

تولید کیموزین کامل و پردازش یافته نو ترکیب در *E-coli* و ارزیابی میزان بیان پری پلاسمایی و فعالیت آنزیمی آن‌ها

میثم احمدی زیدآبادی^۱ (M.Sc)، غلامرضا احمدیان^{۲*} (Ph.D)، رحیم سروری^۳ (Ph.D)

۱ - دانشگاه امام حسین (ع)، تهران

۲ - پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، تهران

۳ - دانشگاه علوم پزشکی زنجان

چکیده

سابقه و هدف: تا سال ۱۹۹۰، رنت (پروتئازهایی که باعث لخته شدن شیر و تولید پنیر می‌شوند) با روش قدیمی از شیردان گوساله‌های شیرخوار، یا از منابع گیاهی و یا میکروبی تهیه می‌گردید. در این سال اداره غذا و داروی آمریکا اجازه تولید و مصرف کیموزین گاوی نو ترکیب تولید شده توسط باکتری‌ها را صادر کرد. امروزه بیش از ۹۰ درصد پنیر مصرفی در انگلستان از کیموزین نو ترکیب تولید می‌شود. این تحقیق به منظور قطع وابستگی کشور به مایه پنیر وارداتی، بررسی بیان و عمل کرد فرم اسپلایس یافته ژن کیموزین (فرم فاقد اگزون ۶) به منظور بدست آوردن آنزیم کوچک تر و فعال تر همچنین بررسی عمل کرد سیگنال *pelB* در هدایت پروتئین به فضای پری پلاسم باکتری *E-coli* انجام گردید.

مواد و روش‌ها: با استخراج mRNA از لایه پوششی معده گوساله و انجام RT-PCR دو فرم از پر پروکیموزین (فرم پردازش یافته فاقد اگزون ۶ و فرم کامل پر پروکیموزین) بدست آمد. سپس با طراحی پرایمرهای مناسب هر دو فرم پر پروکیموزین در وکتور بیانی *pET26b* کلون گردید. بیان با وسترن بلات تا بید گردید و عمل کرد آن‌ها بررسی شد. یافته‌ها: هر دو فرم ژن پر پروکیموزین در وکتور *pET26b* تولید گردیدند. میزان تولید فرم پردازش یافته ۷ برابر فرم کامل بود. هر دو فرم پر پروکیموزین باعث رسوب پروتئین‌های شیر شدند.

نتیجه‌گیری: از آنجا که فرم پردازش یافته و کامل پر پروکیموزین بعد از شوک اسمزی در فضای پری پلاسمی مشاهده نشدند. بنابراین سیگنال *pelB* قادر به هدایت هیچ یک از آن دو به فضای پری پلاسم نیست. بنابراین بایستی سیگنال جدیدی طراحی گردد.

واژه‌های کلیدی: کیموزین پردازش یافته، اسپارتیک پروتئاز، سیگنال *pelB*، پروتئینازهای شبه رنتی

مقدمه

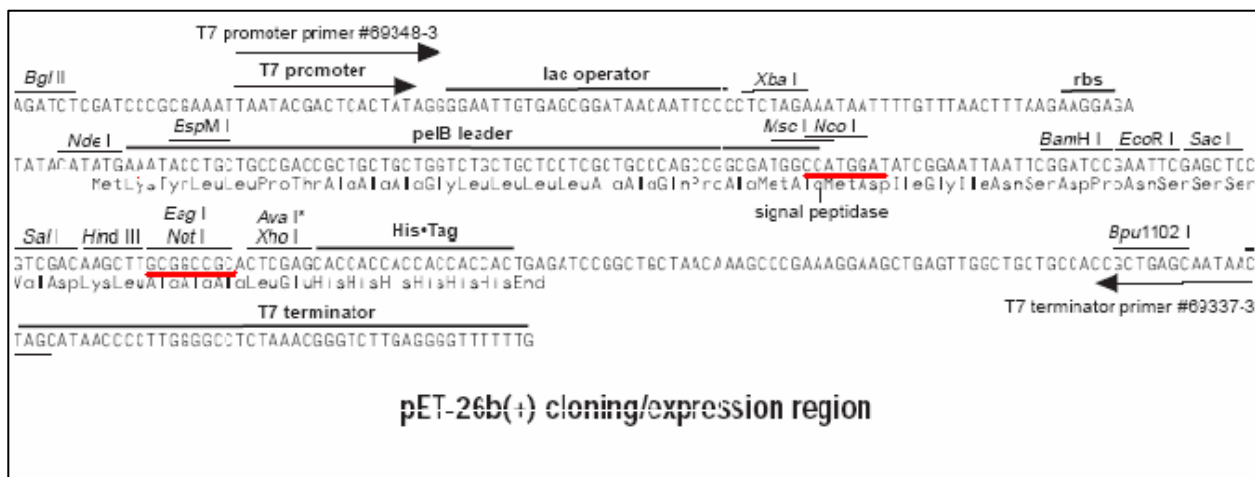
پروتئین‌های شیر و تولید لخته هستند اما این خاصیت به تنهایی جهت کاربرد آنزیم پروتئاز در پنیرسازی کافی نیست. یک مایه پنیر خوب باید به سادگی در آب حل شود، فاقد طعم نامطلوب باشد و قدرت لخته کنندگی بالا داشته باشد. اما پروتئاز اسیدی حاصل از منابع گیاهی و باکتریایی به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی بالا و ایجاد تلخی در پنیر مفید نیست. در

