ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):339-345

Increasing Thermal Stability of Saccharomyces cerevisiae Recombinant Protein Invertase by Site-directed Mutagenesis

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Arjmand S.[1] *PhD*,
Ghobadi L.[1] *MSc*,
Ranaei-Siadat S.O.*[1] *PhD*,
Sefidbakht Y.[1] *PhD*,
Farzaneh F.[1] *MSc*

How to cite this article
Arjmand S, Ghobadi L, Ranaei-Siadat S.O, Sefidbakht Y, Farzaneh F. Increasing Thermal Stability of Saccharomyces cerevisiae Recombinant Protein Invertase by Site-directed Mutagenesis. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):339-345.

ABSTRACT

Aims Invertase is an enzyme that is widely used in industries. The main source of industrial production of invertase is yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Increasing thermal stability makes an important contribution to improving productivity in related production. The aim of this study was increasing thermal stability of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant protein invertase by site-directed mutagenesis.

Materials & Methods In the present experimental study, using invertase enzyme from thermophilic bacteria, *Thermotoga maritima* as template, it was decided to replace the threonine 345 and asparagine 349 amino acid with alanine, using site-directed mutagenesis and in *Pichia pastoris*, cloning was performed with the SOEing polymerase chain reaction. The activity of natural and mutant recombinant invertase enzymes at different temperatures, different pHs, stability duration, and thermal-performance stability, and Michaelis–Menten kinetics were drawn.

Findings The thermal-structural stability of the natural and mutant invertease enzymes at 55°C showed that the mutant enzyme had a higher thermal stability at 55°C compared with the natural enzyme. Both natural and mutant enzymes exhibited a similar trend in functional stability. Reduction of K_m and increase of Vmax in sucrose substrate and 5-fold increase in K_{cat}/K_m ratio of mutant enzyme was observed.

Conclusion Site-directed mutagenesis has no negative effect on the amount of production as well as the secretion of recombinant protein invertase and increases enzyme activity. The mutant enzyme has a higher structural stability than the natural enzyme without altering its functional stability.

Keywords Invertase; Pichia pastoris; Thermal stability; Site-Directed Mutagenesis

Archive

CITATION LINKS

[1] Invertase and its applications - a brief review [2] Subunit structure of external invertase from Saccharomyces cerevisiae [3] Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene [4] Enzyme technology [5] Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system [6] pastoris expression system [7] Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung [8] Mutational analysis of betaCOP (Sec26p) identifies an appendage domain critical for function [9] Electroporation of Pichia pastoris [10] Expression of endoglucanases in Pichia pastoris under control of the GAP promoter [11] A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [12] Silver staining of proteins in polyacrylamide gels [13] Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining [14] Developments in industrially important thermostable enzymes: A review [15] Thermostable enzymes for industrial applications [16] The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from Thermotoga maritima reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases

[1]Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. Postal code: 1983969411
Phone: +98 (21) 22431782
Fax: +98 (21) 22434500
o_ranaei@sbu.ac.ir

Article History
Received: June 17, 2016
Accepted: December 7, 2016
ePublished: September 22, 2018

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

افزایش پایداری حرارتی پروتئین نوترکیب اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* با ایجاد جهش‌های هدفمند

ساره ارجمند PhD
مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
لیلا قبادی MSc
مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
سیدامید رعنایی‌سیادت* PhD
مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
یحیی سفیدبخت PhD
مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
فاطمه فرزانه MSc
مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده
اهداف: اینورتاز آنزیمی است که به‌صورت گسترده در صنایع مورد استفاده قرار می‌گیرد. منبع اصلی تولید صنعتی آنزیم اینورتاز مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* است. افزایش پایداری حرارتی در این آنزیم کمک مهمی به افزایش بهره‌وری در تولید مربوطه خواهد کرد. هدف پژوهش حاضر افزایش پایداری حرارتی پروتئین نوترکیب اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* با ایجاد جهش‌های هدفمند بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، با الگوقراردادن آنزیم اینورتاز باکتری گرمادوست *ترماتوگا ماریتیما* به‌منظور افزایش پایداری حرارتی، اسیدآمینه‌های ترئونین ۳۴۵ و آسپارژین ۳۴۹ در ژن پروتئین اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* با روش جهش‌زایی هدفمند با آلانین جایگزین و در مخمر *پیکیا پاستوریس* همسانه‌سازی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز SOEing انجام شد. فعالیت آنزیم‌های نوترکیب اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته در دماهای مختلف، pHهای مختلف، مدت‌زمان پایداری و پایداری حرارتی- عملکردی اندازه‌گیری و نمودار میکائیلیس- منتن رسم شد.
یافته‌ها: پایداری حرارتی- ساختاری آنزیم‌های طبیعی و جهش‌یافته اینورتاز در دمای ۵۵°C نشان داد که آنزیم جهش‌یافته در دمای ۵۵°C نسبت به آنزیم طبیعی پایدرای حرارتی بالاتری داشت. هر دو آنزیم طبیعی و جهش‌یافته در پایداری عملکردی روند مشابهی را نشان دادند. کاهش K_m و افزایش V_{max} در سوبسترای ساکاروز و افزایش ۵برابری نسبت K_{cat}/K_m در آنزیم جهش‌یافته دیده شد.
نتیجه‌گیری: جهش‌های هدفمند اعمال‌شده هیچ اثر منفی روی میزان تولید و همچنین ترشح پروتئین نوترکیب اینورتاز ندارد و باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شود. آنزیم جهش‌یافته نسبت به آنزیم طبیعی، پایداری ساختاری بالاتری دارد، بدون این که تغییری در پایداری عملکردی آن ایجاد کند.
کلیدواژه‌ها: اینورتاز، پیکیا پاستوریس، پایداری حرارتی، جهش‌زایی هدفمند

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۱۷
*نویسنده مسئول: o_ranaei@sbu.ac.ir

مقدمه

اینورتاز یکی از آنزیم‌های متعلق به خانواده گلیکوزیل‌هیدرولازها است که سوکروز را به D- گلوکز و D- فروکتوز تبدیل می‌نمایند. سوبسترای اختصاصی این آنزیم، سوکروز بوده اما محدوده اثر وسیع اینورتاز و انواع سوبستراهای طبیعی آن باعث شده است تا در چند دهه اخیر استفاده صنعتی این آنزیم مورد توجه قرار بگیرد[1]. یکی از مهم‌ترین کاربردهای آنزیم اینورتاز، استفاده از آن در هیدرولیز قندها به‌جای استفاده از روش‌های شیمیایی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، داروسازی، صنعت شیرینی‌پزی، نانوایی، تولید شکلات و همچنین تولید بیواتانول صنعتی است. غیرسمی‌بودن و تجزیه‌پذیربودن آنزیم می‌تواند منجر به افزایش کیفیت و کمیت محصولات، کاهش محصولات جانبی و تسهیل روش‌های خالص‌سازی شود.

