

مقاله پژوهشی

کلونینگ، بیان ژن و خالص سازی کربوکسی پپتیداز جدید از گونه هالوفیل *Bacillus persicus* دریاچه شور آران و بیدگل

سمیرا سپهری^۱، محمودرضا آقامعالی^{۲*}، حسین غفوری^۳، سجاد صاری خان^۳

DOI: 10.22124/japb.2022.22750.1479

تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۱

چکیده

پروتئازهای میکروبی به دلیل کاربرد گسترده در صنایع شوینده، دارویی و فرآوری خوراک دام درصد بالایی از کل بازار آنزیم‌های صنعتی را به خود اختصاص می‌دهند. گونه‌های جنس *Bacillus*، قابلیت بالایی در تولید و ترشح مقادیر بالای آنزیم پروتئاز را دارند که از فعالیت‌های فیزیولوژیک آن‌ها نشأت می‌گیرد. در این مطالعه، ابتدا ژن کد کننده کربوکسی پپتیداز از گونه *Bacillus persicus* به وسیله PCR و با استفاده از آغازگرهای دارای جایگاه‌های برش XhoI و NdeI جدا شد. پس از هضم آنزیمی محصول PCR، قطعه ژن در بین جایگاه‌های مورد نظر در حامل بیانی pET28a⁺ کلون شد و پلاسمید نوترکیب به داخل سویه بیانی (*E. coli* BL21(DE₃)) ترانسفورم شد. پلاسمیدهایی که Colony PCR آنها مثبت بود جهت تایید نهایی برای تعیین توالی ارسال شد. بیان آنزیم نوترکیب تحت شرایط دمایی و در زمان‌های مختلف انجام شد و تخلیص پروتئین مورد نظر از طریق کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگارز صورت پذیرفت. بیشترین سطح بیان در غلظت ۰/۴ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۲۰ ساعت انکوباسیون تعیین شد. وزن مولکولی پروتئین نوترکیب کربوکسی پپتیداز حدود ۵۸ کیلودالتون بود. با توجه به مقدار بالای بیان پروتئین محلول و بهینه‌سازی آسان بیان و خالص‌سازی آن در شرایط آزمایشگاهی، چنانچه فعالیت آنزیمی در حضور سوپستراهای استاندارد به مقدار مناسب باشد و همچنین اگر مطالعات تکمیلی امکان تولید بهینه و به صرفه مقدار بالایی از این آنزیم را در حجم بالا و شرایط نیمه صنعتی نشان دهد، می‌توان امیدوار بود که این آنزیم گزینه مناسبی برای تولید نیمه صنعتی باشد.

واژگان کلیدی: *Bacillus persicus*، پروتئاز، کربوکسی پپتیداز، pET28a⁺

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۳- مربی پژوهشی بانک مولکولی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

آنزیم‌ها به عنوان بیوکاتالیست‌هایی شناخته می‌شوند که بسیاری از واکنش‌های شیمیایی را انجام می‌دهند و به صورت تجاری در غذا، پاک‌کننده‌ها، داروها و صنایع شیمیایی کاربرد دارند. تا به حال چندین هزار نوع آنزیم شناخته شده‌اند (Chellappan et al., 2006). در این بین پروتئازها یکی از پرمصرف‌ترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت هستند. پروتئازها از جمله آنزیم‌های هیدرولیز کننده هستند که پیوند پپتیدی بین دو اسید آمینه در یک زنجیره پپتیدی را می‌شکنند (Asker et al., 2013) و بر اساس بهینه محدودی عملکرد در pHهای مختلف به ۳ نوع اسیدی، خنثی و قلیایی تقسیم می‌شوند (Germano et al., 2003). پروتئازها آنزیم‌هایی با پیشینه تاریخی در کاربردهای غذایی و دارویی هستند و در صنایع دیگری چون چرم‌سازی، شوینده‌های قلیایی و سنتز پپتیدهای زیست فعال کاربرد دارند (Asker et al., 2013). این آنزیم‌ها از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی قابل دسترس هستند، ولی به علت رشد سریع میکروب‌ها و کشت آنها در فضای کم و امکان دستکاری ژنتیکی آنها برای تولید آنزیم‌هایی با خواص جدید، برتری با منابع میکروبی است (De Lourdes Moreno et

al., 2009). از این رو، پروتئازهای میکروبی به دلیل کاربرد گسترده در صنایع شوینده، دارویی، خوراک دام و طیور و صنایع دیگر درصد بالایی از کل فروش آنزیم‌های صنعتی را به خود اختصاص می‌دهند (Gomes and Steiner, 2004). آنزیم پروتئازی که نمک‌دوست باشد نسبت به آنزیم‌های دیگر پایدارتر است. این آنزیم‌ها در محیط‌های دارای غلظت بالای نمک، دمای بالا و شرایط قلیایی، فعال باقی می‌مانند (Setati, 2010). از این رو، به دلیل محبوبیت آنها در کاربردهای بیوتکنولوژی، در صنایع غذایی، نساجی و در مواد شوینده استفاده می‌شوند (Arahal and Ventosa, 2002; Bagheri et al., 2012). پروتئازهای نمک دوست را می‌توان از باکتری‌های نمک‌دوست جداسازی کرد که این باکتری‌ها اغلب از محیط‌های دارای سطوح مختلف نمک از دریایی تا محیط زیست‌هایی مانند زمین‌های نمکی و یا دریاچه‌های نمک جدا می‌شوند (Chaturvedi et al., 2014; George et al., 2014). پروتئازها را نیز بر اساس محل واکنش (اگزوپپتیداز و اندوپپتیداز)، جایگاه فعال و شرایط محیطی واکنش تقسیم‌بندی می‌کنند (Jankiewicz and

