

کلونینگ و بیان ژن ATP سولفوریلاز از یک سوش ایرانی باکتری ژئوباسیلوس گرمادوست

اسمعیل رحیمی¹، مهرداد بهمنش^{2*}، مریم نیکخواه³، ایمان صادقی¹

1- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

2- دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

3- استادیار گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس

* تهران، صندوق پستی 154 - 14115

Behmanesh@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 91/8/24 پذیرش مقاله: 92/1/1)

چکیده - آنزیم آدنوزین تری فسفات سولفوریلاز (ATPS) در بسیاری از انواع موجودات وجود دارد. نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوتی در موجودات مختلف به آنزیم ATPS نسبت داده شده که می‌توان به جذب و احیای سولفات و بازیابی پیروفسفات اشاره کرد. همچنین آنزیم کاربردهای صنعتی و آزمایشگاهی متنوعی دارد. هدف این مطالعه کلون و بیان ژن تولید کننده پروتئین نوترکيب ATPS از یک سوش ژئوباسیلوس ایرانی بود. بعد از جداسازی و تعیین سوش باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس، DNA ژنومی آن استخراج شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ATPS، ژن مورد نظر از روی DNA ژنومی تکثیر شد. نتیجه انجام PCR ژن ATPS به صورت یک باند 1188 جفت بازی بر روی ژل آگاروز مشاهده شد. سپس محصول PCR تخلیص و داخل وکتور کلونینگ کلون شد. باند مربوط پس از کلونینگ، توالی‌یابی شد و نتیجه بررسی همولوژی آن در بانک اطلاعاتی NCBI تأیید کرد که قطعه کلون شده مربوط به ژن ATPS است. ژن مورد نظر در پلاسمید بیانی pET 28a ساب کلون شد. امکان بیان پروتئین نوترکيب ATPS در باکتری BL21(DE3) از روی ORF کلون شده با استفاده از ژل SDS-PAGE بررسی شد. آنالیز پروتئین بیان شده بر روی ژل SDS-PAGE یک باند 47.5 کیلو دالتونی را نشان داد. سنجش فعالیت آنزیمی پروتئین مورد نظر از طریق تولید ATP و ارزیابی آن به روش لومینسانس نشان داد که پروتئین نوترکيب دارای فعالیت است. این اولین مطالعه در رابطه با کلون، بیان و تعیین فعالیت آنزیمی ژن ATPS از باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس است.

کلیدواژگان: آدنوزین تری فسفات سولفوریلاز (ATPS)، پیروفسفات، ژئوباسیلوس کواستافیلوس، پروتئین نوترکيب و لومینسانس ATP.

1- مقدمه

انتقال فعال گروه شیمیایی سولفات به داخل سلول و سپس تبدیل آن به فرم فعال و پر انرژی فسفو آدنوزین- فسفو سولفات (PAPS) است [2]. مسیر فعال شدن سولفات بعد از ورود به سلول توسط دو آنزیم کاتالیز

سولفات شدن¹ یکی از تغییرات مهم در پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها است [1]. سولفات شدن نیاز به

1. Sulfation

کننده سولفات، ATP سولفوریلاز تولید APS می‌کند که به عنوان گیرنده نهایی الکترون در متابولیسم هتروتروفی عمل می‌کند [9]. در باکتری‌های شیمیولیتوتروف و فتولیتوتروف² مانند تیوباسیلوس، ATP سولفوریلاز واکنش نهایی در اکسیداسیون ترکیبات سولفوری احیا شده مانند سولفیت به سولفات را کاتالیز می‌کند که در نهایت در تولید ATP مشارکت می‌کند [10,11].

ATP سولفوریلاز کاربردهای صنعتی و آزمایشگاهی زیادی دارد که می‌توان به تشخیص³ باکتری‌ها در فرایندهای صنعتی به‌ویژه فرایندهای مرتبط با تولید مواد غذایی و بیوداروها⁴ [12]، مطالعات فسفریلاسیون [13]، آشکارسازی مداوم پیروفسفات معدنی [14]، توالی‌یابی DNA با روش پایروسکونسینگ⁵ [15,16]، تشخیص بیولومینومتری⁶ غلظت ADP در غلظت بالای ATP، آشکارسازی مداوم فعالیت DNA پلیمرز اشاره کرد [17]. در حال حاضر تنها ATP سولفوریلاز نوترکیب از مخمر به صورت تجاری در دسترس است. نظر به اهمیت و کاربردهای متنوع این آنزیم، هدف این تحقیق آن است که ژن این آنزیم از یک سوش باکتریایی ایرانی کلون و به صورت نوترکیب بیان شود.

