

بهینه‌سازی شرایط بیان آنزیم کیتیناز ۴۲ کایمیری در میزبان پروکاریوتی و مقایسه فعالیت آن با آنزیم کیتیناز ۴۲

سهیلا مطرودی^۱، محمد رضا زمانی^{۱*} و مصطفی مطلبی^۱

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

^۲ خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۳

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۷

چکیده

آنزیمهای کایمیری از جمله پروتئینهای مهندسی شده می‌باشند که از تغییر در ساختار آنزیمها به دست می‌آیند. آنزیمهای کیتینازی به دلیل توانایی در تجزیه ترکیبات کیتینی، در تولید پروتوپلاست قارچی، تبدیل زیستی *shellfish waste* به بخشهای تک جزئی، تولید الیگوساکاریدها و کنترل قارچهای بیماریزا حائز اهمیت می‌باشند. در این تحقیق پس از تکثیر ناحیه (chitin binding domain) ChBD کیتیناز B باکتری *Serratia marcescens* و cDNA ژن کیتیناز ۴۲ قارچ *Trichoderma atroviride* (فاقد ChBD) با استفاده از آغازگرهای همپوشان، کیتیناز کایمیری با استفاده از روش SOEing PCR تکثیر و در ناقل بیانی همسانه-سازی شد. سازه بیانی نوترکیب حاصل ابتدا به میزبان بیانی پروکاریوتی منتقل و سپس بهینه‌سازی بیان پروتئین مورد نظر در این میزبان، با استفاده از روش تاگوچی انجام شد. اثر عواملی مانند غلظت IPTG، دمای انکوباسیون و مدت زمان انکوباسیون پس از القاء، بر بیان کیتیناز کایمیری بررسی شد. با توجه به آرایه‌های متعامد تاگوچی در ۳ عامل و ۴ سطح، ۱۶ آزمایش طراحی شد. پس از انجام این آزمایشها پروتئین تام از سلول استخراج و در ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از SDS-PAGE با استفاده از نرم افزار Total lab کمی شده و سپس با استفاده از برنامه Qualitek-4 تجزیه و تحلیل شد. نتایج حاصل نشان داد که در بین عوامل مختلف، غلظت IPTG بیشترین اثر را بر بیان پروتئین کیتیناز کایمیری دارد. بهترین شرایط بیان برای پروتئین کیتیناز کایمیری به ترتیب IPTG با غلظت یک میلی‌مولار، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: بیان پروکاریوتی، تست تاگوچی، کیتیناز کایمیری، chitin binding domain

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۷۸۷۳۰۳، پست الکترونیکی: zamani@nigeb.ac.ir

مقدمه

آنزیمهای کیتیناز را برحسب تشابه در توالی اسیدهای آمینه، که معیاری از تشابه در شکل گیری فضایی مولکولهاست، در پنج دسته تقسیم‌بندی می‌کنند. این پنج گروه، خود بر اساس ساختار کاتالیتیک دومین کیتینازها در گروه خانواده-های ۱۸ و ۱۹ گلیکوزید هیدرولازها و کیتینازهای قارچی در خانواده ۱۸ گلیکوزید هیدرولازها قرار دارند (۲، ۹، ۱۷ و ۲۷).

کیتین پلیمری خطی از واحدهای N-acetylglucosamine است که با پیوندهای 1,4-β به یکدیگر متصل شده‌اند (۱). آنزیمهای کیتیناز به دلیل توانایی در تجزیه ترکیبات کیتینی، در تولید پروتوپلاست قارچی، تبدیل زیستی *shellfish waste* به بخشهای تک جزئی و تولید الیگوساکاریدها استفاده می‌شوند (۱۳، ۲۴، ۳۲ و ۳۴). همچنین کیتینازها می‌توانند از عوامل مؤثر در کنترل بیولوژیک قارچهای بیماری زای گیاهی محسوب شوند.

آنزیم‌های کیتیناز قارچی، با تجزیه کیتین موجود در دیواره قارچ‌های بیماری‌زا و تجزیه ساختمان آن، در کنترل بیولوژیک قارچ‌های مهاجم نقش مهمی دارند. این اثر در فعالیت کنترل بیولوژیکی قارچ رشته‌ای *Trichoderma sp.* به وضوح مشاهده می‌شود (۲۳).