دارای (and Sharipova, 2020). ایران دارای محیط‌های بسیار شور متنوع مانند معادن نمک، صحراها و دریاچه‌های بسیار شور است. دریاچه آران و بیدگل (طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۲۹ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۱۴ دقیقه شمالی و به مساحت ۱۸۰۰ کیلومتر مربع) یک دریاچه بسیار شور با pH خنثی است که شوری آن به حد اشباع می‌رسد. مطالعات قبلی در مورد تنوع زیستی دریاچه بسیار شور آران و بیدگل، وجود انواع میکروارگانیسم‌های هالوفیل و بسیار هالوفیل را نشان داده است (Makhdoumi-Kakhki et al., 2009). طی بررسی جمعیت میکروبی دریاچه آران و بیدگل، یک باکتری هوازی، گرم مثبت، هالوفیل به نام *Bacillus persicus* B48 جدا و مشخص شد (Didari et al., 2013).

هدف اصلی این پژوهش، مطالعه کلونینگ، بیان و خالص‌سازی آنزیم متالوکربوکسی پپتیداز از سویه باکتری بومی ایرانی *Bacillus persicus* (IBRC-M 10115) بود. با لحاظ این موضوع که پروتئاز متالوکربوکسی پپتیداز یکی از آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت است، بررسی ویژگی‌های عملکردی این نوع آنزیم مورد توجه است. این آنزیم به طور معمول یک پروتئاز هالوفیلی است که در دمای ۶۰-۳۰ درجه

Bielawski, 2003; Asokan and Jayanthi, 2010; Ghafoor and Hasnain, 2010). کربوکسی پپتیدازها یک گروه از آگروپپتیدازها هستند که اسید آمینه را از انتهای کربوکسی پروتئین و پپتیدها جدا می‌کنند (Sun et al., 2019). کربوکسی پپتیدازها پیوند پپتیدی را از انتهای کربوکسی به پپتیدها و اسیدهای آمینه هیدرولیز می‌کنند که از بسیاری موجودات مشتق و مطالعه شده است. کربوکسی پپتیدازهای M32 یکی از گروه‌های مهم از متالوکربوکسی پپتیدازها هستند که ساختار گرمادوست دارند و دارای یون روی (Zn) در جایگاه فعال خود هستند (Gomis- Ruth et al., 1999).

باکتری‌های جنس *Bacillus* به دلیل فراوانی در محیط، ایمن بودن، کشت آسان و آسانی ایجاد تغییرات ژنتیکی، منبع خوبی برای آنزیم‌ها از جمله پروتئازها هستند. پروتئاز *Bacillus*‌ها دارای چندین ویژگی قابل توجه مانند فعالیت در محدوده گسترده دما و pH، تحمل شرایط قلیایی و ترکیبات سمی (اکسیدانت‌ها و سورفکتانت‌ها) است. به همین جهت این پروتئازها در تولید مواد شوینده، محصولات غذایی، محصولات چرمی، کود شیمیایی و غیره استفاده می‌شوند (Danilova

کمک نرم افزار Oligo Analyzer آغازگرهای مورد نظر طراحی و تولید (Metabion، آلمان) شد.

واکنش PCR برای ژن مورد نظر با استفاده از آغازگر پیشرو TTATATCATATGATGA و آغازگر عقبی ATTCTCAAATAACAGAGAAAG دارای آنزیم محدودگر Nde1 و دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد و همچنین آغازگر پسرو TTATATCTCGAGGGATATTTGGTAT دارای آنزیم محدودگر Xho1 و دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد (جایگاه برش آنزیم محدودالایتر با رنگ زرد مشخص شده است). واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر طبق جدول ۱ انجام شد. شاهد منفی در این مرحله آزمایش نمونه بلانک بود. پس از PCR، بر روی محصول و حامل pET28a⁺ هضم آنزیمی صورت گرفت. مراحل کلونینگ انجام شد و نهایتاً پلاسمید حاوی ژن مورد نظر به داخل باکتری *E. coli* سویه بیانی BL21 انتقال یافت. پس از این مرحله، سلول‌های میزبان بیانی در محیط کشت LB آگار دارای کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند.

سانتی‌گراد، pH ۹-۱۱ و همچنین در محیط‌های دارای غلظت بالای نمک می‌توانند فعال و پایدار باشد. از این رو، با انجام کلونینگ، میزان بیان موفق در سیستم پروکاریوت و خالص‌سازی ژن کربوکسی پپتیداز این سویه، امکان ارزیابی بیشتر روی سوبسترای اختصاصی فراهم خواهد شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا آنزیم‌های مورد نیاز (پلیمراز، محدود الاثر Nde1 و Xho1 (Fermentas، آمریکا))، SDS، EDTA (Sigma، آمریکا)، مواد مورد استفاده در تهیه ژل اکریل آمید و دیگر مواد شیمیایی مورد نیاز (Merck، آلمان) برای انجام آزمایش‌ها فراهم شد. در این پژوهش از باکتری *Escherichia coli* سویه BL21(DE₃) به عنوان میزبان برای کلونینگ و بیان ژن کلون شده استفاده شد.