آنزیم اینورتاز به‌طور گسترده در طبیعت توسط میکروارگانیزم‌های مختلف تولید می‌شود، اما به‌طور معمول سویه تجاری رایج مورد استفاده در صنعت از *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) که مخمر نانوایی نامیده می‌شود، استخراج می‌شود[1]. این مخمر اینورتازهای داخل‌سلولی و خارج‌سلولی تولید می‌کند[2]. نوع خارج‌سلولی، یک پروتئین پری‌پلاسمیک گلیکوزیله و نوع دیگر، یک پروتئین سیتوزولی غیرگلیکوزیله است[3]. مشخص شده است که هر دوی این آنزیم‌ها توسط ایزوفرم‌های مختلف یک ژن (*suc2*) کد می‌شوند[3, 4]. براساس میزان بیان، نوع پری‌پلاسمیک، بیشتر و قابل توجه‌تر بوده و از نظر تولید و استفاده در صنعت رایج‌تر است[3]. به‌منظور افزایش میزان تولید این آنزیم برای کاهش هزینه‌های متعاقب می‌توان از روش‌های تولید نوترکیب در میزبان‌هایی با کارآیی بالا استفاده کرد. همچنین با توجه به نیاز هر صنعت می‌توان از مهندسی ژنتیک به‌منظور تغییر ساختار و خصوصیات این پروتئین بهره برد.

مخمر متیلوتروف *پیکیا پاستوریس* (*Pichia pastoris*)، یک سیستم بسیار موفق برای تولید انواع گوناگونی از پروتئین‌های هترولوگ است. از سال ۱۹۸۴ تاکنون، از *پیکیا پاستوریس* برای تولید نزدیک به ۳۰۰ پروتئین خارجی استفاده شده است. این مخمر به‌صورت یک مخمر متیل‌دوست، قابلیت متابولیزه‌کردن متانول را به‌عنوان یک منبع کربن منحصربه‌فرد دارد. چند عامل در به‌کارگیری فراگیر *پیکیا پاستوریس* نقش داشته‌اند که از جمله می‌توان به استفاده از پروموتر بسیار قوی و قابل تنظیم الکل‌اکسیداز ۱ (AOX1)، توانایی بالا در پذیرش پایدار یک یا چندین نسخه از پلاسمیدهای بیانی در مکان‌های اختصاصی ژنوم و توانایی رشد تا چگالی‌های بسیار بالا در فرمانتور اشاره کرد[5, 6].

از آنجایی که یکی از معیارهای اصلی در به‌کارگیری اینورتاز در صنایع غذایی، پایداری حرارتی در مراحل مختلف صنعتی است و با توجه به این اصل که افزایش هر ۱۰°C دما در فرآیندهای صنعتی، میزان انجام واکنش را تا ۲برابر افزایش می‌دهد، مسلماً آنزیمی با پایداری حرارتی بالا می‌تواند بازده بالاتری از تولید محصول داشته باشد[7]. یکی از اینورتازهایی که از نظر ساختار و توالی بیشترین شباهت را به اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* دارد، اینورتاز باکتری *ترماتوگا ماریتیما* (*Thermotoga maritima*) است. این باکتری در چشمه‌های آب گرم زندگی می‌کند و دمای بهینه برای رشد آن ۸۰°C است. از جمله تفاوت‌هایی که در ساختار اینورتاز این باکتری مشاهده می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل افزایش پایداری دمایی این پروتئین باشد، وجود یک ساختار هلیکال کوتاه در توالی رابط بین دو دومین اینورتاز است. استراتژی تحقیق حاضر تغییر اسیدآمینه‌های ترئونین ۳۴۵ و آسپارژین ۳۴۹ به آلانین، برای ایجاد یک موتیف AXXXA در جایگاه ۳۴۴ تا ۳۴۹ توالی رابط دو دامنه در اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* بود. مطابق تحقیقات، موتیف AXXXA یک القاکننده و تقویت‌کننده ساختار آلفاهلیکس بوده که با فراوانی بالا در پروتئین‌های گرمادوست مشاهده شده است و باعث ایجاد پایداری در موقعیت تاخوردگی پروتئین می‌شود[8].

در این پژوهش، تغییر ساختار اینورتاز مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* با استفاده از الگوی ساختاری اینورتاز *ترماتوگا ماریتیما* به‌منظور افزایش پایداری حرارتی این آنزیم مد نظر بود. میزبان مخمری *پیکیا پاستوریس* برای بیان نوترکیب هر دو اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته استفاده شد. بنابر مطالب ذکرشده، هدف پژوهش حاضر افزایش پایداری حرارتی پروتئین نوترکیب اینورتاز

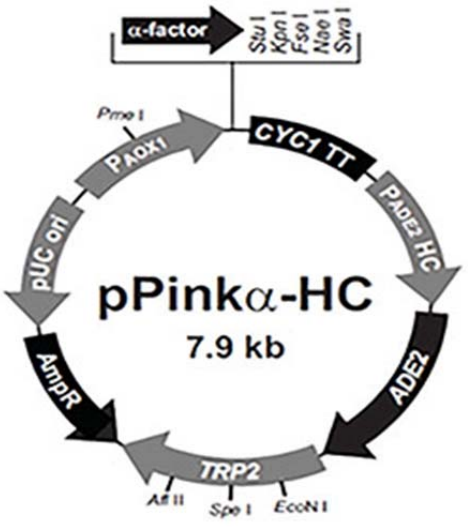
Archive of SID
www.SID.ir

ساکارومایسس سرویزیه با ایجاد جهش‌های هدفمند بود.

