa باکتری‌های تجزیه‌کننده کیتین را از نمونه-های خاک جداسازی نمود و با انتخاب *B. thuringiensis* و *B. licheniformis*، فعالیت رقابتی کیتینازهای تولیدشده را در مقابل بعضی پاتوژن‌های قارچی و اثرات آن‌ها در افزایش جوانه‌زنی دانه سویای آلوده‌شده با سایر قارچ‌های فیتوپاتوژن بررسی کرد و نشان داد که هر دو گونه مورد مطالعه توانایی لیز دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌های فیتوپاتوژن را دارند (۷). در سال ۲۰۱۷، Thimoteo و همکاران نشان دادند که پایداری و فعالیت MetaChi18A در طیف وسیعی از شرایط بیانگر این است که این کیتیناز شاید برای به‌کارگیری در فرایند صنعتی کیتین مفید و مناسب باشد (۱۹).

به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان‌دهنده تجزیه کیتین توسط آنزیم کیتیناز در باکتری *Paenibacillus* sp. A01 می‌باشد و پیشنهاد می‌شود از این باکتری به‌منظور تولید انبوه این آنزیم در مصارف صنعتی و کشاورزی از قبیل آفت‌کش‌های بیولوژیکی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به دلیل فراهم آوردن امکانات پژوهش و تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

7. Gomaa, E. Z. (2012). "Chitinase production by Bacillus thuringiensis and Bacillus licheniformis: their potential in antifungal biocontrol." The Journal of Microbiology 50(1): 103-111.
8. Henrissat, B. (1991). "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities." Biochemical Journal 280(2): 309-316.
9. Henrissat, B. (1991). "Sequence homology between a beta-galactosidase and some beta-glucosidases." Protein sequences & data analysis 4(1): 61.
10. Kramer, K. J. and S. Muthukrishnan (1997). "Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides." Insect biochemistry and molecular biology 27(11): 887-900.
11. Kuddus, M. and I. Ahmad (2013). "Isolation of novel chitinolytic bacteria and production optimization of extracellular chitinase." Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 11(1): 39-46.
12. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." nature 227: 680-685.
13. Leatham, G. F. and M. E. Himmel (1991). Enzymes in biomass conversion, ACS Publications.

1. Berini, F., I. Presti, F. Beltrametti, M. Pedroli, K. M. Vårum, L. Pollegioni, S. Sjöling and F. Marinelli (2017). "Production and characterization of a novel antifungal chitinase identified by functional screening of a suppressive-soil metagenome." Microbial Cell Factories 16(1): 16.
2. Brameld, K. A. and W. A. Goddard (1998). "The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases." Proceedings of the National Academy of Sciences 95(8): 4276-4281.
3. Brunelle, J. L. and R. Green (2014). "Coomassie blue staining." Methods in enzymology 541: 161.
4. Cardozo, F. A., C. K. Zimpel, A. M. S. Guimaraes, A. Pessoa and I. N. G. Rivera (2016). "Draft genome sequence of marine-derived Aeromonas caviae CHZ306, a potential chitinase producer strain." Genome Announcements 4(6): e01293-01216.
5. Duo-Chuan, L., S. Chen and L. Jing (2005). "Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus Talaromyces flavus." Mycopathologia 159(2): 223-229.
6. Emruzi Tubkanlu Z., Aminzadeh S., Karkhanei A.A. and A. J. (2015). "Study of active site adjacent residues on Serratia marcescens B4A chitinase catalytic activity." journal of cellular and molecular researches 28(3): 318-326.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Li, S., Z.-A. Zhao, M. Li, Z.-R. Gu, C. Bai and W.-D. Huang (2002). "Purification and characterization of a novel chitinase from Bacillus brevis." ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA-CHINESE EDITION- 34(6): 690-696.

15. Neufeld, E. F. and V. Ginsburg (1966). Complex carbohydrates, Academic Press.

16. Rathore, A. S. and R. D. Gupta (2015). "Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives." Enzyme research 2015.

17. Robertus, J. D. and A. F. Monzingo (1998). "The structure and action of chitinases." Exs 87: 125-135.

18. SC, M. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." Microbiol Rev 60: 512-538.

19. Thimoteo, S., A. Glogauer, H. Faoro, E. de Souza, L. Huergo, B. Moerschbacher and F. Pedrosa (2017). "A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library." Brazilian Journal of Medical and Biological Research 50(1).

20. Ueda, M., M. Kojima, T. Yoshikawa, N. Mitsuda, K. Araki, T. Kawaguchi, K. Miyatake, M. Arai and T. Fukamizo (2003). "A novel type of family 19 chitinase from Aeromonas sp. No. 10S- 24." European Journal of Biochemistry 270(11): 2513-2520.

21. Yamashita, Y. and K. Okazaki (2004). "Purification and antifungal activity of recombinant chitinase from Escherichia coli carrying the family 19 chitinase gene of Streptomyces sp. J-13-3." Bioscience, biotechnology, and biochemistry 68(10): 2193-2196.

22. Yazdanpanah-Samani M., Zamani M.R., Motallebi M. and M. J. Z. (2015). "Heterologous expression of Chit36 from Trichoderma atroviride in prokaryotic system." journal of cellular and molecular researches 28(3): 447-457.

Archive of SID

www.SID.ir

Recombinant Chitinase produced from a thermophilic *Paenibacillus* sp. A01

Motazavi M.[1,2], Aminzadeh S.[1], Ghanbari A.R.[2], Farrokhi N.[3], Karkhane A.A.[1] and Javaheri Safa Z.[1]

[1] Bioprocess Engineering Group, Industrial and Environmental Biotechnology D., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[2] School of Agricultural Engineering, University of Shahed, Tehran, I.R. of Iran

[3] Biotechnology Group, Faculty of New Technologies Engineering, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Chitin is the second most abundant organic polymer in nature after cellulose and it is the main part of Insects cuticle and crustaceans and includes in cell wall of most fungus and some algae and nematodes. Huge amounts of chitin residual are being produced by organisms that enter to the nature as natural pollutants. However, this polysaccharide has immense application in different aspects of our daily life once becomes digested via chitinases. Chitinase is one of the enzymes that responsible for disintegrating chitin. Some of bacteria produce chitinase for digesting chitin. Here, a thermophilic chitinase gene (JQ675723) obtained from a *Paenibacillus ehimensis* isolate. The gene was cloned in pET26b and transformed into *E. coli* to heterologously produce the enzyme. The recombinant protein was isolated via affinity chromatography using Ni-NTA column. The enzyme demonstrated to have hydrolytic activity in the presence of chitin and by addition of 3, 5-dinitrosalicylic acid at 530 nm. Moreover high temperature showed industrial potential. Its nucleotide sequence had high similarity to Glycoside hydrolase family 18. Amino acid sequence from amino to carboxyl determined glycosyl hydrolase domain, fibronectin like domain and chitin binding domain.

Key words: Chitin, Chitinase, Thermophilic Bacterium, *Paenibacillus ehimensis*

Archive of SID

www.SID.ir