2- مواد و روش‌ها

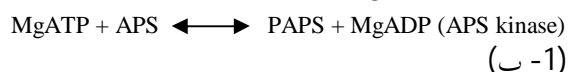
2-1- مواد و سویه‌های باکتریایی

باکتری که از آن برای جداسازی و کلون کردن ژن استفاده شد از چشمه‌های آب گرم اردبیل جداسازی شده بود. پس از کشت، از آن برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد. سویه‌های DH5α و BL21 (DE3) از اشیریشیا کلی به ترتیب برای کلونینگ ژن و بیان پروتئین نوترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. دو پلاسمید pTZ57R (از شرکت

می‌شود. در اولین مسیر، آنزیم آدنوزین تری فسفات سولفوریلاز (ATP Sulfurylase: ATPS) اولین واکنش احیا شدن سولفات را کاتالیز می‌کند. در این واکنش این آنزیم یک واکنش دو طرفه را کاتالیز می‌کند که سویسترای آن در واکنش رفت، سولفات و ATP است. در این واکنش سولفات با مصرف ATP به 5'-Adenosine phosphosulfate (APS) احیا شده و یک مولکول پیروفسفات (PPi) نیز آزاد می‌شود [3] (رابطه 1-الف).



در مسیر دوم آنزیم دیگری به نام آدنوزین فسفو سولفات کیناز (APS Kinase) دخیل است که با مصرف یک مولکول ATP، APS را بیشتر فسفریله کرده و فرم احیا و پر انرژی سولفات به نام فسفو آدنوزین فسفو سولفات (PAPS) را تولید می‌کند (رابطه 1-ب) [4].



ژن ATP سولفوریلاز در اکثر موجودات زنده بیان می‌شود. در بیشتر موجودات مانند باکتری‌ها و گیاهان این دو فعالیت آنزیمی، ATP سولفوریلازی و APS کینازی، از هم جدا بوده و به‌وسیله دو پروتئین مستقل انجام می‌گیرد [5]. اما در بعضی موجودات بررسی شده پیشرفته‌تر مانند رت و قارچ‌ها و پستانداران ادغام ژنی رخ داده و این دو فعالیت به‌وسیله یک آنزیم با قلمروهای¹ مختلف صورت می‌پذیرند که هم فعالیت ATP سولفوریلازی و هم فعالیت APS کینازی دارد [6,4].

ATP سولفوریلاز سه نقش عمده را در موجودات زنده بر عهده دارد. در قارچ‌ها، مخمرها، بیشتر باکتری‌های هتروتروف، جلبک‌ها و گیاهان پیشرفته این آنزیم اولین واکنش داخل سلولی برای تثبیت و احیای سولفات معدنی به مولکول‌های زیستی مانند متیونین و سیستئین را کاتالیز می‌کند [8,7]. در حالی که در باکتری‌های غیرهوازی احیا

2. Chemolithotrophic and Photolithotrophic
3. Monitoring
4. Biopharmaceuticals
5. Pyrosequencing
6. Bioluminometric Detection

1. Domains

2-3- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای طراحی پرایمرها با توجه به نبود توالی مربوط به ژن، در ابتدا با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی توالی ژن ATPS از موجودات مختلف از سایت NCBI تهیه و هم‌ردیفی توالی‌ها در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی انجام شد. نظر به اینکه عمده توالی‌های موجود در NCBI برای ژن هدف تحقیق تنها به صورت پیشگویی کامپیوتری برای احتمال وجود چنین ژنی بود، در این مطالعه از تمامی توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI در مقایسه با توالی ژن ATPS از مخمر ساکارومایسس، به عنوان توالی مرجع استفاده شد؛ سپس قسمت‌های حفاظت شده مشخص و بر مبنای آن طراحی پرایمرها انجام شد.

در انتهای پرایمرها به منظور انجام ساب کلونینگ بعد از جداسازی ژن در وکتور بیانی، محل سایت برشی انتروکیناز و آنزیم محدود الاثر BamH I در انتهای پرایمر فرادست و سایت Hind III در انتهای پرایمر فرودست در نظر گرفته شد (جدول 1).

برای تکثیر ژن هدف در این مطالعه 10ng از DNA ژنومیک باکتری به عنوان الگو و در حجم نهایی 20 µl استفاده شد. در واکنش علاوه بر پرایمرهای فرادست و فرودست با غلظت نهایی 4pM (جدول 2)، آنزیم DNA پلیمرز و بافر مربوط به آن استفاده شد. سیکل‌های PCR استفاده شده برای جداسازی ژن ATPS طبق جدول 3 انجام شد. در پایان محصول PCR بر روی ژل آگاروز الکتروفورز جداسازی و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بر مایند به مدت 30 دقیقه، مشاهده و عکس برداری شد.

از بین چهار نوع باکتری کاندیدا فقط در یک مورد بانندی حدود 1200 جفت بازی که نزدیک به اندازه مورد نظر بود به دست آمد که پس از جدا کردن آن از روی ژل به وسیله کیت استخراج DNA از روی ژل (Bioneer) در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد.