مواد و روش‌ها

مدل‌سازی پروتئین اینورتاز: در پژوهش تجربی حاضر، به‌منظور تایید اولیه جهش‌های انتخاب‌شده برای ایجاد تغییر ساختاری مد نظر، ساختار سه‌بُعدی پروتئین طبیعی و جهش‌یافته اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* با استفاده از نرم‌افزار Modeller 9.14 تعیین شد. این نرم‌افزار با کمک ساختار الگو، چندین مدل از آنزیم جهش‌یافته را پیشنهاد می‌کند. در نتیجه، ۱۰۰ مدل مختلف به دست آمد و بهترین مدل براساس کمترین میزان انرژی، انتخاب و برای مقایسه بهتر محل جهش هر دو ساختار بر هم منطبق شدند.

وکتورها و سازه ژنی مورد استفاده: برای بیان ژن اینورتاز در مخمر *پیکیا پاستوریس* از وکتور بیانی pPinkα-HC استفاده شد (شکل ۱). ژن اینورتاز طبیعی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بدون توالی راهنما و با ترجیح کدونی مربوط به مخمر *پیکیا پاستوریس* طراحی و سنتز (GeneArt؛ آلمان) شد. به‌منظور تسهیل همسانه‌سازی، جایگاه‌های برشی مناسب (*Xho*I و *Kpn*I) در دو انتهای قطعه سنتزی تعبیه شدند.



شکل ۱) نقشه وکتور بیانی pPinkα-HC

همسانه‌سازی ژن اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته: برای ایجاد جهش‌های مد نظر در پروتئین اینورتاز، تغییرات مربوطه در سطح ژن با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز SOEing (SOEing PCR) انجام گرفت. بدین منظور با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 دو جفت پرایمر شامل دو پرایمر مربوط به نواحی ایجاد جهش طراحی شد (جدول ۱).

به‌منظور ایجاد جهش در ژن اینورتاز، سه واکنش مجزای PCR صورت گرفت (جدول ۲). در ابتدا دو واکنش مجزای جهش‌زا انجام شد که منجر به تکثیر قطعه ابتدایی (۱۰۲۶جفت‌باز) و انتهایی (۶۸۰جفت‌باز) ژن اینورتاز حامل جهش مورد نظر شد که این دو قطعه در محل جهش با یکدیگر همپوشانی داشتند. در مرحله بعد محصول دو واکنش PCR پس از بازیابی از روی ژل آگارز توسط کیت بازیابی محصولات PCR (سیناکلون؛ ایران) به‌عنوان رشته‌های الگو در واکنش سوم PCR (Overlap Extension PCR) مورد استفاده قرار گرفت. نواحی دارای همپوشانی این دو قطعه در چرخه‌های اولیه واکنش به‌عنوان پرایمر عمل کرد و منجر به ایجاد طول کامل ژن اینورتاز ۱۶۸۷جفت‌باز شد که جهش مورد نظر را نیز در بر داشت.

جدول ۱) توالی پرایمرهای طراحی‌شده

پرایمر	توالی	دما (°C)
F-INV	GCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAG	۶۳
R-INV TN/AA	CAAGGCGATCAATTCAGCTTCTGGGTTAG	۶۱/۵
F-INV TN/AA	AGCTGAATTGATCGCCTTGAAGGCTGAAC	۶۱/۵
R-INV	AGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGAC	۶۱

جدول ۲) واکنش‌های PCR انجام‌شده برای جهش‌زایی هدفمند ژن اینورتاز

واکنش	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	الگو	طول محصول PCR (جفت‌باز)
واکنش جهش‌زای اول PCR	F-INV	R-INV TN/AA	pPINKα-HC-Invertase plasmid	۱۰۲۶
واکنش جهش‌زای دوم PCR	F-INV TN/AA	R-INV	pPINKα-HC-Invertase plasmid	۶۸۰
واکنش سوم PCR	F-INV	R-INV	Invertase mutated fragment 1 and 2	۱۶۸۷

به‌منظور همسانه‌سازی سازه سنتزی مربوط به توالی طبیعی ژن اینورتاز و همچنین محصول PCR سوم یا قطعه اینورتاز جهش‌یافته به طول ۱۶۸۷جفت‌باز در وکتور pPINKα-HC، از جایگاه‌های برشی *Xho*I و *Kpn*I که در دو انتهای ژن تعبیه شده بود، استفاده شد. بدین منظور وکتور pPINKα-HC و قطعه اینورتاز خالص‌سازی‌شده تحت برش آنزیمی دوگانه با استفاده از آنزیم‌های *Xho*I و *Kpn*I قرار گرفت و پس از انجام واکنش اتصال با لیگاز T4 در باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) سویه DH5α همسانه‌سازی شد. بدین صورت توالی ژن اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته در پلاسمید مخمری pPINKα-HC (Invitrogen؛ ایالات متحده) در پایین‌دست پروموتور AOX1 و پس از توالی راهنمای αMF (مربوط به ژن αMF مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*) قرار داده شد.

برای بررسی صحت همسانه‌سازی پلاسمید بیانی نوترکیب حاوی ژن جهش‌یافته اینورتاز روی کلنی‌های انتخاب‌شده آزمایش کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای F-INV TN/AA و R-INV و DNA الگوی مربوط به پلاسمیدهای نوترکیب، انتخاب و همچنین هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از *Xho*I و *Kpn*I انجام شد.

انتقال وکتور بیانی به میزبان مخمری *پیکیا پاستوریس* با استفاده از روش شوک الکتریکی (الکتروپوریشن) و مطابق دستورالعمل (Invitrogen؛ ایالات متحده) انجام گرفت[9]. به‌طور خلاصه سلول‌های مخمری مستعد تهیه شد و وکتور نوترکیب حاوی ژن جهش‌یافته اینورتاز با استفاده از آنزیم برشی *Bspt*I به شکل خطی در آمد و با الکتروپوریشن توسط دستگاه الکتروپوریتور ECM630 (BTX؛ ایالات متحده) و تحت جریان ۱۸۰۰ولت، ۲۰۰آمپر و مقاومت ۲۵اهم به میزبان بیانی مستعد *پیکیا پاستوریس* سویه GS115 منتقل شد. کلون‌های مثبت براساس رشد روی محیط افتراقی فاقد آدنین پیکیا (PAD) و رنگ سفید کلونی انتخاب شدند. برای تایید حضور ژن جهش‌یافته اینورتاز در ژنوم مخمری، روی DNA ژنومی استخراج‌شده از کلونی‌های نوترکیب به‌دست‌آمده، مجدداً آزمایش کلنی PCR با پرایمرهای F-INV TN/AA و R-INV انجام گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

برای تایید نهایی توالی‌های مربوط به ژن طبیعی و جهش‌یافته در ژنوم مخمر، پس از PCR روی ژنوم مخمرهای نوترکیب با پرایمرهای مربوط AOX1 (در بالادست و پایین‌دست جایگاه کلون‌کردن ژن)، نتایج PCR با پرایمرهای AOX1 برای توالی‌یابی (Macrogen؛ کره جنوبی) ارسال شدند.