کیموزین جزئی از اسپارتیک پروتئازهای معدی است که همراه با پپسین و گاسترین می‌باشد. مولکول کاپاکازین شیر توسط آنزیم کیموزین در پیوند بین اسید آمینه فنیل آلانین ۱۰۵ و متیونین ۱۰۶ شکسته می‌شود. و باعث لخته شیر می‌شود [۱]. در واقع تعداد زیادی از پروتئازها قادر به تجزیه

تولید شده‌اند نشان می‌دهد که این mRNA ها دارای حداقل ۷ فرم متفاوت هستند که از ۱ تا ۴ آگزون از طریق پردازش حذف شده است. در نتیجه مولکول‌های mRNA می‌تولید شده‌اند که ۹۹-۱۱۴-۲۱۳-۲۳۷-۲۳۶-۳۵۱ و ۴۵۰ نوکلئوتید از فرم کامل کوچک‌تر هستند، و در بانک ژنی با شماره‌های AF ۴۲۱۱۶۱ الی AF ۴۲۱۱۶۷ موجود می‌باشد. مولکول کیموزین دارای دو جایگاه فعال شامل آسپارتیک اسید در توالی ۳۶ و ۲۱۶ می‌باشد. فرم ۴ تا ۷ که به ترتیب حذف در آگزون‌های ۳ و ۴ آنها رخ داده است فاقد آسپارتیک ۳۶ می‌باشند همچنین این فرم‌ها فاقد ترئونین ۳۵ و سرین ۳۶ و گلايسين ۳۷ هستند که مسئول ایجاد باندهای هیدروژنی و تشکیل ساختار هستند. در حالی که فرم‌های ۱ تا ۳ با وجود حذف در آگزون‌های ۶ و ۸ حذف مناطق فعال و پیوندهای هیدروژنی را در بر نمی‌گیرند و این می‌تواند برای بررسی میزان فعالیت مناسب باشد. از این رو فرم فاقد آگزون ۶ که ۱۱۴ نوکلئوتید کوچک‌تر از فرم کامل است برای بررسی میزان فعالیت انتخاب گردید و عملیات کلونینگ و بیان روی آن انجام گرفت. چون حذف در آگزون ۶ در مناطق فعال نمی‌باشد احتمالاً با کوچک شدن پروتئین تولید آن افزایش می‌یابد [۸ و ۹] در این کار تحقیقی به منظور بررسی توانایی *E. coli* BL21 در بیان دو فرم کامل و فاقد آگزون ۶ ژن پروکیموزین ابتدا mRNA ژن پروکیموزین از معده چهارم گوساله بدست آمد و با RT-PCR، cDNA مربوط به ژن کامل و فرم فاقد آگزون ۶ تهیه شد و ژن‌ها وارد پلاسمید Pet-26 شدند به نحوی

حال حاضر در ایران اکثر صنایع پنی‌سازی از رنت قارچی وارداتی جهت تولید پنی‌ر استفاده می‌کنند. بنابراین لازم است محققین و پژوهش‌گران ایرانی در جهت تأمین این نیاز ضروری اقدام نمایند. پریروکیموزین گاوی دارای ۳۸۱ اسید آمینه است. ۱۶ اسید آمینه اول این پروتئین نقش سیگنال آب‌گریز را دارد و هنگام ترشح به فضای معده از پروتئین جدا می‌شود. و پروکیموزین با ۳۶۵ اسید آمینه تولید می‌شود [۳۰۲]. این پروتئین تحت تاثیر pH معدی دچار تغییراتی می‌گردد و به صورت خودبخودی فعال می‌شود [۴ و ۵] در این حالت ۴۲ اسید آمینه از انتهای آمینی آن جدا می‌شود و یک زنجیره پروتئینی با ۳۲۳ اسید آمینه تولید می‌گردد [۷۰۶].

Emtage در سال ۱۹۸۳ و Marston در سال ۱۹۸۴ توانستند با استفاده از *E. coli* k-12 در بردارنده پلازمید pCT70 حامل ژن پروکیموزین کامل، پروتئین مذکور را به میزان ۵-۱ درصد پروتئین کلی سلول تولید کنند. Chitpintyol و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۷، با استفاده از سلول‌های *E. coli* BL21 دارای پلازمید pET-PC حامل ژن پروکیموزین کامل، پروکیموزین را تا حدود ۳۰ درصد پروتئین کلی سلول تولید کردند. شکل‌های پردازش یافته مختلف mRNA پروکیموزین گاوی در سال ۱۹۸۲ توسط Moir و در سال ۲۰۰۲ توسط Zinovieva و همکارانش گزارش شده‌اند، اما هیچ توضیحی در مورد اهمیت بیولوژیکی ایزوفرم‌های مختلف ارائه نگردید. بررسی RNA های پیامبر که از روی ژن پروکیموزین



شکل ۱. مکان قرار گرفتن ژن پروکیموزین در وکتور مورد نظر در مکان برش *NcoI* و *NotI*

TAG و RABBIT ANTI MOUSE HRP آنتی بادی به طور اختصاصی ۶ هیستیدین که پشت سر هم قرار گرفته اند را شناسایی می کند.