فرمتاز¹ و pET28a (از شرکت نوآژن²) به ترتیب برای کلونینگ ژن و بیان پروتئین بکار برده شدند. آنزیم‌های محدود الاثر BamH I و Hind III از شرکت تاکارا³ تهیه شدند. آنزیم DNA پلی مرز دارای خاصیت تصحیح کنندگی از Amplicon و T4 DNA Ligase از شرکت فرمتاز تهیه شد. کیت‌های مورد استفاده برای استخراج DNA ژنومی، تخلیص محصول PCR و حامل‌ها از شرکت Bioneer فراهم شدند. IPTG از Sigma و پیروفسفات از Merck خریداری شد. آمپی‌سیلین و کانامایسین مورد استفاده به عنوان آنتی‌بیوتیک از شرکت سیگما⁴ خریداری شد.

2-2- جداسازی و تعیین مشخصات باکتری‌ها

برای انجام روند جداسازی ژن، ابتدا از چهار نوع باکتری‌های کاندیدا که قبلاً از چشمه آب گرم حاوی گوگرد در اردبیل جدا شده بودند تک کلونی جدا شد. سپس برای مشخص کردن ویژگی‌های مورفولوژیکی آنها از رنگ‌آمیزی گرم استفاده شد. برای تهیه منبع DNA از هر کدام از باکتری‌ها، یک تک کلون از آنها در 5 میلی‌لیتر محیط کشت LB فاقد آنتی‌بیوتیک برای مدت یک شب کشت داده شد. سپس در روز بعد باکتری‌ها به وسیله سانتریفیوژ در دور 6000rpm و در دمای 4°C سانتی‌گراد و به مدت 15 دقیقه جدا شد. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومیک (Bioneer) از سلول‌ها جدا شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب به وسیله اسپکتروفتومتر و الکتروفورز DNA بر روی ژل آگاروز بررسی شد. برای تعیین ماهیت مولکولی و رده‌بندی باکتری حاوی ژن از روش مولکولی، قطعه 16srRNA با استفاده از پرایمرهای عمومی (جدول 1) تکثیر و سپس برای تعیین توالی ارسال شد.

1. Fermentas
2. Novagen
3. TaKaRa
4. Sigma

جدول 1 توالی مربوط به پرایمرهای فرادست و فرودست برای تکثیر ژنهای 16s rRNA و ATP سولفوریلاز (محل سایت‌های برشی به صورت ایتالیک و توالی مربوط با انتروکیناز با خط زیر مشخص شده است)

توالی	پرایمرها
5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	فرادست 16 rRNA
5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	پایین دست 16 rRNA
5'-GGATCCGACGACGACGACAAGATGAGCGTAAGCATCCCGCAT-3'	فرادست ATP سولفوریلاز
5'-AAGCTTTTAGCGCGCTGACGGGGCGAC-3'	پایین دست ATP سولفوریلاز

کشت رشد داده شدند. پس از آن کلنی‌های ظاهر شده با استفاده از پرایمرهای عمومی مربوط به وکتور با روش کلنی PCR غربال شدند. از بین کلنی‌های حاوی قطعه مورد نظر، سه کلونی برای تهیه و استخراج پلاسمید نوترکیب انتخاب و در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت 16 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس به وسیله کیت استخراج پلاسمید (Bioneer)، پلاسمید نوترکیب استخراج و برای توالی‌یابی به شرکت زیست‌فناوری پیشگام فرستاده شد. توالی‌یابی به صورت دو طرفه و به وسیله پرایمرهای عمومی انجام شد. نتایج توالی‌یابی ژن کلون شده با نرم افزار Sequencher (4.1) و Blast در سایت NCBI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

2-5- ساب کلون کردن در وکتور بیانی

برای ساب کلون کردن ORF ژن کلون شده، ابتدا پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T حاوی ژن ATPS و پلاسمید بیانی pET28a به وسیله دو آنزیم محدودالتر BamH I و Hind III برش داده شدند. قطعات حاوی ژن ATPS و پلاسمید بریده شده از روی ژل آگاروز استخراج و با استفاده از آنزیم DNA ligase به هم متصل شدند. عمل اتصال به مدت یک شب و در دمای 16°C انجام شد. پلاسمید نوترکیب pET28a/ATPS ساخته شده به داخل باکتری

جدول 2 مواد و مقدار به کار رفته در واکنش PCR

مواد	مقدار
Taqman master mix 10x	10 µl
پرایمر بالادست	0.8 µl
پرایمر پایین دست	0.8 µl
Template DNA	2µl (10 ng)
آب دیونیزه	6.4 µl
حجم کل	20 µl

جدول 3 شرایط انجام واکنش PCR

مراحل	درجه حرارت °C	زمان	تعداد سیکل
دنا توره کردن اولیه	94	5min	1
دنا توره کردن	94	50s	35
اتصال	62	30s	
تکثیر	72	50s	1
تکثیر نهایی	72	5min	

2-4- غربال‌گری¹ و توالی‌یابی مولکول DNA

پس از انجام مراحل لیگاسیون و آماده‌سازی باکتری مستعد، محصول واکنش اتصال² به روش الکتروپوریشن به داخل باکتری DH5α منتقل شد. سپس باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت 75 میکرومول بر میلی لیتر از محیط

1. Screening
2. Ligation

سلولی بر روی ژل SDS-PAGE با غلظت 12% برده و بررسی شد.