کلونینگ ژن کربوکسی پپتیداز

ابتدا توالی ژن کدکننده کربوکسی پپتیداز در ژنوم باکتری *Bacillus persicus* شناسایی شد و از آنجا که برای ادامه روند کار، لازم بود ژن در داخل حامل pET28a⁺ کلون شود با

جدول ۱: مراحل مختلف PCR با آغازگرهای دارای جایگاه برش آنزیم

مرحله	عملکرد	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
۱	واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه
۲ (۳۵ چرخه)	واسرشت‌سازی	۹۵	۲۵ ثانیه
	اتصال آغازگر	۵۶	۳۰ ثانیه
	بسط آغازگر	۷۲	۶۰ ثانیه
۳	بسط نهایی آغازگر	۷۲	۱۰ دقیقه

۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۵۰ دور در دقیقه منتقل شد. بعد از رسیدن جذب نوری به ۰/۵، غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside) در دماها (۲۵ و ۳۲ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های متفاوت (۴ و ۲۰ ساعت) بررسی شد. بیان بهینه بر اساس میزان پروتئین تولیدی در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت تعیین شد. سپس در این شرایط بهینه، در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB حاوی کانامایسین کشت داده شد.

سلول‌ها پس از ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Eppendorf, آلمان) و جمع‌آوری شدند. در مرحله بعد رسوب به دست آمده در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار و ایمیدازول ۵ میلی‌مولار حل شد. سپس ۳

برای انتخاب کلونی‌های مثبت، با استفاده از آغازگرهای مختص توالی‌یابی T7Promoter/Terminator واکنش Colony PCR بر روی کلونی‌ها انجام شد. از کلونی‌های حاوی ژن، استخراج پلاسمید انجام گرفت و این پلاسمیدها با مارکر مناسب روی ژل مشاهده شدند. پلاسمیدهای تایید شده با این روش، برای تعیین توالی با آغازگر T7 Promotor و T7 Terminator به شرکت خدمات دهنده (Macrogen، کره جنوبی) ارسال شدند.

بیان پروتئین

ابتدا تک کلونی از باکتری حاوی حامل نوترکیب مورد نظر، در حجم ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت شبانه داده شد. سپس به نسبت ۱:۲۰، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت جدید تلقیح شد و به گرمخانه در دمای

تخلیص پروتئین

میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم به محلول حاصل اضافه شد و به مدت ۰/۵ ساعت به آن زمان داده شد و سپس بر روی یخ سونیکه (Sonicate) (Hielscher, آلمان) شد. این عمل به مدت ۴ دقیقه انجام شد. به این ترتیب که در هر دقیقه ۴۰ ثانیه سلول ها سونیکه می شدند و ۲۰ ثانیه روی یخ می ماندند. بعد از آن، DNase به محلول اضافه و به آرامی ۵ ثانیه مخلوط شد و نیم ساعت به همین حالت ماند. بعد از گذشت زمان مورد نظر با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سلول ها ته نشین شدند. محلول رویی به عنوان پروتئین محلول برداشته شد و روی رسوب سلولی بافر لیز کننده حاوی اوره ۸ مولار اضافه شد و به مدت ۴۰ دقیقه به آن زمان داده شد. بعد از گذشت این زمان، نمونه ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برداشته شد. سپس از همه نمونه ها ۲۰۰ میکرولیتر برداشته و به همراه بافر در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند. برای بررسی بیان پروتئین نو ترکیب نمونه ها بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE بارگذاری و توسط کوماسی بریلیانت بلو-۲۵۰G رنگ آمیزی شدند.

خالص سازی آنزیم به روش کروماتوگرافی تمایلی (Affinity Chromatography) و با استفاده از ستون نیکل آگارز (Nickel-Agarose) انجام شد. آنزیم نو ترکیب بیان شده دارای دنباله هیستیدینی (His6-tag) در انتهای آمین و کربوکسی (N- و C-Terminal) (Terminal) خود است که تمایل زیادی به نیکل دارد و میانکش محکمی با آن برقرار می کند. بدین منظور، ابتدا ستون توسط بافر Equilibration Wash Buffer دارای ۵۰ میلی مولار مونسدیم فسفات، ۵ میلی مولار ایمیدازول و ۰/۲ مولار نمک NaCl به تعادل رسید. سپس عصاره خام بدون سلول به ستون منتقل و به آرامی از روی ستون عبور داده شد. به دنبال آن حذف پروتئین های متصل نشده به ستون به وسیله بافر شستشو (Equilibration Wash Buffer) انجام شد و در آخر برای جداسازی پروتئین های متصل به ستون از بافر جدا کننده (Elution Buffer) که شامل ۵۰ میلی مولار Tris-HCl و ۱ مولار ایمیدازول بود، استفاده شد. رقابت ایمیدازول موجود در این بافر با هیستیدین برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می شود. خلوص و تعیین وزن

جهش است. توالی ژن با شماره دسترسی MW892778 در پایگاه داده GenBank در NCBI ثبت شد.

توالی نوکلئوتیدی ژن کربوکسی پپتیداز توسط نرم‌افزار Bioedit و سایت ExPASy به توالی اسید آمینه ترجمه شد. نتیجه ترجمه (توالی زرد رنگ) در شکل ۲ آورده شده است. بقیه توالی، مربوط به هیس‌تگ و قطعات وکتوری است.

بررسی بیان پروتئین

در بیان پروتئین نوترکیب، در نهایت بهترین شرایط بیان بر اساس میزان پروتئین تولیدی، با غلظت ۰/۴ میلی‌مولار IPTG در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت تعیین شد. بیان آنزیم نوترکیب با ژل SDS-PAGE تایید شد (شکل ۳-الف).