سویه های باکتریایی: سویه مورد استفاده جهت سلول های سازگار *E. coli* BI21DE3، بوده که در بیان مورد استفاده قرار گرفت.

[F-,ompt,hsdSB(rB-mB-gal(cI857,indl,sam,nin5 lacuv5-T7genel),dcm(DE3)]

سویه مورد استفاده، در کلون سازی DH5α و Top 10

بوده اند.

F', Φ80 d lacZ Δ15, endA1, yecA1, hsd R17(rk⁻, mk⁺)

پلاسمیدها: وکتورهای بیانی pET-26b (+) از شرکت

Novagene خریداری شدند.

جهت بیان از سیستم T7 پرموتر استفاده شد که بر روی

وکتورهای pET قرار دارد که جهت القاء از IPTG تهیه شده از

شرکت Fermentas استفاده شد.

محیط های کشت و آنتی بیوتیک ها: از محیط های LB

Brath و Agar LB حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر

آنتی بیوتیک جهت کلونینگ استفاده گردید و برای بیان ژن

مورد نظر محیط های مختلف LB Brath مورد بررسی قرار

گرفت. آمپی سیلین و کانامایسین مورد استفاده به عنوان

آنتی بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

پرایمرها: پرایمرهای فرادست و فرودست پس از طراحی

و آنالیز کامپیوتری جهت سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده

شد.

پرایمر بالا دست با توالی (Forward):

5'GGGGGCCATGGCTGAGATCACCAG 3'
NCOI

پرایمر پائین دست با توالی (Revers):

5'GGGCGGCCGCGATGGCTTTGGCCAGC 3'
Not I

تفاوت فرم کوچک پروکیموزین با فرم کامل آن در حذف

اگزون ۶ می باشد و چون این اگزون در داخل ژن می باشد در

نتیجه ابتدا و انتهای هر دو ژن یک سان می باشد. بنابراین

که توالی پلی هیستیدین در انتهای کربوکسیلی و سیگنال pelB در ابتدای آمینی آن قرار گرفت و سپس وکتور بیانی وارد *E. coli* شد. به منظور سهولت تخلیص، برجسب هیستیدینی به انتهای هر دو فرم پروتئین فیوز شد. این برجسب امکان تخلیص فیوژن پروتئین را بوسیله ستون Ni فراهم می آورد. به منظور ترشح پروتئین به فضای پری پلاسمی از سیگنال pelB در محل سیگنال آب گریز پروتئین استفاده گردید.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده: آنزیم های محدودگر *NcoI* و *NotI*

متعلق به شرکت سیناژن بود. آنزیم T4 DNA Ligase از

شرکت Roche و آنزیم های تکثیر دهنده DNA polymerase

Pfu DNA polymerase از شرکت Fermentas تهیه گردید

و بر اساس برشور شرکت مورد استفاده قرار گرفت. کیت

تخلیص DNA پلاسمیدی و کیت استخراج و تخلیص DNA

از شرکت Roche خریداری شد.

مواد از قبیل Trisbase, Rnase, EDTA, dNTP,

MgCl₂، یدروکسید آمونیم، اسیداستیک گلاسیال، هیدروکسید

سدیم، کلروفرم، فنل، اسید بوریک، اتیدیوم بروماید، لیزوزیم،

۲-مرکاپتواتانول، پودر آگارز، ژل low melting از شرکت

سیناژن تهیه شدند. همچنین مواد مورد استفاده در تکنیک های

SDS-PAGE, western blotting نیز از شرکت Serotec تهیه

شدند.

DNA marker های استفاده شده در این آزمایشات

۱۰۰ Plus SM0321# DNA ladder و bp

۱۰۰ Lambda DNA/EcoR1+Hind111#SM0191

SDS- ladder#SM0241 بودند. همچنین جهت تکنیک

PAGE از مارکر خریداری شده از شرکت Fermentas

استفاده شد.

از آنتی بادی منوکلونال ضد هیستیدین به عنوان آنتی بادی

اختصاصی جهت Western blotting استفاده شد این

آنتی بادی از نوع دو مرحله ای و شامل ANTI HISTIDIN

کلونینگ هر دو فرم پرو کیموزین هم‌زمان و با استفاده از یک جفت پرایمر انجام گرفت.