7-2- تخلیص پروتئین

برای تخلیص و بررسی عملکرد، پروتئین نوترکیب در حجم 50 میلی‌لیتر محیط کشت بیان شد و از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA (از شرکت کیاژن¹) برای خالص کردن آن استفاده شد. بافرهای مورد استفاده برای مراحل تخلیص شامل: بافر A (تبادل)، بافر B (شستشو) (Immidazole; 30mM, NaH₂PO₄; 50mM, NaCl;) بافر C (جداکنده) (Immidazole; 300mM, PH 8 (250mM, NaH₂PO₄; 50mM, NaCl; 300mM, PH 8 بود. ستون ابتدا با بافر A کالیبره شد و بعد از آن لیز سلولی روی ستون برده شد. ستون با 3 تا 4 برابر حجم ستون به‌وسیله بافر B شستشو داده شد و در نهایت به ستون بافر C اضافه شد و خروجی آن در ویال‌های جمع‌آوری شد. پروتئین تخلیص شده به مدت 24 ساعت در بافر 40 میلی‌مولار تریس pH=8.0 و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. در نهایت غلظت پروتئین با روش براد فورد² اندازه‌گیری و برای بررسی روند تخلیص بر روی ژل SDS-Page بررسی شد.

8-2- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم

برای تشخیص فعال بودن پروتئین نوترکیب و با توجه به ماهیت آنزیمی آن از روش لومینومتری برای تشخیص تشکیل ATP با استفاده از آنزیم لوسیفراز (مربوط به گونه photinus pyralis) استفاده شد [3]. در سنجش بیولومینسانس از ATP، D-لوسیفراز، لوسیفراز و بافر (Tris 50mM) استفاده شد. در این سنجش آنزیمی از واکنش برگشت ATPS، یعنی در جهت تولید ATP

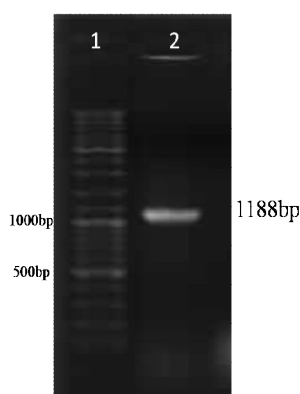
BL21 (DE3) به روش الکتروپوریشن ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط LB Agar حاوی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد داده شدند. کلونی‌های مثبت به‌وسیله کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی (T7 Promoter & Terminator) برای پلاسمید pET28a شناسایی شدند.

6-2- بیان پروتئین

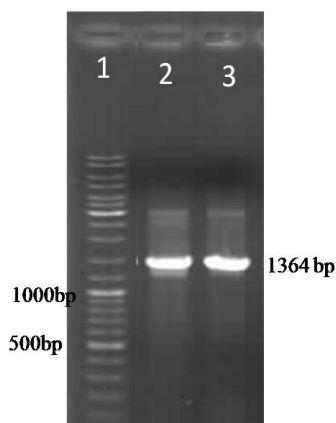
5 میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین به وسیله یکی از کلونی‌های ترانسفورم شده به‌وسیله پلاسمید نوترکیب pET28a/ATPS تلقیح و به مدت 16 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. سپس 10 میلی‌لیتر از محیط تازه LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک به‌وسیله 200 میکرو لیتر از کشت شبانه تلقیح و تا رسیدن به OD=0.6 در 37 درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. القای بیان پروتئین با اضافه کردن IPTG در غلظت نهایی یک میلی‌مولار صورت گرفت و در زمان‌های صفر، 1، 2 و 3 ساعت یک میلی‌لیتر از محیط کشت به ویال‌های 1.5 میلی‌لیتری جداگانه‌ای منتقل شد. سپس ویال‌ها در دور 8000rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های رسوب داده شده تا انجام مرحله بعد در دمای 20 °C - نگهداری شد. به منظور بررسی بیان پروتئین از روش SDS-page استفاده شد. برای لیز کردن سلول‌ها از روش سونیکیشن در 200 میکرولیتر از بافر (A) (Immidazole; 10mM, NaH₂PO₄; 50mM, NaCl;) (300mM, PH 8) استفاده شد. سلول‌ها بر اثر سونیک شدن لیز شدند و لیز سلولی نیز در دور 12000rpm به مدت 20 دقیقه در 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سوپ سلولی به ویال جدیدی منتقل و به رسوب نیز 200 میکرولیتر بافر A اضافه شد. برای ارزیابی بیان پروتئین و امکان محلول بودن پروتئین قسمت‌های مربوط به سوپ و پلیت

1. Qiagen
2. Bradford

(شکل 2). توالی ژن مورد نظر دارای 99% تشابه توالی نوکلئوتیدی و تشابه 100% در توالی پروتئینی با ژن ATPS پیش‌بینی شده از طریق بیوانفورماتیکی در باکتری *G. Kaustophilus* از سوش HTA426 در بانک ژن است.