مطالعه آنزیم‌های کیتینازی در گونه *T. harzianum* نشان می‌دهد که پس از رشد قارچ در محیط حاوی کیتین، آنزیم کیتیناز ۴۲ (Chit42) بیشترین میزان تولید را در میان سایر آنزیم‌های هیدرولیز کننده کیتین به خود اختصاص می‌دهد (۷).

آنزیم‌های کیتینازی قادرند گیاهان زراعی را از آلودگی به قارچ‌های بیماری‌زا، از طریق هیدرولیز کردن کیتین موجود در دیواره های سلولی حاوی کیتین حفاظت کنند. آنزیم Chit42 قارچ رشته‌ای *T. harzianum* مانند سایر آنزیم‌های کیتینازی که توسط این قارچ ترشح می‌شوند به دلیل پتانسیل مناسب آن در بیوکنترل علیه عوامل بیماری‌زا گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفته است. این آنزیم به صورت مونومری با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون بوده و به طور اختصاصی بین واحدهای قندی دوم و سوم از انتهای احیاکننده سوبسترا را تجزیه می‌کند (۳).

گزارش‌های اولیه نشان می‌دهد که توالی دومین اتصال به کیتین (Chitin Binding Domain=ChBD) با اتصال به کیتین در افزایش فعالیت آنزیم مؤثر می‌باشد (۸ و ۲۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهند که فرآیند اتصال به کیتین و عمل کاتالیتیک آنزیم مستقل از هم صورت می‌گیرد (۲۱ و ۲۲). ChBD با نزدیک‌تر کردن آنزیم به سوبسترا اثر آنزیم را افزایش می‌دهد. گونه‌های قارچی تولیدکننده کیتینازهای هیبرید فعالیت ضد قارچی بالاتری نسبت به گونه‌های تولید کننده آنزیم‌های غیر هیبرید نشان داده‌اند. این افزایش فعالیت، بیشتر به دلیل وجود کیتین نامحلول در دیواره سلولی قارچ‌ها می‌باشد (۱۹).

ژنهای زیادی از قارچ‌ها در میزبانهای *E. coli* مخمر، قارچ‌های رشته‌ای و گیاهان بیان شده‌اند. بیان *ech42* کد کننده اندوکیتیناز قارچ *T. harzianum* در *E. coli* انجام و فعالیت کیتینازی نشان داده است (۶). همچنین آنزیم کیتیناز بیان شده در سیستم پروکاریوتی، فعالیت ضد قارچی علیه قارچ بیماری‌زا *Sclerotinia rolfisii* لوبیا را از خود نشان داده است (۲۹). آنزیم‌های کیتینازی را می‌توان برای تبدیل زیستی shellfish waste به بخش‌های تک جزئی و تولید کیتوالیگوساکاریدها استفاده نمود. این ترکیبات به عنوان محرک‌های سیستم دفاعی گیاه، سیستم انتقال پیام در تشکیل جوانه ریشه و در پزشکی کاربرد دارند (۱۸). لذا بهینه‌سازی شرایط تولید این آنزیم‌ها جهت دسترسی به میزان مناسب آنزیم به منظور بررسی توانمندبهای آنها ضروری می‌باشد.

روش تاگوچی، روش سودمندی است که با استفاده از آن می‌توان اطلاعات کافی مورد نیاز برای بهینه‌سازی مراحل مختلف با استفاده از حداقل پارامترهای ممکن در آزمایش‌ها را به دست آورد (۱۱، ۱۶ و ۳۱).

در این تحقیق کیتینازکایمیری طراحی، تکثیر و پس از همسانه‌سازی در وکتور بیانی، به میزبان پروکاریوتی منتقل گردید. بهینه‌سازی بیان پروتئین مورد نظر در میزبان پروکاریوتی، با استفاده از روش تاگوچی انجام شد. برای این منظور غلظت IPTG، دمای انکوباسیون، مدت زمان انکوباسیون پس از القاء بر بیان کیتینازکایمیری به عنوان عوامل مؤثر بر بیان در نظر گرفته شد. در این روش پروتئین تام از سلول استخراج و در ژل SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از SDS-PAGE با استفاده از نرم افزار Total lab کمی شده و سپس با استفاده از برنامه Qualitek-4 تجزیه و تحلیل شد.