جدول ۱. پروتکل PCR

مقدار	مواد
۵ میکرو لیتر	بافر 10X PCR
۴ میکرو لیتر	dNTPs Mi 2.5 mM
۳ میکرو لیتر	Mgso4 50 mM
۳ میکرو لیتر	پرایمر بالا دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۳ میکرو لیتر	پرایمر پایین دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۰/۵ میکرو لیتر	آنزیم Pfu DNA پلی مراز
۳ میکرو لیتر	الگو (cDNA)
۲۸/۵ میکرو لیتر	آب مقطر (آمبولی)
۵۰ میکرو لیتر	حجم نهایی

جدول ۲. نحوه اجرای سیکل‌های PCR با آنزیم Pfu

مرحله	درجه حرارت	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل‌ها
دنا توره کردن اولیه	۹۵	۱۰	۱
دنا توره کردن	۹۵	۱	۳۲
اتصال	۴۶	۱	
تکثیر	۷۲	۱	
تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱

کیت استخراج پروتئین: برای بدست آوردن پروتئین‌های

کلون شده از بار مثبت موجود بر رزین نیکل و بار منفی ناشی از وجود ۶ هیستیدین انتهایی که در انتهای ژن‌ها قرار دارند استفاده گردید. در این روش از washing buffer های با غلظت ایمیدازول متفاوت استفاده شد و با افزایش مقدار ایمیدازول در ابتدا پروتئین‌های که به صورت غیر اختصاصی و با نیروی کمی به رزین‌ها متصل شده‌اند جدا می‌شوند. سرانجام در مقدار مشخصی از ایمیدازول پروتئین‌های تولید شده خارج می‌گردد. باید توجه داشت که شستشو باید به آهستگی ولی چندین بار انجام شود. چون ممکن است پروتئین‌های غیر اختصاصی از رزین‌ها جدا شوند ولی از میان آن‌ها خارج نشوند. پروتئین‌های فیوز شده به برجسب هیستیدینی را به دو

روش دنا توره و غیر دنا توره تخلیص می‌کنند. در روش دنا توره پروتئین‌ها بوسیله اوره ۸ مولار یا گوانیدیوم هیدروکلراید ۶ مولار دنا توره شده و از ستون تخلیص عبور داده می‌شوند. روش دنا توره زمانی بکار می‌رود که به دلیل ساختار فضایی پروتئین برجسب هیستیدینی در سطح پروتئین نباشد. در این حالت پس از مرحله تخلیص باید پروتئین مجدد □ تا زده شود تا کارایی لازم را بدست آورد. استفاده از روش دنا توره با محدودیت‌هایی همراه است. زیرا در بعضی موارد تا زدن دوباره پروتئین مشکلاتی را به همراه دارد.

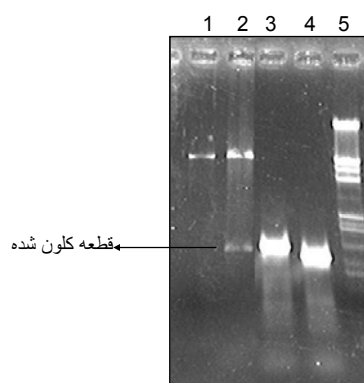
روش غیر دنا توره که در این تحقیق استفاده شد زمانی بکار می‌رود که برجسب هیستیدینی در حالت تاخورده پروتئین در معرض باشد. در پژوهش حاضر برجسب هیستیدینی به انتهای (کربوکسیل) پروتئین متصل شد.

با استفاده از ستون نیکل که از کمپانی کیاژن خریداری شده بود (The QIAexpressionist™ ۲۰۰۱) پروتئین ۱۰۰٪ خالص نمی‌شود. زیرا سلول پروتئین‌های غنی از هیستیدین دارد که بطور غیر اختصاصی به ستون متصل می‌شوند.

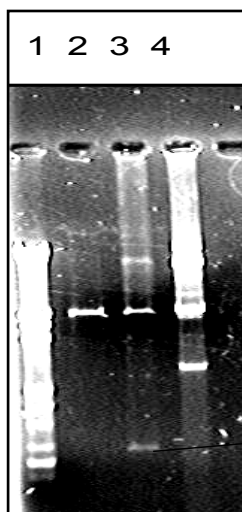
پیمایش تراکم سنجی ژل رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو به منظور بررسی کمی بیان پروتئین نوترکیب، از روش پیمایش ژل رنگ آمیزی شده حاصل از SDS-PAGE توسط دستگاه پیمایشگری pharmacia LKB. Ultrascan XL استفاده گردید.

شوک اسمزی: برای بدست آوردن پروتئین‌های پری پلاسمی لازم است دیواره خارجی باکتری تخریب گردد به این منظور از محلول TES که شامل (سوکروز، EDTA و Tris-HCL) در مقادیر متفاوت آب استفاده گردید و به تدریج مقدار آب افزایش داده شد تا با بررسی حالات متفاوت بهترین غلظت را که تنها باعث خروج پروتئین‌های پری پلاسمی می‌شود و سلول را نمی‌ترکاند به دست بیاید. ۱/۵ میلی لیتری از کشت باکتری نمونه برداری شده در ۴ درجه سانتی گراد و سرعت ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و محیط کشت به طور کامل خارج شد. رسوب باکتری در ۱۵ μl از بافر TES حل شده و به مدت ۲۰ دقیقه با