خالص‌سازی پروتئین

در مرحله اول خالص‌سازی به طور کامل انجام شد و پروتئین مورد نظر در غلظت‌های امیدارزول ازستون خارج شد. پروتئین تخلیص شده در محلول رویی، به صورت تک باند با وزن مولکولی ۵۸ کیلو دالتون بر روی ژل مشخص شد (شکل ۳-ب).

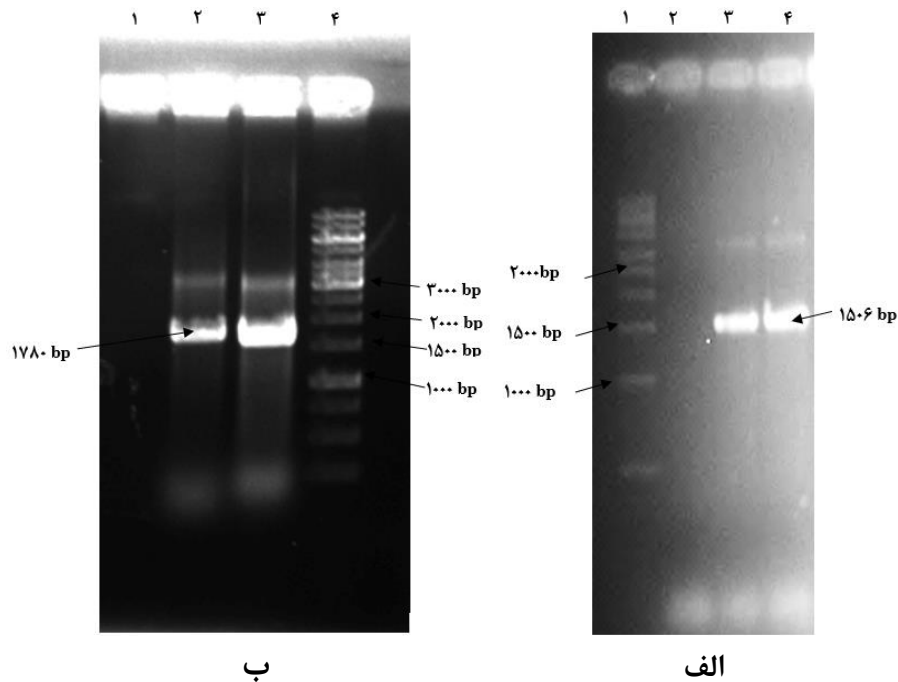
مولکولی نمونه تخلیص شده بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE کنترل شد.

درخت فیلوژنی برای توالی‌های اسید آمینه کربوکسی پپتیداز سویه *B. persicus* به همراه توالی سویه‌های نزدیک که بر اساس Blast در پایگاه داده‌های Uniport به دست آمده بودند، با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 و مدل آماری NJ (نزدیک‌ترین همسایه) و با عدد Bootstrap برابر با ۱۰۰۰۰ رسم شد.

نتایج

کلونینگ ژن کربوکسی پپتیداز

طی واکنش PCR، ژن هدف تکثیر شد که نتیجه آن روی ژل آگارز اندازه ژن را تایید کرد (شکل ۱-الف). توالی ژن مربوط به آنزیم کربوکسی پپتیداز در حامل pET28a⁺ بین دو جایگاه برش NdeI و XhoI قرار گرفته بود. برای تکثیر، پلاسمید مذکور به *E. coli* BL21(DE3) منتقل شد و حضور ژن توسط Colony PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱-ب) و پس از رشد، استخراج پلاسمید صورت گرفت. پس از تایید کلون ژن مورد نظر در پلاسمید pET28a⁺، پلاسمیدهای نوترکیب برای تعیین توالی ارسال شد. نتیجه تعیین توالی ژن مورد نظر بررسی و مشخص شد توالی بدون



شکل ۱: ژل آگارز مراحل کلونینگ ژن متالوکربوکسی پپتیداز در پلاسمید $pET28a^+$ (الف) ژن کربوکسی پپتیداز تکثیر شده با واکنش PCR. ۱: مارکر وزن مولکولی 1 kbp Sigma ; ۲: شاهد منفی؛ ۳ و ۴: ژن تکثیر شده در دو تکرار. (ب) Colony PCR. ۱: کلنی فاقد ژن مورد نظر؛ ۲ و ۳: دو کلنی حاوی ژن مورد نظر؛ ۴: مارکر وزن مولکولی 1 kbp Fermentas .