شکل 1 نتایج PCR ژن ATPS بر روی ژل آگاروز یک درصد. ستون 1: نشانگر یک کیلو جفت‌بازی. ستون 2: محصول PCR



شکل 2 نتایج مربوط به Colony PCR به وسیله پرایمرهای عمومی وکتور pTZ57R (M13) بر روی باکتری‌های ترانسفورم شده با پلاسمید نوترکیب pTZ57R/ATPS. ستون 1: مارکر وزنی یک کیلو جفت‌بازی. ستون 2 و 3: محصول Colony PCR

3-3- بیان و تخلیص پروتئین

برای بیان پروتئین ژن ATPS به صورت نوترکیب قطعه حاوی ORF ژن در پلاسمید pET28a ساب کلون و سپس

(رابطه 1- الف)، برای تعیین فعال بودن آنزیم استفاده شد. واکنش در بافر تریس 50 میلی‌مولار با $pH = 7/8$ و دمای 37 درجه سانتی‌گراد انجام شد. حجم کل واکنش 0/2 میلی‌لیتر بوده و غلظت نهایی APS و PPI در واکنش 1 میلی‌مولار بود. ATP تولید شده به کمک واکنش جفت شده با لوسیفراز به صورت کمی اندازه‌گیری شد. در این واکنش پیرو فسفات مورد نیاز به عنوان سوسترای آنزیم ATPS با استفاده از واکنش هیدرو لیز ITP با آنزیم ITPase فراهم گردید (ITPase آنزیمی است که یکسری نوکلئوتیدهای سه فسفاته از جمله ITP را به PPI و IMP تجزیه می‌کند). در این تحقیق از لیزات گلوبول‌های قرمز به عنوان منبع ITPase استفاده شد.

3- نتایج

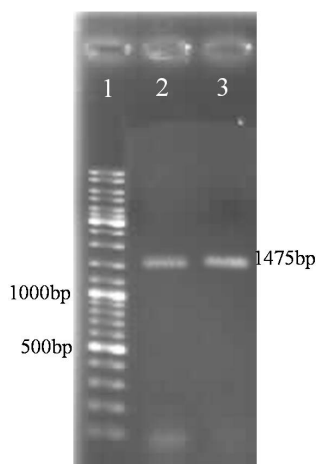
3-1- جداسازی باکتری

باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس از چشمه‌های آب گرم اردبیل جدا شد و به وسیله بررسی مولکولی روی 16s rRNA با پرایمرهای عمومی مشخص شد که این باکتری متعلق به سویه *Geobacillus Kaustophilus* و بسیار شبیه به سویه HTA426 است. باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس یک باکتری گرم مثبت و میله‌ای شکل است و به صورت هوازی و در محیط‌هایی با دمای بالا رشد می‌کند.

3-2- کلونینگ ژن ATPS

انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن ATPS بر روی DNA ژنومی باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس روی ژل آگاروز یک درصد فقط یک باند 1188 جفت‌بازی، که تقریباً هم‌اندازه ژن مورد نظر بود، را نشان داد (شکل 1). پس از کلون کردن قطعه حاصل در پلاسمید pTZ57R/T توالی آن به صورت دوطرفه تعیین و با استفاده از جستجوی Blast مشخص شده که قطعه کلون شده مربوط به ژن ATPS می‌باشد

4 نشان می‌دهد میانگین فعالیت پروتئین در زمانی که PPI به واکنش اضافه می‌شود بسیار بیشتر از زمانی است که واکنش فاقد PPI می‌باشد و این افزایش فعالیت در حدود 10 برابر از لحاظ آماری نیز معنی‌دار است.

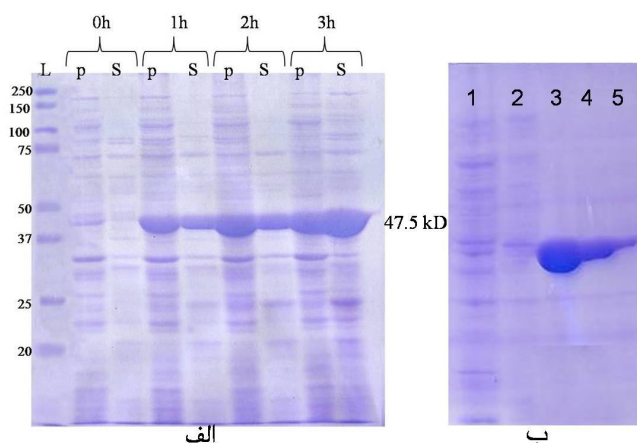


شکل 3 نتایج مربوط به Colony PCR با پرایمرهای پروموتور و ترمیناتور T7 در پلاسمید pET28a بر روی باکتری‌های ترانسفورم شده به وسیله پلاسمید نوترکیب pET28a-ATPS. ستون 1: مارکر وزنی DNA، ستون 2 و 3: محصول Colony PCR