بررسی بیان پروتئین: باکتری‌های BL21 DE3 ترانسفورم شده (حاوی ژن کیموزین در وکتور PET) در محیط مایع کشت داده شدند بعد از رسیدن به $OD=0.6$ برای روشن کردن پروموتور T7 و تولید پروتئین کلون شده IPTG با غلظت ۱ میلی مولار به محیط اضافه گردید و در زمان‌های ۲ و ۴ و ۸ ساعت پس از القاء نمونه برداری انجام گرفت و میزان بیان پروتئین کیموزین بر روی ژل اکریل آمید بررسی گردید. میزان بیان هر دو فرم پروکیموزین با دستگاه پیمایشگر ژل بررسی شد. (شکل ۴)



شکل ۲. (ژل آگارز ۱٪): PCR و برش آنزیمی برای پروکیموزین کامل ۱- وکتور برش خورده. ۲- پلاسمید نو ترکیب برش خورده با دو آنزیم ۳- محصول PCR ژن پروکیموزین کامل با آنزیم pfu. ۴- محصول PCR ژن پروکیموزین پردازش یافته با آنزیم pfu ۵- نشانگر اندازه λ DNA/EcoRI+HindIII.



شکل ۳. (ژل آگارز ۱٪): PCR و برش آنزیمی برای پروکیموزین پردازش یافته
۱ - نشانگر اندازه به ترتیب SM0321 # و SM0191 # ۲- پلاسمید برش خورده توسط دو آنزیم *NcoI* و *NotI* از ژل ۱٪ ۳- خروج ژن کیموزین پردازش یافته از پلاسمید نو ترکیب برش خورده توسط دو آنزیم *NcoI* و *NotI*

تکان‌های متناوب بر روی یخ نگاه داشته شد. سپس با افزودن $22/5 \mu\text{L}$ آب دوبار تقطیر انکوباسیون بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت.

به منظور تفکیک پروتئین‌های پری پلاسمی، مخلوط سلولی پس از شوک اسمزی، به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد 13000 rpm سانتریفیوژ شد. روشن‌آور حاوی پروتئین‌های پری پلاسمی و رسوب حاوی پروتئین‌های اسفرو بلاستی است.

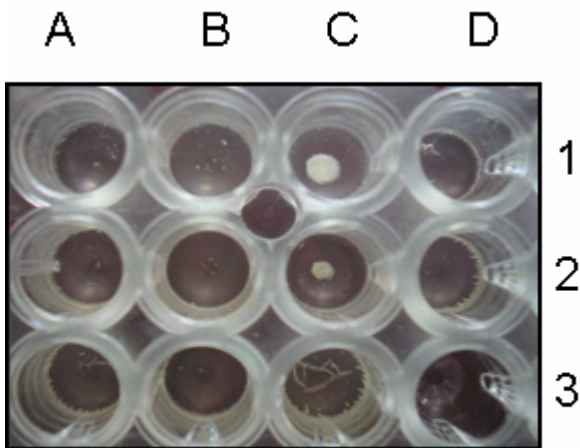
برای فعال سازی هر دو فرم آنزیم کیمزین در $\text{pH}=4.5$ قرار گرفتند. پس از ۵ ساعت توسط بافر فسفات ۲۰ برابر رقیق شد تا $\text{PH}=7$ رسید و فعال سازی خاتمه یافت. رقت‌های مختلف از هر دو فرم آنزیم به شیر خشک ۱۰ درصد که در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار و کلرید کلسیم ۲۵ میلی مولار حل شده بود اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت قرار گرفت [۱۱].

نتایج

بعد از انجام PCR با پرایمرهای طراحی شده عمل هضم آنزیمی با دو آنزیم *NCOI* و *NOT I* برای قطعات حاصل از PCR و وکتور انجام گرفت. سپس جهت Ligation از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده گردید در ادامه طی مراحل شوک گرمایی و الکتروپوریشن *E-coli* ترانسفورم گردید و بر روی محیط LB-agar حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین کشت داده شد. از سلول‌های مستعد بدون ناقل نیز بعنوان کنترل منفی استفاده گردید.

از کلنی‌های رشد یافته انتخاب و در محیط LB-Broth حاوی آنتی بیوتیک کشت داده شد. جهت تأیید کلونی‌ها واکنش quick check انجام گرفت و پس از تخلیص پلاسمید مراحل بعدی کنترل با هضم آنزیمی و PCR دنبال گردید. (شکل ۲ و ۳) جهت تأیید نهایی نیز سفارش سکانسینگ داده شد.

مشاهده می‌شود با افزایش مقدار آنزیم رسوب بیش‌تری مشاهده می‌گردد و در ردیف ۳ که مقادیر متفاوت از عصاره حاصل از سونیکاسیون باکتری BL21 بدون ژن مورد نظر قرار گرفته رسوبی مشاهده نمی‌شود که نشان می‌دهد عمل‌کرد مربوط به پروتئین کلون شده می‌باشد. برای مشاهده بهتر بعد از عمل رسوب گذاری مایع رویی با دستمال جاذب به آرامی برداشته شد. (شکل ۶).