بیان نوترکیب پروتئین اینورتاز: بیان سویه طبیعی و جهش‌یافته براساس دستورالعمل (Invitrogen؛ ایالات متحده) به‌ترتیب با محیط‌های کشت دارای گلیسرول (BMGY) برای رشد سلول‌های مخمری، حاوی متانول (BMMY) برای القای پروموتر AOX1 و بیان پروتئین نوترکیب اینورتاز انجام شد[10]. پس از چهار روز بیان در فلاسک، مایع رویی مربوط به کشت مخمرهای حاوی آنزیم طبیعی و جهش‌یافته با سانتریفیوژ دور ۳۰۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۵دقیقه و در دمای ۴°C از سلول‌های مخمری جدا شد. تعویض بافر و تغلیظ محیط اولترافیلتراسیون با استفاده از غشای 10KD (PALL؛ ایالات متحده) انجام و مقدار کلی پروتئین‌های محیط جداشده به روش برادفورد و با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) مطابق دستورالعمل سنجش شد[11]. جذب هر یک از نمونه‌ها با اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۵نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد تهیه و غلظت پروتئین در هر محیط محاسبه شد.

برای مشاهده باند مربوط به پروتئین نوترکیب اینورتاز، ۲۰میکرولیتر از هر نمونه مطابق دستورالعمل روی ژل سدیم‌دودسیل‌سولفات-الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (SDS-PAGE) بارگذاری و برای مشاهده باندهای پروتئینی، ژل با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد[12].

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اینورتاز: به‌منظور سنجش فعالیت آنزیم اینورتاز، سوبسترای اختصاصی آنزیم اینورتاز شامل سوکروز ۶% در بافر سدیم‌استات ۵۰میلی‌مولار با pH برابر با ۴/۷ تهیه شد. ۴۵۰میکرولیتر از سوبسترا، ۱۵میکرولیتر آب مقطر و ۳۵میکرولیتر از محیط رویی ۲۰بار رقیق‌شده، به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای ۶۰°C (دمای بهینه فعالیت آنزیم) قرار داده شد. برای خاتمه فعالیت آنزیم، ۱۰۰میکرولیتر هیدروکسیدسدیم ۶مولار به واکنش اضافه شد. پس از آن ۵۰۰میکرولیتر از محلول دنیتروسالیسیلیک‌اسید (DNS) اضافه و نمونه‌ها به‌مدت ۴-۲ثانیه، ورتکس و درون بن‌ماری با دمای ۱۰۰°C به‌مدت ۵دقیقه قرار داده شدند. پس از سردشدن تا دمای اتاق، میزان رنگ هر نمونه در چگالی نوری ۴۵۰نانومتر خوانده شد. محیط رویی مخمر فاقد ژن نوترکیب و همچنین محیط رویی مخمرهای نوترکیب حاوی ژن اینورتاز هر نمونه که قبل از استفاده به‌مدت ۱۰دقیقه برای غیرفعال‌کردن آنزیم جوشانده شده بود، به‌عنوان کنترل منفی استفاده شدند.

بررسی فعالیت آنزیم در دماهای متفاوت: فعالیت آنزیم‌های نوترکیب اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته در طیف دمایی بین ۳۵ تا ۹۰°C (۳۵، ۴۵، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰، ۸۵ و ۹۰°C) اندازه‌گیری شد. از محیط کشت مخمر غیرنوترکیب *پیکیا پاستوریس* به‌عنوان کنترل منفی استفاده و تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم در pHهای مختلف: فعالیت آنزیم اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته در طیف pH از ۳/۷ تا ۷/۵ اندازه‌گیری شد. برای تهیه pH برابر با ۳/۷، ۴/۶ و ۵/۶ از بافر سدیم‌استات ۵۰میلی‌مولار و pH برابر ۶ و ۷/۵ از بافر سدیم فسفات ۵۰میلی‌مولار استفاده و تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

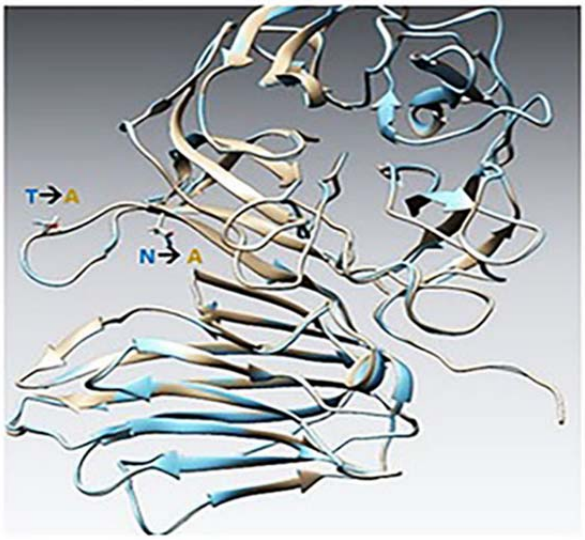
بررسی پایداری حرارتی- ساختاری آنزیم: پس از سنجش فعالیت آنزیم‌های نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته در دماهای مختلف و تعیین محدوده دمای بهینه، مدت‌زمان پایداری فعالیت آنزیم به‌مدت ۸۰دقیقه و در فواصل زمانی ۱۰دقیقه، در دمای بهینه اندازه‌گیری شد. به این منظور آنزیم‌ها در مدت‌زمان ذکرشده در دو دمای ۵۵ و ۶۵°C انکوبه شدند. قبل از هر سنجش نمونه‌ها به‌مدت ۱۰دقیقه روی یخ قرار گرفتند و سپس فعالیت مطابق روش ذکرشده و با اضافه‌کردن سوبسترا اندازه‌گیری شد.