به داخل باکتری اشریشیاکلی BL21(DE3) منتقل شد (شکل 3). بیان پروتئین نوترکیب به تولید پروتئین ATPS به صورت یک بانده 47/5 کیلو دالتونی در آنالیز SDS-PAGE منجر گردید (شکل 4-الف). با توجه به وجود فیوژن 6X His-tag در انتهای آمینی پروتئین نوترکیب، تخلیص با ستون Ni-NTA به تخلیص پروتئین مورد نظر با درجه خلوص بالا منتهی شد (شکل 4-ب).

3-4- فعالیت آنزیم

بررسی‌های مربوط به سنجش فعالیت پروتئین نوترکیب ATP سولفوریلاز نشان داد که پروتئین مورد نظر فعال است. سنجش فعالیت پروتئین نوترکیب ATP سولفوریلاز چندین بار انجام شد و در همه موارد پروتئین نوترکیب به طور معنی‌داری نسبت به حالت کنترل منفی فعالیت بالاتری را نشان داد ($P < 0/05$) (شکل 5). کنترل منفی در این سنجش‌ها واکنشی بود که یکی از سوبستراهای آنزیم ATP سولفوریلاز یعنی PPI به آن اضافه نمی‌شد. جدول

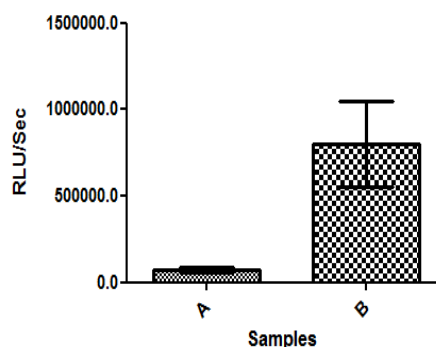


شکل 4 نتایج بیان (الف) و تخلیص پروتئین (ب) بر روی ژل SDS-PAGE. (الف) رسوب و سوپ مربوط به سلول‌های لیز شده در زمان‌های صفر، 1، 2 و 3 ساعت به صورت پشت سرهم روی ژل برده شده‌اند. پروتئین ATPS هم در سوپ و هم در رسوب دیده می‌شود. L: مارکر وزنی پروتئین، P: رسوب مربوط به سلول‌های لیز شده، S: سوپ مربوط به سلول‌های لیز شده. (ب) ستون‌های 1 و 2 مربوط به خروجی بافر شستشو (B) بعد از حجم‌های یک و دو برابر ستون Ni-NTA، ستون‌های 3، 4 و 5 نیز مربوط به خروجی بافر جدا کننده‌اند.

مورد استفاده قرار گرفته است. در این ارتباط می توان به توالی یابی DNA به روش پائروسکونسینگ [14] و آشکار سازی باکتری ها [10] اشاره کرد. اکنون تنها آنزیم تجاری مربوط به ATP سولفوریلاز از منبع مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) از شرکت سیگما می باشد و همچنین آنزیم پس از حل شدن دارای پایداری خیلی کمی در آزمایشگاه و در محلول حاوی گلیسرول است. این موضوع استفاده از آنزیم تجاری موجود را در بسیاری از آزمایشگاه ها محدود کرده است. تحقیق نگارندگان بر روی پروتئین نوترکیب تولید شده نشان داد که آنزیم نوترکیب تولید شده با وجود نگهداری دراز مدت پروتئین خالص در حضور گلیسرول 10% و در دمای منفی 20 درجه سانتی گراد، همچنان فعالیت خود را تا حدود یک ماه پس از خالص سازی حفظ می کند. این امر بیانگر پایداری بالای پروتئین نوترکیب تولید شده از سوش ایرانی در مقایسه با نوع تجاری موجود است که لازم است مطالعات کامل تری در آینده روی آن صورت گیرد.

مقایسه توالی پروتئین نوترکیب ATP سولفوریلاز از سوش ایرانی با نوع مخمری نشان داد با وجود اینکه این دو پروتئین شباهت توالی بسیار پایینی دارند (38%) ولی در هر دو پروتئین موتیف QxRNxxHxxH که در جایگاه فعال آنزیم قرار دارد، حفاظت شده است. بررسی های بیوانفورماتیکی نشان داد که این موتیف در بیشتر پروتئین های ATP سولفوریلاز حفاظت شده است. مشخص شده است در ساختار سه بعدی پروتئین اسید آمینه های این موتیف تشکیل حفره ای را می دهند که سویسترا در وسط آن قرار می گیرد [6].