شکل ۶. بررسی فعالیت هر دو فرم کیموزین

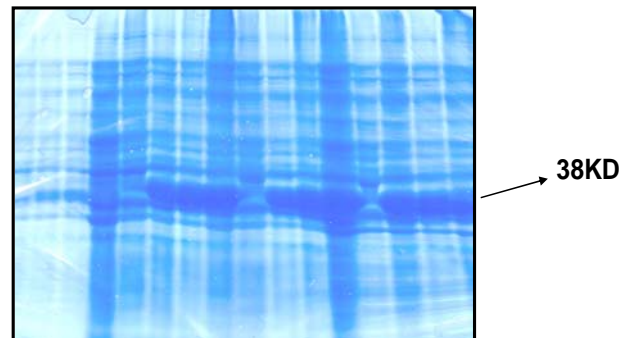
۱- a,b,c حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی کیموزین پردازش یافته d حاوی شیر ۲- a,b,c حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی کیموزین کامل d حاوی شیر ۳- a,b,c حاوی ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی باکتری لیز شده d حاوی شیر

بحث و نتیجه‌گیری

با وجود تولید پروتئازهای میکروبی و استفاده از آن‌ها در فرایند تولید پنیر، کیموزین دامی هنوز به عنوان بهترین و با ارزش‌ترین آنزیم لخته‌کننده در صنایع پنیر سازی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و برای ارزیابی و استاندارد کردن سایر پروتئازها مورد استفاده قرار می‌گیرد. کیموزین به دلیل قابلیت لخته‌کنندگی بالای پروتئین شیر و فعالیت پروتئازی پائین به عنوان یک پروتئاز اختصاصی برای لخته کردن شیر و تولید پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم بر خلاف سایر پروتئازها از رسیدگی بیش از حد پنیر و تلخی آن جلوگیری می‌کند.

وسترن بلات: برای اثبات بیان هر دو فرم ژن مورد نظر و بررسی پروتئین‌های پری پلاسمی از حالت شوک اسمزی و بیان سیتوپلاسمی دو ژل اکریل امید ۱۰ درصد تهیه گردید و یکی را برای وسترن بلات و دیگری به عنوان شاهد استفاده گردید. (شکل ۵).

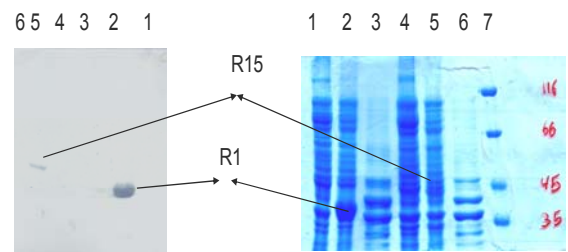
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



شکل ۴. (ژل ۱۰٪ SDS-PAGE). بیان ژن کیموزین پردازش یافته

برروی وکتور pET26b

۱ تا ۴- باکتری همراه با وکتور القاء شده با IPTG. ۵ تا ۸- القاء شده با IPTG در زمان‌های ۰، ۲ و ۸ و ۱۵ ساعت. ۹ تا ۱۲- القاء شده با IPTG در زمان‌های ۰، ۲ و ۸ و ۱۵ ساعت. ۱۳ تا ۱۶- القاء شده با IPTG در زمان‌های ۰، ۲ و ۸ و ۱۵ ساعت.



شکل ۵. وسترن بلاتینگ برروی پروتئین‌های حاصل از بیان ژن کیموزین ۱- کیموزین پردازش یافته قبل از القاء ۲- کیموزین پردازش یافته ۱۵ ساعت بعد از IPTG ۳- پروتئین‌های حاصل از شوک اسمزی ۴- کیموزین کامل قبل از القاء ۵- کیموزین کامل ۱۵ ساعت بعد از IPTG ۶- پروتئین‌های حاصل از شوک اسمزی ۷- نشان‌گر اندازه ۱۱۶ KD, 66.2KD, 45KD, 35KD, 25KD

بررسی فعالیت آنزیمی: رقت‌های مختلف از هر دو فرم آنزیم به skim milke ۱۰ درصد که در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار و کلرید کلسیم ۲۵ میلی مولار حل شده بود اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. رسوب در ته ویال‌ها جمع گردید همانگونه که در شکل ۶

محیط مناسبی برای تولید انواع پروتئین‌های انسانی و سایر پروتئین‌های پستانداران واجد اسید آمینه سیستمین می‌باشد.

Protein disulfide isomerase که در *E. coli* DsbC نامیده می‌شود و اکسیداسیون باندهای دی‌سولفیدی را بر عهده دارد و PPIase که ایزومریزاسیون باندهای X-pro را کاتالیز می‌نماید، پروتئین‌هایی هستند که امکان تاب خوردگی صحیح پروتئین بیگانه را در فضای پریپلاست *E. coli* فراهم می‌نمایند. [۱۴ و ۱۵ و ۱۶].