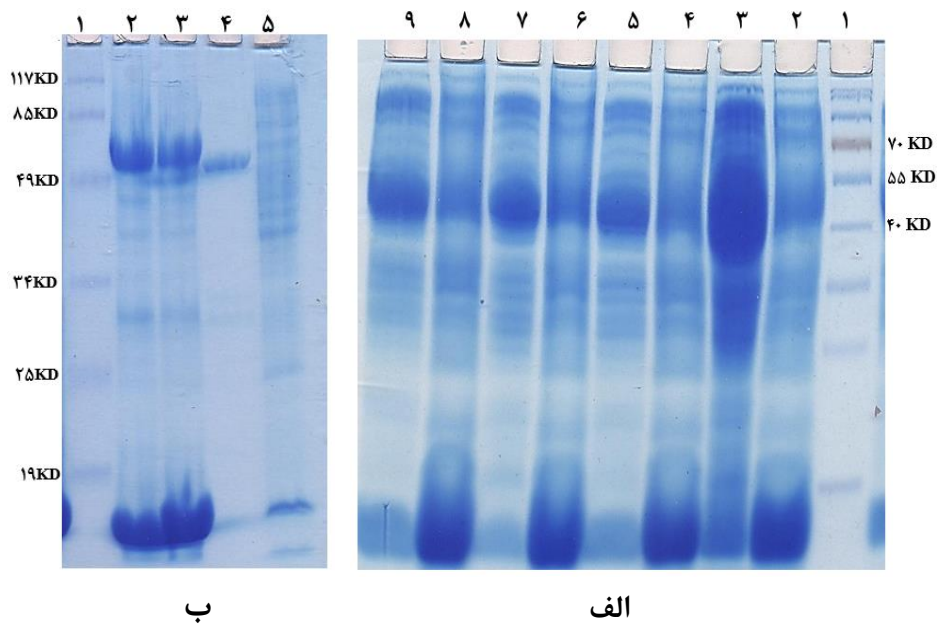
B.per:

```

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMNSQNTKEFLDYVKKMTAYQEALSVLYWDLRTG
APKDGVEQRSEVIGVLSTEIFNMSTSEEMASYITLSSNENLSELVKKTVVEECKKEYER
NKKIPAQEYRDYVILQSKAESVWEEAKANSDFEMFRPYLEKLVETTCKKFIGYWGYYKE
NKYNTLLDMYEPGVTVDVLDHVFGQLRERIVPLVKQIADSPNKPETQFLFEHFPKEKQ
RDFSLKVLEQMGYNFNAGRLDQTVHPFAIGMNPGDVVRVTTKYDEQDFRTAVFGTIHE
GGHALYEQNLKELIGTPLCTGTSMGIHESQSLFYENFVGRNPFWKKNYDLLKQYSD
GQFSDVALEDYCRAINESKPSLIRIEADELTYALHIMIRYEIEKGLFNDEIEVKDLPKIW
NEKYEQYLGVCPEPENDSEGLVQDVHWAGGSFGYFPSYALGYMYAAQFKHAMLRLDP
EFDHLLLEENLKPQEWLTEKVHQFGKLLKQPLEILQSVTGEGLNANYLAEYLTEKYKD
VYQISHHHHHH

```

شکل ۲: توالی اسید آمینه‌های آنزیم کربوکسی پپتیداز (توالی زرد رنگ). بقیه توالی، مربوط به هیس تگ و قطعات وکتوری است.

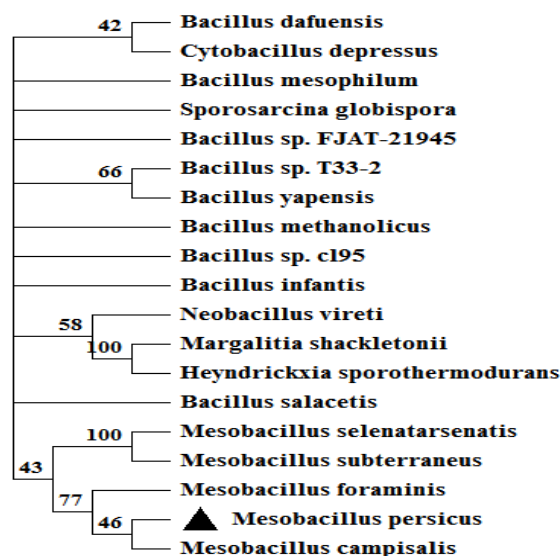


شکل ۳: نتیجه بررسی بیان و خالص سازی کربوکسی پپتیداز. الف) ژل SDS-PAGE بررسی بیان پروتئین کربوکسی پپتیداز در شرایط دمایی و زمانی مختلف: به ترتیب فاز محلول و فاز رسوب پروتئین. ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین؛ ۲ و ۳: دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت؛ ۴ و ۵: دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و زمان ۲۰ ساعت؛ ۶ و ۷: دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت؛ ۸ و ۹: دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و زمان ۲۰ ساعت. ب) ژل SDS-PAGE بررسی خالص سازی پروتئین کربوکسی پپتیداز. ۱: مارکر وزن مولکولی پروتئین؛ ۲: فاز محلول پروتئین؛ ۳: فاز رسوب؛ ۴: آنزیم خالص شده؛ ۵: فاز فلوتروت.

با تجزیه و تحلیل توالی اسیدهای آمینه آنزیم مورد نظر، موتیف HEXXH (Zinc-binding Motif) که طبق مطالعات قبلی به عنوان محل اتصال فلز در متالوکربوکسیدازها است در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از درخت فیلوژنی، توالی اسیدهای آمینه کربوکسی پپتیداز *B. persicus* با احتمال حدود ۸۰ درصد با سویه *Mesobacillus campisalis* قرابت دارد (شکل ۵).

MNSQNTKEFLDYVKKMTAYQEALSVLYWDLRTGAPKDGVEQRSEVIGVLSTEIFN
 MSTSEEMASYITLSSNENLSELVKKTVEECKKEYERNKKIPAQEYRDYVILQSKAES
 VWEEAKANSDFEMFRPYLEKLVETTKKFIGYWGYPENKYNTLLDMYEPGVTVDL
 DHVFGQLRERIVPLVKQIADSPNKPETQFLFEHFPKEKQRDFSLKVLEQMGYNFNA
 RLDQTVHPFAIGMNPGRVVRTKYDEQDFRTAVFGTIHEGGH^۴ALYEQNLSKLIGTP
 LCTGTSMGIHESQSLFYENFVGRNPFWKKNYDLLKQYSDGQFSDVALEDYCRRAINE
 SKPSLIRIEADELTYALHIMIRYEIEKGLFNDEIEVKDLPKIWNEKYEQYLGVCPENDS
 EGVLDVHWAGGSFGYFPSYALGYMYAAQFKHAMLRLDPEFDHLLLEENLKPIQE
 WLTEKVHQFGKLPLEILQSVTGEGLNANYLAEYLTEKYKD VYQIS

شکل ۴: توالی پروتئینی متالوکربوکسی پپتیداز در *Bacillus persicus* موتیف HEXXH که در مطالعات قبلی به عنوان جایگاه اتصال یون‌های فلزی در متالوپروتئاز نشان داده شده است. قرمز: محل اتصال فلز؛ آبی: جایگاه فعال؛ زرد: موتیف HEXXH.