بررسی پایداری حرارتی- عملکردی آنزیم: بررسی پایداری حرارتی-عملکردی در دمای ۶۵°C انجام شد. به این منظور محلول سوبسترا به‌مدت ۵دقیقه در دمای ۶۵°C انکوبه شد و سپس آنزیم‌های طبیعی و نوترکیب به‌صورت جداگانه به ویال‌های حاوی سوبسترا اضافه شدند. سنجش فعالیت آنزیم به‌مدت ۴۵دقیقه و در فواصل زمانی مختلف در دمای ذکرشده اندازه‌گیری شد.

رسم نمودار میکائیلیس- منتن: برای رسم نمودار میکائیلیس-منتن و محاسبه مقادیر ضریب ثابت آنزیمی (K_m)، حداکثر سرعت واکنش (V_{max})، ثابت کاتالیتیک (K_{cat}) و فعالیت مقدار ثابت آنزیم در مقادیر متفاوت سوبسترا اندازه‌گیری و غلظت‌های سوبسترا از ۱۵ تا ۴۵۰ میکرومولار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شدند.

یافته‌ها

در مدل‌سازی، جهش‌های اعمال‌شده در موقعیت‌های شماره ۳۴۵ (ترئونین) و ۳۴۹ (آسپارژین) در لوپ قرارگرفته بین دو دومین مشخص شدند. در هر دو جهش، اسیدآمینه آلانین جایگزین و ساختار طبیعی و جهش‌یافته به‌ترتیب با رنگ‌های آبی و کرم نشان داده شد (شکل ۲).



شکل ۲) برهم‌نهی ساختارهای ریبونی آنزیم اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته. موقعیت جهش‌ها در شکل نشان داده شده است

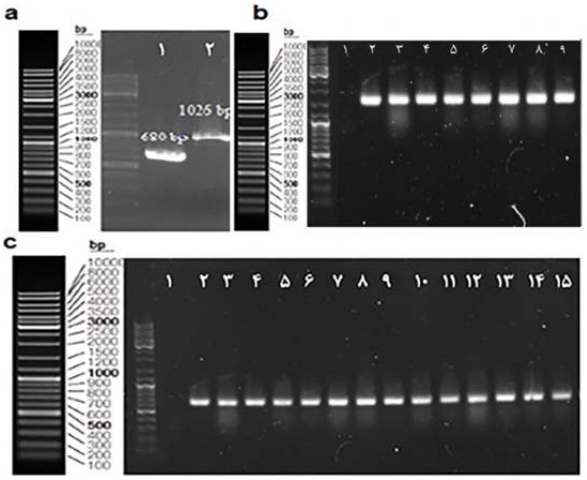
همسانه‌سازی ژن نوترکیب اینورتاز در ژنوم مخمری: نتایج حاصل از دو واکنش مجزای جهش‌زا منجر به تکثیر قطعه ابتدایی (۱۰۲۶جفت‌باز) و انتهایی (۶۸۰جفت‌باز) ژن اینورتاز حامل جهش مورد نظر شد (شکل ۳- a). اتصال دو توالی حاوی جهش، ساخت سازه نهایی (شکل ۳- b) و حضور توالی ژن نوترکیب اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته در ژنوم مخمر با استفاده از روش کلونی PCR تایید شد (شکل ۳- c). صحت توالی‌های همسانه‌سازی‌شده و ایجاد جهش‌های مورد نظر در ژنوم مخمر با توالی‌یابی تایید شد (نتایج نشان داده نشده است).

www.SID.ir

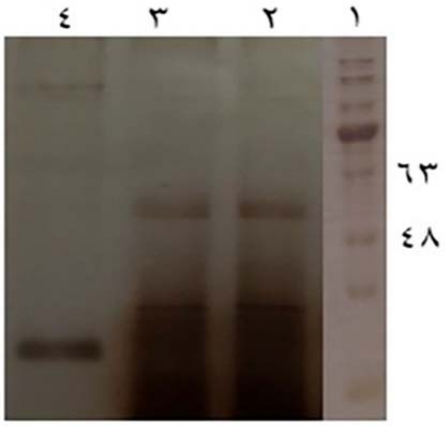
باند مربوط به پروتئین اینورتاز در محدوده 55KD قابل ملاحظه بود (شکل ۴). هر دو آنزیم اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته دارای بهینه فعالیت در دمای ۶۵°C بودند. (نمودار ۱).

هر دو آنزیم اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته دارای pH بهینه برابر با ۴/۶ بودند (نمودار ۲). پایداری حرارتی- ساختاری آنزیم‌های طبیعی و جهش‌یافته اینورتاز در دمای ۵۵°C نشان داد که آنزیم جهش‌یافته در دمای ۵۵°C نسبت به آنزیم طبیعی پایداری حرارتی بالاتری داشت (نمودار ۳). هر دو آنزیم طبیعی و جهش‌یافته در پایداری عملکردی روند مشابهی را نشان دادند (نمودار ۴).

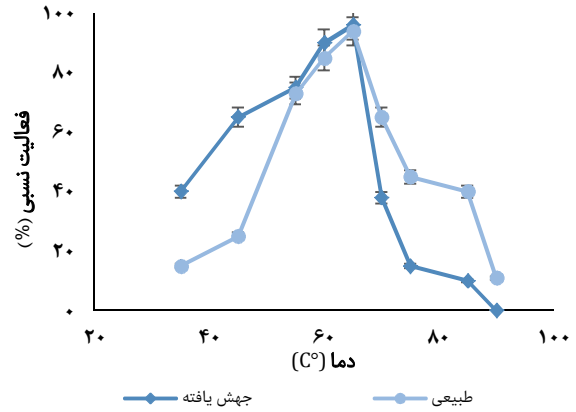
کینتیک آنزیم اینورتاز: کاهش K_m و افزایش V_{max} روی سوبسترای ساکاروز و افزایش ۵برابری نسبت K_{cat}/K_m در آنزیم جهش‌یافته دیده شد (جدول ۳؛ نمودار ۵).