با توجه به خصوصیات فوق فضای پری پلاسمی باکتری *E. coli* BL21 مکان مناسبی برای تولید پروتئین می‌باشد بنابراین در این تحقیق سعی شد با انتخاب وکتور مناسب و سیگنال مقادیر زیاد پروتئین تولید و به پری پلاسم هدایت گردد. همچنین میزان بیان و فعالیت فرم فاقد آگزون ۶ بررسی گردید. میزان تولید فرم پردازش یافته ۷ برابر فرم کامل بود. علت این افزایش بیان بدین ترتیب توضیح داده شد: آگزون ۶ دارای ۳۸ اسید آمینه می‌باشد که ۱۲ تای آن‌ها بشدت و ۱۷ تای دیگر بمیزان کمتری آب‌گریز می‌باشند. یکی از عوامل مهم در تعیین میزان بیان پروتئین‌های یوکاریوتی در میزبان‌های باکتریایی، طبیعت هیدروفوبیک پلی پپتید می‌باشد. گزارش‌هایی وجود دارد مبنی بر آنکه تعویض اسیدهای آمینه هیدروفوب با اسیدهای آمینه خنثی موجب افزایش بیان در باکتری‌ها می‌گردد.

فرم پردازش یافته و کامل پروکیموزین بعد از شوک اسمزی و در شرایط متفاوت از قبیل کاهش دما (در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و کاهش میزان IPTG (در غلظت نیم میلی‌مولار) بررسی شدند و در فضای پری پلاسمی مشاهده نشدند بنابر این سیگنال *pelB* قادر به هدایت هیچ یک از این دو به پری پلاسم نیست. از آنجا که در مطالعات اولیه و با استفاده از نرم افزار *signal P* ترشحی بودن پروتئین بررسی شده بود و در نهایت نتایج متفاوتی حاصل شد باید در استفاده از این برنامه دقت لازم صورت گیرد. اما اتصال این سیگنال باعث افزایش حلالیت پروتئین گردید و در سانتریفیوژ با سرعت زیاد میزان اینکلوژن‌بندی کاهش یافت و پروتئین در

پروتئاز سویه‌های قارچی در مقایسه با کیموزین، دارای نسبت قدرت لخته‌کنندگی به فعالیت پروتئازی پایین‌تری می‌باشند. این ویژگی در پنیرهایی نظیر پنیر ایرانی که دارای دوره رسیدگی می‌باشند موجب کاهش راندمان پنیر و تلخی آن می‌گردد. در ضمن پروتئازهای قارچی دارای پایداری حرارتی بالایی هستند. این ویژگی در فرآیند پنیر سازی مطلوب نیست. در ضمن سویه‌های قارچی علاوه بر پروتئاز، سایر آنزیم‌ها به خصوص لیپاز را هم تولید می‌کنند که لیپاز سبب تجزیه چربی پنیر شده و موجب تندی آن می‌گردد.

باکتری گرم منفی *Escherichia coli* بعلت اطلاعات ژنتیکی شناخته شده و همچنین در دسترس بودن تعداد زیادی از ناقل‌های همسانه‌سازی و ناقل‌های بیانی و سویه‌های جهش یافته و امکان تولید مقادیر انبوه پروتئین نو ترکیب استفاده از این میکروارگانیسم برای تولید پروتئین نو ترکیب ارزشمند می‌باشد. مشهورترین سویه *E. coli* BL21 و مشتقاتشان هستند و بطور طبیعی فاقد پروتئازهای Lon (پروتئاز تجزیه‌کننده پروتئین‌های غیر طبیعی) و *OmpT* (پروتئاز غشاء خارجی که پروتئین‌های حاصل از شکستن سلول‌ها را هضم می‌کنند) می‌باشند. سلول‌های فاقد این پروتئازها، پروتئین‌های نو ترکیب را بسرعت انباشته کرده و احتمال تجزیه تعدادی از پروتئین‌ها در طول تخلیص کمتر می‌باشد [۱۱ و ۱۲ و ۱۳]. بنابراین *E. coli* BL21 که از سیستم بیانی وابسته به T7RNA پلی مرز استفاده می‌کند، میزبان مناسبی برای همسانه‌سازی و بیان ژن پروکیموزین تحت کنترل آغازگر (پروموتور) T7 می‌باشد.

پری پلاسم در مقابل سیتوپلاسم تنها ۴٪ از پروتئین‌های تام سلولی را شامل می‌شود. به علت محیط اکسید کننده پری پلاسم، محافظت پروتئینی در برابر پروتئازهای سیتوپلاسمی، تشکیل انتهای آمینی صحیح در پروتئین نو ترکیب تولید شده و اجتناب از ایجاد اینکلوژن بادی ناشی از بیان پروتئین نو ترکیب در سیتوپلاسم این فضا نسبت به بیان سیتوپلاسمی ترجیح داده می‌شود. فضای پری پلاسمی باکتری *E. coli* به ویژه