شکل ۵: درخت فیلوژنی برای توالی‌های اسید آمینه کربوکسی پپتیداز سویه *Bacillus persicus* به همراه توالی سویه‌های نزدیک

پروتئازها تعلق دارند (Purohit et al., 2014).

بحث

امروزه منبع اصلی آنزیم‌های مفید در مطالعات

در بین آنزیم‌های صنعتی ۷۵ درصد از نوع

علمی و صنعتی، میکروارگانیسم‌های مختلف

هیدرولیتیک هستند که حدود ۶۰ درصد آنها به

نشان دهد. نتایج مطالعه حاضر تاییدی بر مطالعات انجام شده از جهت دما و زمان بهینه بیان، غلظت مناسب IPTG و وزن مولکولی کربوکسی پپتیدازها است. از جمله کربوکسی پپتیداز B که LISu-Xia و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در *E. coli* BL21 بیان گرفتند و دما و زمان بهینه را برای بیان پروتئین به ترتیب ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۳ ساعت و غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG به دست آوردند و با کروماتوگرافی HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) تخلیص کردند. Mansur و همکارانش در سال ۲۰۰۷ ژن کربوکسی پپتیداز B را از *Pichia pastoris* استخراج کردند، در دما و زمان بهینه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۴۸ ساعت در سویه مخمری *Saccharomyces cerevisiae* بیان گرفتند و سپس با روش کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص کردند. Ghafoori و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۶ بر روی هالو آکالین سرین پروتئاز که یک گونه باکتری نمک‌دوست، *Bacillus iranensis*، است، آزمایش‌هایی انجام دادند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۸ ساعت بیشترین میزان پروتئین را به دست آوردند و آنها نیز به روش کروماتوگرافی تعویض یونی پروتئین را خالص کردند. همچنین Tahirou و

مانند باکتری‌ها و فارچ‌ها هستند (Alvarez et al., 2006). شناسایی تنوع میکروبی، محرک اصلی برای یافتن و شرح محصولات زیستی است. پروتئازهای باکتریایی، اغلب خارج سلولی هستند، براحتی در مقیاس بالا تولید می‌شوند، مقاوم به دماهای بالا و در دامنه وسیع pH فعال هستند. به همین دلیل درک ویژگی‌های پروتئاز هدف، در کاربردهای صنعتی و بیوتکنولوژی، یک دغدغه جدی برای زیست‌شناسان است. متالوکربوکسی پپتیدازها یکی از آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت هستند و بررسی ویژگی‌های عملکردی این نوع از آنزیم‌ها مورد توجه است. از این رو، به طور معمول یک پروتئاز نمک دوست در دمای ۶۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH ۹-۱۱ و همچنین در محیط‌های دارای غلظت بالای نمک می‌تواند فعال و پایدار باشد (Dodia et al., 2008).

در این پژوهش، کلونینگ ژن کربوکسی پپتیداز در سویه *E. coli* BL21 صورت گرفت. شرایط بهینه بیان برای این باکتری نو ترکیب، در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۰ ساعت و غلظت IPTG ۰/۴ میلی‌مولار، به دست آمد و خالص‌سازی نیز بدون هیچگونه مشکلی، توسط کروماتوگرافی نیکل آگارز صورت گرفت که یک باند با وزن مولکولی مشخص حدود ۵۸kD را

با توجه به پژوهش‌های یاد شده، در این پژوهش، افزایش زمان انکوباسیون و پایین آوردن غلظت IPTG باعث تاخوردگی صحیح این پروتئین شد که زنجیره‌های هیستیدینی در خارج پروتئین قرار گرفتند و خالص‌سازی بدون هیچگونه مشکلی توسط کروماتوگرافی نیکل آگارز که روش دقیق‌تری نسبت به کروماتوگرافی تعویض یونی است صورت گرفت.

با توجه به بیان بهینه و تولید مقادیر قابل توجهی از آنزیم مورد نظر که از سویه‌های باکتریایی بومی ایران منشا گرفته‌اند، نتایج حاکی از پتانسیل بالای آنها برای استفاده صنعتی است. نظر به آسانی بیان پروتئین، به نظر می‌رسد که آنزیم تخلیص شده پس از مراحل سنجش عملکرد، انتخاب بسیار مهمی برای مطالعات و بهینه‌سازی بیشتر باشد. همچنین خالص‌سازی آسان آنزیم نشان می‌دهد که تاخوردگی پروتئین در شرایط خوبی است. پس از مراحل پژوهش حاضر، در فاز دوم که شامل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در شرایط مختلف دمایی، غلظت نمک و pH در شرایط رقابتی با آنزیم‌های تجاری موجود است، امکان معرفی این آنزیم به عنوان یک انتخاب مناسب برای استفاده در صنعت داروسازی از جمله Voraxaze (Glucarpidase) وجود دارد که