مواد و روشها

سویه های باکتریایی و پلاسمید: سویه *E. coli* DH5a از

طراحی و ساخت ژن کیتیناز کایمری: به منظور اتصال ChBD (۲۲۵ جفت باز) به Chit42 (۱۲۷۲ جفت باز) از روش overlap extension PCR (SOEing PCR) استفاده شد (۱۴). در این روش از آغازگرهای همپوشان (FchBD2/R42) و آغازگرهای اختصاصی ابتدای ژن Chit42 و انتهای ChBD به ترتیب (Chs5/RchBD2) استفاده گردید (جدول ۱). برنامه SOEing PCR شامل دو لوپ، لوپ ۱ شامل ۷ سیکل، مرحله واسرشت دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه می‌باشد. در لوپ ۲ شامل ۳۰ سیکل، مرحله واسرشت دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه می‌باشد. غلظت مواد مورد استفاده در واکنش‌های PCR عبارت است از دو میلی‌مولار $MgSO_4$ ، ۱۰ پیکو مول غلظت هر یک از آغازگرها، یک یونیت از آنزیم پلی‌مراز *Pfu*، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP.

شرکت فرمنتاز آلمان خریداری و به منظور تهیه سلولهای مستعد، سپس نگهداری پلاسمیدها در آن مورد استفاده قرار گرفت. برای بیان در سیستم پروکاریوتی نیز از سویه *E. coli* strain BL21(DE3) استفاده شد. جهت رشد این باکتریها از محیط کشت Luria Bertani استفاده شد. پلاسمید pET-26b(+) به منظور بیان در سیستم پروکاریوتی از شرکت Novagen آلمان تهیه شد.

آنزیمهای DNA پلیمرازی *Taq* و *Pfu*، آنزیمهای محدودالتر *XhoI* و *XbaI* و آنزیم DNA لیگاز T4 از شرکت فرمنتاز آلمان تهیه شدند.

مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

تهیه محیط کشت حاوی کیتین آگار: محیط نمکی حاوی ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۰/۲ گرم KH_2PO_4 ، ۱/۶ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۲ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱ گرم $NaCl$ ، ۰/۱ گرم $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ در یک لیتر به همراه ۱/۲ درصد کیتین کلونیدی، ۱/۵ درصد گلوکز و ۱۰ درصد آگار تهیه شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی
FchBD2	5'-CgAAgCggTCTCAACgACTACgACgACgCCAgC-3'
R42	5'-gTCgTCgTAgTCgTTgAgACCgCTTCggATgTT-3'
Chs5	5'-ggAAgACAACATgTCTCCTgTAACTgCAAACg-3'
RchBD2	5'-CgCTCgAgCgCCAggCggCCCAC-3'

واکنش به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. برای سنجش میزان N-استیل گلوکزآمین آزاد شده در طول واکنش، پس از افزودن ۱۰۰ μ l بافر پتاسیم تترا بورات (۰/۸ مولار)، مخلوط حاصل، به مدت ۳ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. پس از این مرحله با افزودن ۳ml واکنش‌گر DMAB (۱۰ درصد)، محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس جذب نوری محلول، در طول موج ۵۴۴nm خوانده شده است. هر واحد فعالیت آنزیمی (U)، عبارت از میزان فعالیتی از آنزیم

سنجش فعالیت کیتینازی: برای سنجش فعالیت آنزیمهای کیتیناز، مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۲۵۰ μ l محلول آنزیمی و ۲۵۰ μ l محلول سوبسترا در بافر (۳/۸ میلی‌گرم کیتین کلونیدی در بافر سیترات)، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. آزمایش در چهار تکرار انجام شد در حالی که یکی از تکرارها قبل از افزودن محلول سوبسترا، فعالیت آنزیمی آن با قرار دادن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد متوقف شد. پس از زمان انکوباسیون، جهت توقف واکنش آنزیمی، مخلوط