- [3] Emtage JS, Angal S, Doel MT, Harris TJ, Jenkins B, Lilley G, Lowe PA. Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. PNAS 1983; 80: 3671-3675.
- [4] Foltmann B. A review on prorennin and rennin. *Coppt Rend Trav Lab Carlsberg* 1966; 35: 143-231.
- [5] Foltman, B., 1987. General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, Editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1. London: Elsevier., pp: 37-68.
- [6] Chitpintyol, S. and Crabbe, M.J.C. 1998. Chymosin and aspartic proteinase: review. *Food Chem* 61: 395-418.
- [7] Blundell TL, Andreeva N. X-ray analyses of aspartic proteinases. IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *J Mol Biol* 1991; 221: 1295-1309.
- [8] Zinovieva N., Muller M., and Brem G, Short communication: Identification and characterization of multiple splicing forms of bovine prochymosin mRNA. *J Dairy Sci* 2002; 85: 3476- 3479.
- [9] Moir D., Monod, M., Togni G, and Hube B. Molecular cloning and characterization of double- stranded cDNA coding for bovine chymosin, *Gene (Amst.)*. 1982; 19: 127- 138.
- [10] Green ML. *Advances in the microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk* (Eds Davies, FL. and Law, BA.). Applied Science Publication. England. 1984; pp:1-34.
- [11] Hakki A, Uusitalo J, Bailey M, Penttila M, and Knowles JKC. A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology* 1989; 7: 596-603.
- [12] Hidaka M, Sasaki K, Uozumi T, and Beppu T. Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene* 1986; 43: 197-203.
- [13] Housen G, Madsen MT, Harlow KW, Lonblad P, and Foltmann B. The primary structure and enzymatic properties of porcine prochymosin and chymosin. *Int J Biochem Cell Bio*. 1996; 28: 667-675.
- [14] Yang B., Tang B., Zhang S, and Yang K. Assisted refolding of recombinant prochymosin with the aid of protein disulphide isomerase. *Biochem J* 1994; 301: 17- 20.
- [15] Sorensen H.P, and Mortensen K.K, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2005; 115, 113- 128.
- [16] WEI C, Tang B, Zhang Y, and yang H. Oxidative refolding of recombinant prochymosin. *Biochem J* 1999; 340: 345-351.

رسوب وجود داشت وامکان تخلیض به روش غیر دناتورده فراهم گردید این مسئله باید در مراحل بعد بررسی گردد. بنابر این وکتور از لحاظ بیانی مناسب است ولی از نظر ترشچی مناسب نیست. د رادامه طرح بهتر است ژن مورد نظر بدون سیگنال ترشچی و با استفاده از آنزیم *NdeI* به جای *NcoI* در وکتور کلون گردد و یا سیگنال جدیدی طراحی گردد. حذف آگزون ۶ مانع تولید آنزیم فعال نمی شود این فرم از پروتئین درمقایسه با فرم کامل به میزان بیش تری تولید می شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز ملی ژنتیک بدلیل تامین هزینه های این طرح و مسئولان مجله کومش که در جهت هر چه بهتر شدن مقاله از هیچ کوششی دریغ نکردند.

منابع

- [1] Carey NH, Doel MT, Harris TJR, Lowe PA, and Emtage JS. A process for the production of a polypeptide. Patent: 1983; EP 0068691-A 29.
- [2] Danley DE, and Geoghegan KF. Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin. *C. J Biol Chem* 1988; 263: 9785-9789

Production of full length and splicing form of chymosin using pETexpression system in *E-coli* and investigation its enzyme activity and preplasmic secretion

M. Ahmadi Zeydabadi (M.Sc)¹ G. Ahmadian (Ph.D)^{*2}, R. Sorouri (Ph.D)³

1- Emam hossein university, Tehran, Iran.

2- Department of Molecular Genetic, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology Tehran Iran.

3- Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Introduction: Chymosin (Rennin EC 3.4.23.4) is an aspartyl proteinase (the major proteolytic enzyme in the fourth stomach of the unweaned calf) that is formed by proteolytic activation from zymogene prochymosin. The aim of his study was to produce the full length and splicing form of chymosin using pETexpression system in *E-coli* and to assay the activity of expressed enzyme and preplasmic secretion.

Materials and Methods: The sense primer F-prochy(+) (5'-ggggccatgGCTGAGATCACCAGGA) including *NCOI* restriction site). The anti sense R-prochy(-) (5'-ggcgccgcGATGGCTTTGGCCAGC -3') hybridizing to the C-terminal end of calf preprocymosin cDNA and contains an additional *NotI* restriction site at its 5'-end . The cells were disrupted by sonication and proteins were purified by using Ni-NTA beads from Qiagen under native conditional. The preprochymosin and AS6 preprochymosin were activated at pH 4.7. The enzyme solutions were diluted 20-fold with 50 mM phosphate buffer .

Results: Sequencing data analysis showed that the exon six has been spliced out and, therefore the gene product is 114 bp shorter in length, both chymosin forms were expressed together in *E.coli*. Under the same expression conditions, at least AS6 preprochymosin was produced 7-fold high expression in comparison to a full-length recombinant chymosin. Following acid activation and neutralization, the purified fractions were tested in a qualitative milk clotting assay. The clotting activity of preprochymosin and exon6-less preprochymosin were comparable.

Conclusion: High expression of this alternatively expressed transcript in bacteria, and proper folding of the AS6 chymosin protein molecule in the absence of exon six are the two most important aspects distinguished in this research.

Keywords: Preprochymosin; Aspartyl proteinase; Alternatively spliced transcript; In vitro, *E.Coli*

* Corresponding Author. Fax: +98 21 44580395; Tel: +98 9124187608

ahmadian@nigeb.ac.ir