همکارانش در سال ۲۰۱۶ کربوکسی پپتیداز A را از *Bacillus pumilus* استخراج کردند، در دما و زمان بهینه ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت در *Bacillus subtilis* بیان گرفتند و با His Tag توسط کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگارز خالص کردند. Alizadeh و همکاران در سال ۲۰۲۰ کربوکسی پپتیداز G2 را بیان کردند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۶ ساعت و غلظت ۰/۵ میلی‌مولار IPTG بیشترین سطح بیان پروتئین را به دست آوردند و نهایتاً بعد از استفاده از اوره ۸ مولار برای باز کردن کامل آنزیم، توسط کروماتوگرافی تمایلی نیکل آگارز پروتئین را خالص کردند. Garcia- Guerrero و همکاران در سال ۲۰۱۸ کربوکسی پپتیداز O انسانی (hcpo) را در سلول‌های پستانداران در ۹ روز بیان گرفتند و طی سه کروماتوگرافی شامل کروماتوگرافی HIC، کروماتوگرافی تمایلی و کروماتوگرافی اندازه‌ای تخلیص کردند. اخیراً Song و همکاران در سال ۲۰۲۱ بیشترین میزان بیان پروتئین کربوکسی پپتیداز A (سرین کربوکسی پپتیداز) را در *Pichia pastoris* و دما و زمان بهینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۷۲ ساعت به دست آوردند و توسط کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص کردند.

گرفته از سویه‌های باکتریایی بومی ایران، در صورت داشتن فعالیت آنزیمی قابل توجه، انتخاب مناسبی برای کاربردهای صنعتی در داروسازی باشند. به دست آوردن سطح بالای پروتئین محلول، اولین و مهم‌ترین معیار در فرایند تولید آنزیم نو ترکیب است که در این پژوهش به صورت محلول و فعال در داخل سلول باکتری تولید شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله کمال تشکر را از گروه زیست‌شناسی دانشگاه گیلان و بانک مولکولی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران که در انجام این پژوهش یاری رساندند، ابراز می‌دارند.

می‌تواند متوتروکسات را که یکی از داروهای پرمصرف در شیمی درمانی است و یکی از عوارض جانبی آن نارسایی کلیوی است را به متابولیت‌های غیرفعال خود تبدیل کند و پس از درمان با مقدار بالای متوتروکسات، منجر به حذف آن از مسیر غیرکلیوی شود.

در مجموع، نتایج این پژوهش درباره میزان بیان محلول و خالص‌سازی بهینه، نشان می‌دهد که متالوکربوکسی پپتیداز با منشا *Bacillus persicus* می‌تواند انتخاب مناسبی برای مطالعات بیشتر در زمینه بیوشیمیایی و ساختاری باشد. با توجه به بهینه‌سازی آسان و بیان پروتئین نو ترکیب به مقدار قابل توجه در سیستم *E. coli* می‌توان امیدوار بود که کربوکسی پپتیدازها و در کل پروتئازهای منشا

منابع

- Alizadeh R., Kardani N., Khodakarami A., Khajeh K. and Dabirmanesh B. 2020.** Cloning, expression and characterization of carboxypeptidase G2 enzyme from *Pseudomonas* sp. strain RS-16 in *E. coli*. *Razi Journal of Medical Sciences*, 26(10): 8–18.
- Alvarez V.M., Von Der Weid I., Seldin L. and Santos A.L.S. 2006.** Influence of growth conditions on the production of extracellular proteolytic enzymes in *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 and *Paenibacillus polymyxa* SCE2. *Letters in Applied Microbiology*, 43(6): 625–630.
- Arahal D.R. and Ventosa A. 2002.** Moderately halophilic and halotolerant species of *Bacillus* and related genera. P: 83–99. In: Berkeley R., Heyndrickx M., Logan N. and De Vos P. (Eds.). *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*. John Wiley and Sons, USA.
- Asker M.M., Mahmoud M.G., El Shebwy K. and Abd el Aziz M.S. 2013.** Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(2): 103–109.
- Asokan S. and Jayanthi C. 2010.** Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *Journal of Cell and Tissue Research*, 10: 2119–2123.
- Bagheri M., Didari M., Amoozegar M.A., Schumann P., Sanchez-Porro C., Mehrshad M. and Ventosa A. 2012.** *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 811–816.
- Chaturvedi V., Bhange K., Bhatt R. and Verma P. 2014.** Production of kertinases using chicken feathers as substrate by a novel multifunctional strain of *Pseudomonas stutzeri* and its dehairing application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2): 167–174.
- Chellappan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G. and Chandrasekaran M. 2006.** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(4): 956–961.
- Danilova I. and Sharipova M. 2020.** The practical potential of *Bacilli* and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1–7 (1782).
- De Lourdes Moreno M., Garcia M.T., Ventosa A. and Mellado E.**