آنزیم کیتیناز ۴۲ (Chit42) در فعالیت آنتاگونیستی قارچ *T. harzianum* در مقایسه با سایر آنزیم‌های این قارچ از نقش مهمی برخوردار می‌باشد (۱۹). این آنزیم فاقد توالی دومین متصل شونده به کیتین (chBD) می‌باشد. این توالی می‌تواند یک ساختار تونل‌مانندی ایجاد کند که با ساختار پلیمری سوبسترا (کیتین) اثر متقابل مطلوبی را ایفا نموده و باعث افزایش راندمان تجزیه کیتین توسط آنزیم شود (۱۲ و ۳۳). مطالعات مختلفی نشان می‌دهد که توالی ChBD در سایر آنزیم‌های کیتینازی هم نقش مهمی در اتصال آنها به سوبسترای کیتین کریستالی داشته و باعث افزایش فعالیت آنزیمی آنها می‌گردد (۲۰ و ۳۳). در این تحقیق به منظور افزایش فعالیت آنزیم Chit42 قارچ *T. atroviride* اقدام به افزودن ChBD به انتهای کربوکسیل (C-terminal) آن شد. بدین منظور پس از تکثیر ناحیه ChBD کیتیناز B باکتری *S. marcescens* و ژن کیتیناز ۴۲ قارچ *T. atroviride* (فاقد ChBD) با استفاده از آغازگرهای همپوشان، کیتیناز کایمری توسط SOEing PCR تکثیر و در ناقل بیانی pET26b(+) همسانه‌سازی و به میزان بیانی *E. coli* BL21-DE3 منتقل شد. صحت تکثیر کیتیناز کایمری در کلنی‌های نوترکیب حاصل، با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی (*Xba*I و *Xho*I) تأیید گردید (شکل ۱). همچنین همسانه‌سازی ژن مذکور به طور صحیح در قالب خواندن (ORF)، توسط تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت (داده‌ها نشان داده نشده است). سازه تأیید شده به نام pETSM3 نام گذاری شد.

به منظور اطمینان از بیان صحیح پروتئین کایمری در میزان پروکاریوتی از روش‌های تست پلیت و رنگ‌سنجی استفاده شد. در روش تست پلیت تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنیا نشان دهنده بیان آنزیم کایمری نوترکیب در کلنی‌های مورد مطالعه و تجزیه کیتین کلوئیدی موجود در محیط می‌باشد. اندازه هاله‌های تشکیل شده به میزان بیان ژن نوترکیب در این کلنیا بستگی دارد (شکل ۲).

که در طول یک ساعت واکنش، در دما و pH مشخص، یک میکرومول N-استیل گلوکز آمین یا الیگومرهای آن را آزاد کند.

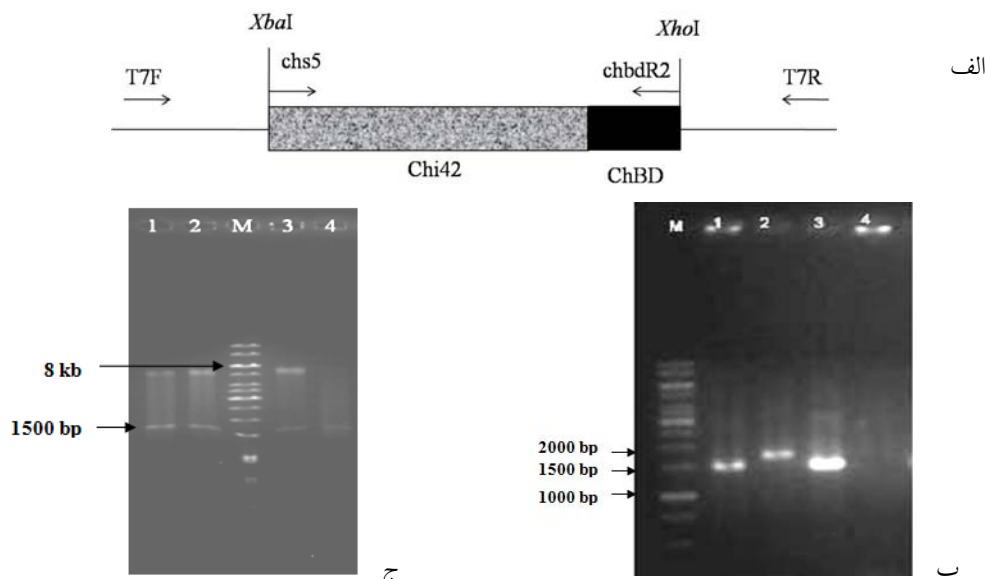
روش طراحی آزمایش تاگوچی: در این تحقیق برای تعیین شرایط بهینه بیان پروتئین کیتیناز کایمری از روش تاگوچی استفاده شده است. برای طراحی و اجرای آزمایش‌ها جدول آرایه‌های متعامدی برای سه عامل در چهار سطح تهیه شد. این جدول برای وضعیتهای مختلف آزمایشی قابل استفاده است. هر ستون به یک عامل و هر ردیف به یک آزمایش تعلق دارد. ترتیب انجام آزمایشها بر اساس اصول آماری باید تصادفی باشد. بنابراین الگوی انجام آزمایشها به سه عامل در چهار سطح ثابت خواهد بود. آزمایشها مطابق جدول ۳ انجام شد.