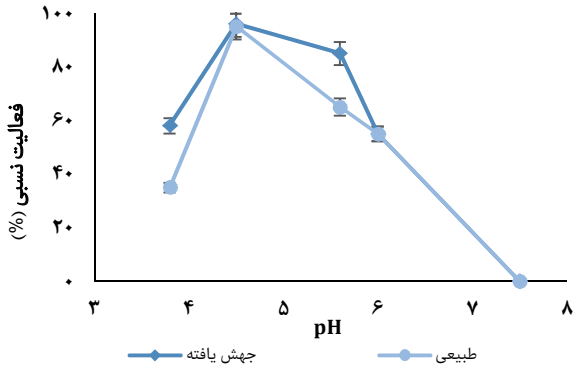
شکل ۳) باندهای مربوط به همسانه‌سازی ژن اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته روی ژل الکتروفورز. a) چاهک‌های ۱ و ۲ به‌ترتیب مربوط به قطعه ابتدایی و انتهایی ژن اینورتاز حامل جهش مورد نظر، اندازه باندها روی ژل قابل مشاهده هستند. b) چاهک ۱ نمونه کنترل منفی، چاهک ۲ نمونه کنترل مثبت مربوط به تکثیر ژن اینورتاز طبیعی همسانه‌سازی‌شده، چاهک شماره ۳ تا ۸ مربوط به ژن جهش‌یافته اینورتاز محصول اتصال قطعات حاوی جهش. c) چاهک ۱ نمونه کنترل منفی، چاهک‌های شماره ۲ تا ۱۵ مربوط به کلنی PCR نمونه‌های ژنوم نوترکیب مخمر پ. *پاستوریس* حاوی ژن طبیعی و جهش‌یافته اینورتاز



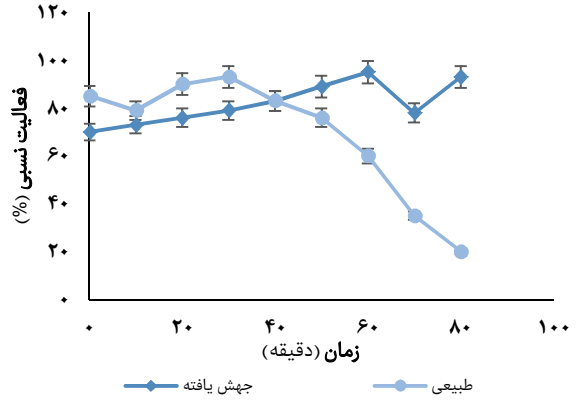
شکل ۴) ژل SDS-PAGE مربوط به محیط رویی مخمرهای نوترکیب بیان‌کننده اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته. چاهک شماره ۱ مربوط به مارکر پروتئینی است. چاهک شماره ۲ و ۳ مربوط به نمونه‌های اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته و چاهک شماره ۴ مربوط به نمونه مخمر غیرنوترکیب است. باند اینورتاز در محدوده ۵۵KD قابل ملاحظه است. در چاهک ۴ نمونه کنترل منفی (مخمر پیکیا پاستوریس بدون ژن اینورتاز) و در چاهک‌های ۲ و ۳ نمونه‌های مربوط به آنزیم اینورتاز طبیعی و جهش‌یافته به‌ترتیب بارگذاری شدند



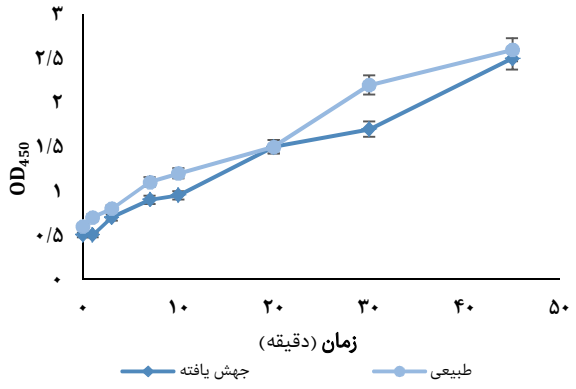
نمودار ۱) پروفایل دمایی اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته



نمودار ۲) پروفایل pH اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته

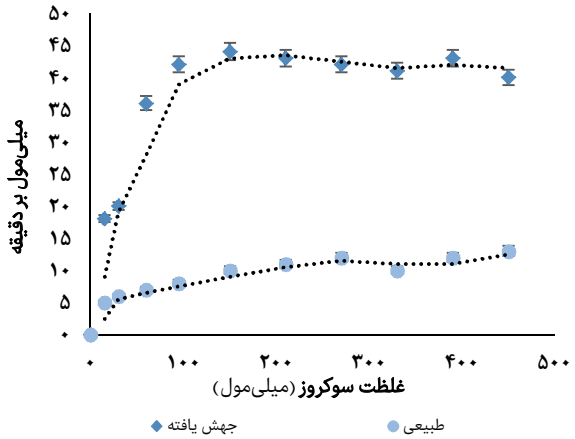


نمودار ۳) پایداری حرارتی- ساختاری آنزیم‌های اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته



نمودار ۴) پایداری حرارتی- عملکردی آنزیم‌های اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته

www.SID.ir



نمودار ۵) نمودار میکائلیس- منتن برای آنزیم‌های اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته

جدول ۳) داده‌های مربوط به کینتیک آنزیم اینورتاز نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته

اینورتاز	ضریب ثابت آنزیمی (K_m)	حداکثر سرعت واکنش (V_{max})	ثابت کاتالیتیک (K_{cat})	K_{cat}/K_m
اینورتاز طبیعی	۴۶/۱۸	۱۱/۰۶	۳۴	۰/۷۳
اینورتاز جهش‌یافته	۳۲/۵۳	۵۱/۴۶	۱۳۵/۷۴	۴/۱۷

بحث

پژوهش حاضر با هدف افزایش پایداری حرارتی پروتئین نوترکیب اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* با ایجاد جهش‌های هدفمند انجام شد. آنزیم‌ها با فراوانی زیادی در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند و بخشی از تولیدات پایدار امروزه تکیه بر آنزیم‌ها دارند. یکی از عوامل محدودکننده فعالیت آنزیم‌ها در صنعت، پایداری حرارتی آنهاست. بسیاری از آنزیم‌ها در دماهای بالای ۴۰°C تغییر ساختار می‌دهند و دچار کاهش میزان فعالیت می‌شوند. افزایش پایداری حرارتی آنزیم‌ها با روش‌های مهندسی پروتئین می‌تواند باعث افزایش کارآیی آنها و در نتیجه افزایش کارآیی تولید محصول مربوطه شود[7]. مقالات تحقیقی و مروری بسیاری در این حوزه منتشر شده که خود گواهی برای اهمیت این مبحث بوده است[13-15].