2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase-and protease-producing extreme halophile. FEMS Microbiology Ecology, 68(1): 59–71.
- Didari M., Amoozegar M.A., Bagheri M., Mehrshad M., Schumann P., Sproer C., Sanchez-Porro C. and Ventosa A. 2013.** *Bacillus persicus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 1229–1234.
- Dodia M.S., Rawal C.M., Bhimani H.G., Joshi R.H., Khare S.K., and Singh S.P. 2008.** Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35(2): 121–131.
- Garcia-Guerrero M.C., Garcia-Pardo J., Berenguer E., Fernandez-Alvarez R., Barfi G.B., Lyons P.J., Aviles F.X., Huber R., Lorenzo J. and Reverter D. 2018.** Crystal structure and mechanism of human carboxypeptidase O: Insights into its specific activity for acidic residues. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(17): 3932–3939.
- George N., Chauhan P.S., Kumar V., Puri N. and Gupta N. 2014.** Approach to ecofriendly leather: Characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale. Journal of Cleaner Production, 79: 249–257.
- Germano S., Pandey A., Osaku C.A., Rocha S.N. and Soccol C.R. 2003.** Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 32(2): 246–251.
- Ghafoor A. and Hasnain S. 2010.** Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 strain isolated from ornamental plant nursery. Polish Journal of Microbiology, 59(2): 107–112.
- Ghafoori H., Askari M. and Sarikhan S. 2016.** Purification and characterization of an extracellular haloalkaline serine protease from the moderately halophilic bacterium, *Bacillus iranensis* (X5B). Extremophiles, 20(2): 115–123.
- Gomes J. and Steiner W. 2004.** The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. Food Technology and Biotechnology, 42(4): 223–225.
- Gomis-Ruth F.X., Companys V., Qian Y., Fricker L.D., Vendrell J., Aviles F.X. and Coll M. 1999.** Crystal structure of avian carboxypeptidase D domain II: A

- prototype for the regulatory metalloproteinase subfamily. *The EMBO Journal*, 18(21): 5817–5826.
- Jankiewicz U. and Bielawski W. 2003.** The properties and functions of bacterial aminopeptidases. *Acta Microbiologica Polonica*, 52(3): 217–231.
- Makhdoumi-Kakhki A., Amoozegar M.A., Kazemi B., Pasic L. and Ventosa A. 2009.** Prokaryotic diversity in Aran-Bidgol salt lake, the largest hypersaline playa in Iran. *Microbes and Environments*, 27(1): 87–93.
- Mansur M., Martinez L., Perez M., Alonso-del-Rivero M., Marquez I., Proenza Y., Varas L. and Aviles F.X. 2007.** Expression, purification and characterization of porcine pancreatic carboxypeptidase B from *Pichia pastoris* for the conversion of recombinant human insulin. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(3): 476–480.
- Purohit M.K., Raval V.H. and Singh S.P. 2014.** Haloalkaliphilic bacteria: Molecular diversity and biotechnological applications. P: 61–79. In: Parmar N. and Singh A. (Eds.). *Geomicrobiology and Biogeochemistry, Soil Biology*, Vol. 39. Springer, Germany.
- Setati M.E. 2010.** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(11): 1555–1560.
- Song P., Xu W., Zhang Y., Wang F., Zhou X., Shi H. and Feng W. 2021.** A new carboxypeptidase from *Aspergillus niger* with good thermostability, pH stability and broad substrate specificity. *Scientific Reports*, 11(1): 1–10.
- Sun T., Xiao W., Jiang C., Wang J. and Liu Z. 2019.** Producing amino acid fertilizer by hydrolysis of the fermented mash of food waste with the synergy of three proteases expressed by engineered *Candida utilis*. *Bioresource Technology Reports*, 7: 1–8 (100268).
- Su-Xia L., Yu-Jian Z.H.A.N.G., Li-Ping T.I.A.N., Qin-Sheng Y.U.A.N. and Yi G.O.N.G. 2003.** Cloning and expression of a new rat procarboxypeptidase B gene in *Escherichia coli* and purification of recombinant carboxypeptidase B. *Protein and Peptide Letters*, 10(6): 581–590.
- Tahirou T., Zhou J., Rao Z., Huang G., Yang T., Zhang X., and Xu M. 2016.** Cloning, over-expression, and characterization of a new carboxypeptidase A gene of *Bacillus pumilus* ML413 in *Bacillus subtilis* 168. *African Journal of Biotechnology*, 15(17): 684–695.



Research Paper

**Cloning, expression and purification of a novel
carboxypeptidase from a hypersaline lake halophilic
*Bacillus persicus***

Samira Sepehri¹, Mahmoud Reza Aghamali^{2*}, Hossein Ghafouri², Sajjad Sarikhan³

DOI: 10.22124/japb.2022.22750.1479

Received: September 2022

Accepted: November 2022

Abstract

Microbial proteases have a large portion of the market of industrial enzymes, because of their wide application in detergents, drug enzymes and animal feed processing. *Bacillus* strains potentially produce a significant quantity of proteases, due to their physiological properties. In this study, first, the gene encoding carboxypeptidase from *Bacillus persicus* was isolated by PCR and using primers with NdeI and XhoI restriction sites. After digestion of the PCR product, it was cloned into the appropriate site at PET28a⁺ vector, then recombinant plasmids transformed into *E. coli* BL21(DE₃) strain. Plasmids with positive colony PCR result were sent for sequencing for final confirmation, then, recombinant enzyme expression was optimized at different temperature and time conditions, then purified with nickel embedded agarose affinity chromatography. IPTG concentration of 0.4mM at 32°C and incubation time of 20 hours provided the maximum amount of enzyme expression. Molecular weight of the carboxypeptidase was estimated approximately 58KDa. Considering the high amount of expression of the soluble protein and the easy optimization of its expression and purification in laboratory conditions, if the enzyme activity in the presence of standard substrates is adequate, and also if additional studies show the possibility of optimal and cost-effective production of a high amount of this enzyme in a large volume and pilot conditions, it can be hoped that this enzyme is a suitable option for industrial purposes.

Key words: *Bacillus persicus*, Protease, Carboxypeptidase, pET28a⁺.

1- M.Sc. Student of Biochemistry, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Associate Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

3- Scientific Member in Molecular Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC), Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran.

*Corresponding Author: aghamaali@guilan.ac.ir