هدف از مطالعه حاضر، تولید پروتئین نوترکیب ATP سولفوریلاز از یک منبع باکتریایی بود. به این دلیل که آنزیم بتواند به مدت زیادی پایداری خود را حفظ کند، باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس که از چشمه های آب گرم اردبیل جدا شده بود به عنوان سوش مورد نظر



شکل 5 نتایج مربوط به فعالیت پروتئین نوترکیب ATP سولفوریلاز. ستون A: کنترل منفی، ستون B: فعالیت پروتئین نوترکیب

جدول 4 نتایج مربوط به اندازه گیری فعالیت آنزیم ATP سولفوریلاز نوترکیب. گروه کنترل منفی فاقد سویسترای PPI مورد نیاز برای فعالیت آنزیم بود. فعالیت آنزیم بر حسب $RLU \cdot Sec^{-1}$ محاسبه شده است

ردیف	نمونه	کنترل منفی
1	$4/6 \times 10^5$	$1/15 \times 10^5$
2	$3/7 \times 10^5$	$4/5 \times 10^4$
3	$4/9 \times 10^5$	4×10^4
4	$1/7 \times 10^6$	$7/95 \times 10^4$
5	$9/87 \times 10^5$	$9/3 \times 10^4$
میانگین	$8/04 \times 10^5$	$7/45 \times 10^4$

4- بحث

در این تحقیق نتایج مربوط به کلون و بیان ژن آنزیم ATP سولفوریلاز از یک سوش باکتری ایرانی که از چشمه آب گرم در اردبیل جدا شده بود، ارائه شده است. با توجه به عملکرد آنزیم به نظر می رسد این آنزیم دارای کاربردهای متنوعی در زمینه زیست فناوری، صنعت، آزمایشگاه و زیست شناسی باشد. با توجه به اینکه تعادل آنزیم ATP سولفوریلاز در جهت تولید ATP است [18]، بنابراین از این آنزیم در آزمایش های مختلفی که طی واکنش آنها پیروفسفات تولید می شود برای اندازه گیری پیروفسفات

5- نتیجه گیری

در این تحقیق ژن ATPS از باکتری ژئوباسیلوس کواستافیلوس HTA426 با موفقیت در حامل کلونینگ pTZ57R کلون و در حامل بیانی pET28a نیز ساب کلون شد. پروتئین نوترکیب نیز به مقدار زیادی و بیشتر به صورت محلول بیان شد. پروتئین نوترکیب تولید شده دارای فعالیت آنزیمی است.

6- تشکر و قدردانی

این تحقیق با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

6- منابع

- [1] Patron N.J., Durnford D.G., Kopriva S. (2008). Sulfate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers. *BMC Evol Biol*, 8, p. 39.
- [2] Kurima K., Warman M.L., Krishnan S., Domowicz M., Krueger R.C., Deyrup A., Schwartz N.B. (1998). A member of a family of sulfate-activating enzymes causes murine brachymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, pp. 8681-8685.
- [3] Karamohamed S., Nilsson J., Nourizad K., Ronaghi M., Pettersson B., Nyrén P. (1999). Production, Purification, and Luminometric Analysis of Recombinant Saccharomyces cerevisiae MET3 Adenosine Triphosphate Sulfurylase Expressed in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification*, 15, pp. 381-388.
- [4] Ullrich T.C., Blaesse M., Huber R. (2001). Crystal structure of ATP sulfurylase from Saccharomyces cerevisiae, a key enzyme in sulfate activation. *EMBO J.*, 20, pp. 316-329.
- [5] Sperling D., Kappler U., Wynen A., Dahl C., Trüper H.G. (1998). Dissimilatory ATP sulfurylase from the hyperthermophilic sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* belongs to the group of homo-oligomeric ATP sulfurylases. *FEMS Microbiology Letters*, 162, pp. 257-264.
- [6] Yu Z., Lansdon E.B., Segel I.H., Fisher

انتخاب شد.

نتیجه بیان ژن ATPS کلون شده در حامل بیانی pET28a تولید پروتئین نوترکیب ATPS بود این پروتئین بر روی ژل SDS-PAGE مربوط به باکتری‌های القا شده، خود را به صورت باندهای 47/5 کیلو دالتونی نشان داد و همچنین بیشتر پروتئین تولید شده به صورت محلول در سوپ باکتری بود. این داده‌ها نشان داد که این سیستم، میزبان مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب ATPS است.