با توجه به کاربردهای فراوان اینورتاز در صنعت و روند روبه‌رشد مصرف آن، مطالعات قابل توجهی روی این آنزیم صورت گرفته است. سویه تجاری رایج اینورتاز که از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* جدا می‌شود، از نظر پایداری حرارتی محدودیت دارد. از این رو مطالعات برای مهندسی پروتئین این آنزیم به‌منظور افزایش پایداری حرارتی آن انجام شده است. از جمله در پژوهشی که در دانشگاه ماسی نیوزلند انجام شده است، با ایجاد کراس‌لینک درون و بین‌ملکولی با تولوئن‌دی‌سوکسینات (TDI) در اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* باعث بهبود پایداری آنزیم شدند[7].

اینورتازها در خانواده‌ای به‌نام گلیکوزیدهیدرولاز ۳۲ (GH32) طبقه‌بندی می‌شوند. اعضای این خانواده دارای توالی‌های محافظت‌شده‌ای هستند که نقش مهمی در ایجاد ساختار ویژه اعضای این خانواده دارند. توالی‌های محافظت‌شده همگی در ایجاد ساختارهای ثانویه آلفاهلیکس و صفحات بتا درگیر هستند. از نظر ساختاری، این پروتئین‌ها دارای یک دامنه بزرگ اتصال به سوبسترا در انتهای C و یک دامنه کوچک کاتالیتیک در انتهای N هستند. این دو دامنه با توالی‌هایی از هم جدا می‌شوند که فاقد ساختارهای قابل توجه هستند و جزء توالی‌های محافظت‌شده نیز نیستند، از این رو اهداف مناسبی برای ایجاد تغییر در توالی و انجام مهندسی پروتئین هستند.

اینورتاز باکتری *ترماتوگا ماریتیما* که جزء آنزیم‌های بسیار مقاوم به حرارت است، از نظر ساختاری شباهت بسیار زیادی به اینورتاز *ساکارومایسس سرویزیه* دارد، با این تفاوت که فاکتورهای ایجاد مقاومت دمایی در این پروتئین بسیار قابل توجه است. از جمله تفاوت‌هایی که در ساختار اینورتاز این باکتری مشاهده می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل افزایش پایداری دمایی این پروتئین باشد، وجود یک ساختار هلیکال کوتاه در توالی رابط بین دو دامنه اینورتاز است[16].

زنجیرهای جانبی دو اسیدآمینه ترئونین و آسپارژین ممانعت فضایی برای تشکیل‌شدن مارپیچ آلفاهلیکس هستند. همچنین در هر دور یک مارپیچ آلفا ۳/۶ اسیدآمینه جای می‌گیرد. بنابراین با جایگزینی دو اسیدآمینه مذکور با آلانین در جایگاه‌های شماره ۳۴۵ و ۳۴۹ و حذف ممانعت فضایی انتظار می‌رود که این دو آلانین در فاصله مناسب برای ایجاد یک ساختار آلفاهلیکس قرار بگیرند و احتمال ایجاد این ساختار در این ناحیه افزایش یابد.

جهش‌های مورد نظر با استفاده از ساخت توالی‌های همپوشان وارد توالی ژن شد و صحت آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به بررسی بیان پروتئین با استفاده از ژل SDS-PAGE و همچنین اندازه‌گیری میزان بیان با روش برادفورد نشان داد که جهش‌های اعمال‌شده هیچ اثر منفی روی میزان تولید و همچنین ترشح پروتئین نوترکیب اینورتاز نداشتند و پروتئین جهش‌یافته با مقادیر مشابه پروتئین طبیعی تولید و ترشح شد.

بررسی پروفایل pH آنزیم جهش‌یافته نشان داد که تغییر انجام‌شده تاثیری روی pH بهینه آنزیم نداشت و هر دو آنزیم بالاترین فعالیت را در pH برابر با ۴/۶ داشتند. همچنین هر دو نمودار پروفایل pH روی هم منطبق بودند. این موضوع حاکی از این بود که شرایط اسیدیته واکنش برای آنزیم جهش‌یافته نیاز به تغییر نداشت و با همان شرایط آنزیم طبیعی، آنزیم جهش‌یافته فعالیت مناسبی داشت، پس کاربرد آنزیم جهش‌یافته در همان شرایطی که برای آنزیم طبیعی مد نظر بود، قابلیت اجرا داشت. این نتیجه از این نظر حایز اهمیت بود که با ایجاد تغییر در pH بهینه یک آنزیم، کاربرد آنزیم تغییر کرد.

مقایسه پروفایل دمایی آنزیم طبیعی و جهش‌یافته نشان داد که هیچ گونه تغییری در دمای بهینه فعالیت آنزیم جهش‌یافته نسبت به آنزیم طبیعی رخ نداد و دمای بهینه ۶۵°C برای هر دو آنزیم مشترک بود. هر چند در دماهای بالاتر و پایین‌تر از نقطه بهینه تفاوت معنی‌داری بین فعالیت هر دو آنزیم دیده نشد، اما نتایج نشان داد که به‌طور نسبی آنزیم جهش‌یافته در دماهای پایین فعالیت بالاتری را از خود نشان داد، اما در دماهای بالای ۶۵°C آنزیم طبیعی فعال‌تر بود.

بررسی خصوصیات کینتیک آنزیم جهش‌یافته و طبیعی نشان داد که تمایل آنزیم جهش‌یافته به سوبسترای اصلی آن افزایش یافت (میزان K_m آن کاهش یافت) و شاخص اصلی بررسی هر آنزیم که نسبت K_{cat}/K_m آن است، برای آنزیم جهش‌یافته ۵برابر آنزیم طبیعی بود. همچنین با توجه به منحنی میکائلیس- منتن چنین استنباط می‌شود که جهش‌های ایجادشده باعث افزایش فعالیت آنزیم شد. تغییر آمینواسیدهای قطبی ترئونین و آسپارژین که می‌توانند از طریق زنجیره جانبی، پیوند هیدروژنی به زیرواحد آب‌گریز و کوچک آلانین برقرار کنند و با کاهش‌دادن این برهم‌کنش‌ها باعث تغییر اندکی در موقعیت قرارگیری لوپ شود

Archive of SID
www.SID.ir

به‌نوبه خود می‌تواند بر حرکت دومین‌ها نسبت به هم هنگام اتصال آنزیم به سوبسترا اثر مهمی داشته باشد. این تفاوت در تمایل آنزیم به سوبسترا در اینورتاز جهش‌یافته می‌تواند علت اصلی یا یکی از علت‌های بهبود شاخص‌های کینتیک آنزیم جهش‌یافته باشد. این نتیجه با نتایج شبیه‌سازی از این نظر که جهش‌های انتخاب‌شده القای ساختار خاصی را نشان نداد نیز تایید شد.