نتایج فعلی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فقط برای بررسی فعال بودن یا نبودن آنزیم بود و آزمایش‌ها انجام شده نشان داد که پروتئین نوترکیب تولید شده دارای فعالیت است. در بررسی فعالیت پروتئین نوترکیب ATP سولفوریلاز از روش ITPase Assay برای اندازه‌گیری فعالیت پروتئین نوترکیب استفاده شد [19]. با این روش PPI تولید شده با ITPase به عنوان سوبسترای ATP سولفوریلاز استفاده شد و نشان داد که پروتئین نوترکیب دارای فعالیت است. در این روش از لیز گلوبول‌های قرمز به عنوان منبع ITPase استفاده شد و با اضافه کردن ITP پیروفسفات مورد نیاز برای واکنش ATP سولفوریلاز به وسیله ITPase تولید شد. با وجود این وقتی PPI خریداری شده به جای ITP به لیز گلوبول‌های قرمز اضافه شد، مشخص شد آنزیم دارای فعالیت معنی‌داری است. این فرض بیانگر آن است که ATP سولفوریلاز نوترکیب احتمالاً نیازمند کوفاکتوری است که در لیز گلوبول‌های قرمز یافت می‌شود؛ این در حالی است که پروتئین مخمر نیازی به فاکتور اضافی ندارد. این امر در مقایسه با شرایط پروتئین ATP سولفوریلاز مخمری نکته مناسبی به نظر نمی‌رسد، اما لازم است تا در آینده روی این پروتئین برای پیدا کردن شرایط فعالیت بهینه، پارامترهای کینتیکی و همچنین کوفاکتور مورد نیاز آن مطالعات کاملتری انجام شود.

- regeneration from AMP and pyrophosphate for luminescence detection of bacteria. *Anal Biochem*, 418, pp. 19-23.
- [13] Nyren P., Nore B.F., Baltscheffsky M. (1986). Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate formation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim Biophys Acta*, 851, pp. 276-282.
- [14] Nyrén P., Lundin A. (1985). Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Analytical Biochemistry*, 151, pp. 504-509.
- [15] Agah A., Aghajan M., Mashayekhi F., Amini S., Davis R.W., Plummer J.D., Ronaghi M., Griffin P.B. (2004). A multi-enzyme model for pyrosequencing. *Nucleic Acids Research*, 32:e166.
- [16] Wu H., Wu W., Chen Z., Wang W., Zhou G., Kajiyama T., Kambara H. (2011). Highly Sensitive Pyrosequencing Based on the Capture of Free Adenosine 5' Phosphosulfate with Adenosine Triphosphate Sulfurylase. *Analytical Chemistry*, 83, pp. 3600-3605.
- [17] Karamohamed S., Nyrén P. (1999). Real-Time Detection and Quantification of Adenosine Triphosphate Sulfurylase Activity by a Bioluminometric Approach. *Analytical Biochemistry*, 271, pp. 81-85.
- [18] Robbins, W. P., Lipmann F. (2008). Enzymatic synthesis of adenosine-59-phosphosulfate. *J Biol Chem* 1958, 233, pp. 686-690.
- [19] Hassannia B., Behmanesh M., Hoseinkhani S., Danaee Y., Sadeghizadeh M., Nakabeppu Y., A new and rapid sensitive luciferase-based method for evaluating the activity of ITPase enzyme. *Journal of Biotechnology*, 136, Supplement: S632.
- A.J. (2007). Crystal Structure of the Bifunctional ATP Sulfurylase – APS kinase from the Chemolithotrophic Thermophile *Aquifex aeolicus*. *Journal of Molecular Biology*, 365, pp. 732-743.
- [7] Gavel O.Y., Kladova A.V., Bursakov S.A., Dias J.M., Texeira S., Shnyrov V.L., Moura J.J.G, Moura I, Romao MJ, Trincao J. (2008). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of adenosine triphosphate sulfurylase (ATPS) from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Acta Crystallographica Section F*, 64, pp. 593-595.
- [8] Farley J.R., Mayer S., Chandler C.J., Segel I.H. (1979). ATP Sulfurylase from *Penicillium chrysogenum*: Is the Internal Level of the Enzyme Sufficient to Account for the Rate of Sulfate Utilization? *J. Bacteriol*, 137, pp. 350-356.
- [9] Gay S.C., Fribourgh J.L., Donohou P.D., Segel I.H., Fisher A.J. (2009). Kinetic properties of ATP sulfurylase and APS kinase from *Thiobacillus denitrificans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 489, pp. 110-117.
- [10] Laue B.E., Nelson D.C. (1994). Characterization of the gene encoding the autotrophic ATP sulfurylase from the bacterial endosymbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *J Bacteriol*, 176, pp. 3723-3729.
- [11] Hanna E, MacRae I.J., Medina D.C., Fisher A.J., Segel I.H. (2002). ATP sulfurylase from the hyperthermophilic chemolithotroph *Aquifex aeolicus*. *Arch Biochem Biophys*, 406, pp. 275-288.
- [12] Hui-Ju L., Min-Rong H., Chih-Sian T., Ching-Yi H., Meng-Shun H., Hwei-Ling P., Hwan-You C. (2011). Exponential ATP amplification through simultaneous