پایداری حرارتی در این پژوهش از دو منظر بررسی شد. ابتدا پایداری ساختاری آنزیم در دمای $55^{o}C$ نشان‌دهنده پایداری بالاتر آنزیم جهش‌یافته در مقایسه با آنزیم طبیعی بود. در مورد پایداری عملکردی آنزیم جهش‌یافته و طبیعی رفتار یکسانی از خود نشان دادند و این امر نشان‌دهنده موفقیت در جهش اخیر بود، زیرا با بالابردن پایداری ساختاری آنزیم، آسیبی به عملکرد آنزیم نرسید.

بررسی احتمال ایجاد تغییرات ساختاری در نتیجه جهش‌های اعمال‌شده با استفاده از مدل‌سازی پروتئین با نرم‌افزار Modeller 9.14 نیز مورد بررسی قرار گرفت. Modeller از پرکاربردترین و بهترین برنامه‌های در دسترس برای محاسبه ساختمان سوم براساس ساختمان به‌دست‌آمده از روش‌های تجربی مثل عکس‌برداری اشعه ایکس است. ساختارهای پیشگویی‌شده با Modeller که براساس همولوژی انجام می‌شوند، در بسیاری از موارد راهی سریع و ارزان برای ارزیابی اثر تغییرات در توالی هستند. در این روش موقعیت و ممانعت‌های فضایی اسیدآمینه‌ها، طول و زاویه پیوندها و برخوردهای واندروالس در نظر گرفته می‌شود. همچنین برای به‌دست‌آمدن ساختار مناسب و کمینه‌کردن انرژی برنامه از میدان نیرو بهره می‌برد، در نتیجه برهم‌کنش‌های فیزیکی نیز در نظر گرفته می‌شوند. بنابراین علاوه بر به‌دست‌آمدن صحیح فاصله‌ها و شکل ظاهری ساختار نهایی، از لحاظ انرژی نیز بررسی شد. مدل‌سازی پروتئین جهش‌یافته اینورتاز ایجاد ساختار آلفاهلیکس در توالی رابط دو دامنه را تایید نکرد، اما برای تایید وجود یا عدم وجود این ساختار نیاز به انجام مطالعات تکمیلی مانند کریستالوگرافی است. لازم به ذکر است که ایجاد تغییرات ممکن است به‌سادگی در شبیه‌سازی‌های مولکولی دیده نشود. اما این مساله که ساختار به‌دست‌آمده تفاوت چندانی با حالت طبیعی نداشت، خود می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که جهش انجام‌شده اثر ناپایدارکننده‌ای در ساختار القا نکرد.

محدودیتی برای مطالعه حاضر وجود نداشت.

پیشنهاد می‌شود که در ادامه این کار، آزمایشات تجربی به‌منظور بررسی دقیق تغییرات ساختاری ایجادشده مد نظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

جهش‌های هدفمند اعمال‌شده هیچ اثر منفی روی میزان تولید و همچنین ترشح پروتئین نوترکیب اینورتاز ندارد و باعث افزایش فعالیت آنزیم می‌شود. آنزیم جهش‌یافته نسبت به آنزیم طبیعی، پایداری ساختاری بالاتری دارد، بدون این که تغییری در پایداری عملکردی آن ایجاد کند.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از دانشگاه شهید بهشتی به‌دلیل فراهم‌آوردن امکانات این تحقیق قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: برای این مطالعه، کاربرد ندارد.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ساره ارجمند (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵%)؛ لیلا قبادی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ سیدامید رعنایی‌سیادت (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۲۵%)؛ یحیی سفیدبخت (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/تحلیلگر آماری (۱۵%)؛ فاطمه فرزانه (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی (۱۰%)

منابع مالی: موردی گزارش نشد.

منابع

1- Kulshrestha S, Tyagi P, Sindhi V, Yadavilli KS. Invertase and its applications - a brief review. J Pharm Res. 2013;7(9):792-7.

2- Trimble RB, Maley F. Subunit structure of external invertase from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 1977;252(12):4409-12.

3- Williams RS, Trumbly RJ, MacColl R, Trimble RB, Maley F. Comparative properties of amplified external and internal invertase from the yeast SUC2 gene. J Biol Chem. 1985;260(24):13334-41.

4- Pandey A, Webb C, Soccol CR, Larroche C, editors. Enzyme technology. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2006.

5- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. Yeast. 2005;22(4):249-70.

6- Han X, Liu X, Yin SP. pastoris expression system. J Microbiol. 2003;4:011.

7- Tananchai P, Chisti Y. Stabilization of invertase by molecular engineering. Biotechnol Prog. 2010;26(1):111-7.

8- DeRegis CJ, Rahl PB, Hoffman GR, Cerione RA, Collins RN. Mutational analysis of betaCOP (Sec26p) identifies an appendage domain critical for function. BMC Cell Biol. 2008;9:3.

9- Madden K, Tolstorukov I, Cregg J. Electroporation of Pichia pastoris. In: Van Den Berg MA, Maruthachalam K, editors. Genetic transformation systems in fungi. 1st Volume. New York: Springer; 2014. pp. 87-91.

10- Várnai A, Tang C, Bengtsson O, Atterton A, Mathiesen G, Eijsink VG. Expression of endoglucanases in Pichia pastoris under control of the GAP promoter. Microb Cell Fact. 2014;13(1):57.

11- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1-2):248-54.

12- Wray W, Boulikas T, Wray VP, Hancock R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1981;118(1):197-203.

13- Turner P, Mamo G, Karlsson EN. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microb Cell Fact. 2007;6:9.

14- Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: A review. Bioresour Technol. 2003;89(1):17-34.

15- Zamost BL, Nielsen HK, Starnes RL. Thermostable enzymes for industrial applications. J Ind Microbiol. 1991;8(2):71-81.

16- Alberto F, Bignon C, Sulzenbacher G, Henrissat B, Czjzek M. The three-dimensional structure of invertase (beta-fructosidase) from Thermotoga maritima reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. J Biol Chem. 2004;279(18):18903-10.

Archive of SID

www.SID.ir