کلنی نوترکیب در محیط LB مایع حاوی $50 \mu\text{g/ml}$ کانامایسین در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و بر اساس آزمایشهای طراحی شده کشت داده شدند. پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶، IPTG در شرایط استریل اضافه شده و در شیکر انکوباتور نگهداری شدند.

پس از اتمام زمان انکوباسیون مقدار ۱/۵ میلی لیتر از هر کدام از لوله‌های کشت درون میکروتیوبهای ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و به کمک سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سلولها جمع شدند.

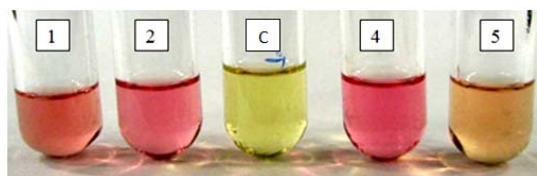
سلولهای جمع شده مستقیماً با Sample Buffer با رقت 2.5X مخلوط و پس از جوشانیدن به مدت ۵ دقیقه در ژل اکریل آمید دناتوره ۱۲ درصد (SDS-PAGE) الکتروفورز شد (۴). پس از الکتروفورز، ژل اکریل آمید اسکن شده و برای کمی کردن داده‌ها از نرم‌افزار Total Lab v1.1 استفاده شد. همچنین برای طراحی آزمایش و آنالیز آماری داده‌ها Qualitek-4 استفاده گردید.

نتایج و بحث

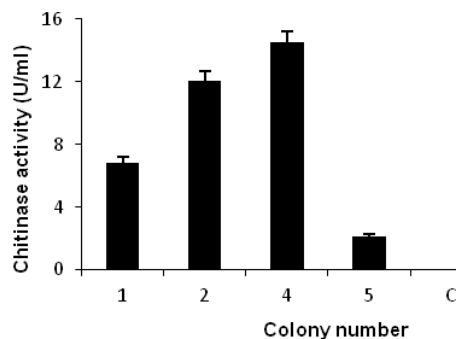


شکل ۱- تایید سازه بیانی نوترکیب pETSM3 الف) طرح شماتیک ژن کیتینازکایمیری، آغازگرهای مورد استفاده و همچنین جایگاه آنزیم‌های برشی؛ ب) محصول PCR حاصل از پلاسمیدهای نوترکیب pETSM3 به عنوان DNA الگو، ۱- محصول PCR حاصل از استفاده از آغازگرهای chbdr2 به عنوان DNA الگو، ۲- محصول PCR حاصل از استفاده از آغازگرهای یونیورسال (T7F/T7R)، ۳- کنترل مثبت (آغازگرهای chs5/ chbdr2 به pUCSM2 به عنوان DNA الگو)، ۴- محصول PCR حاصل از پلاسمید pET26b(+) فاقد ژن کیتیناز) به عنوان DNA الگو و آغازگرهای دو سر ژن (کنترل منفی) چ) pETSM3 هضم شده با آنزیم‌های محدودالانتر؛ ۱، ۲ و ۳- محصول حاصل از هضم آنزیمی با آنزیمهای *XhoI* و *XbaI*، ۴- محصول PCR حاصل از استفاده از آغازگرهای chs5/ chbdr2، M- مارکر 1kb Ladder. (اندازه قطعات مورد انتظار می‌باشد)

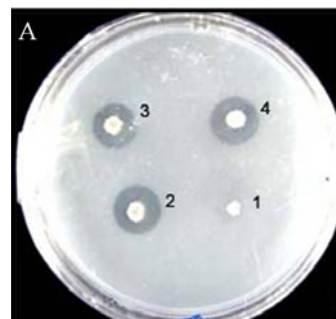
الف



ب



شکل ۳- بررسی بیان و فعالیت آنزیم کیتینازکایمیری در کلنی‌های به دست آمده از میزبان پروکاریوتی با استفاده از واکنش رنگ سنجی. الف) لوله‌های شماره ۱، ۲، ۴ و ۵ نمونه‌هایی از کلنی‌های حاوی ژن نوترکیب و لوله C، کلنی حاوی ناقل فاقد ژن نوترکیب، به عنوان نمونه کنترل منفی. ب) میزان فعالیت آنزیمی در کلنی‌های مورد بررسی



شکل ۲- بررسی بیان و فعالیت آنزیم کیتینازکایمیری در کلنی‌های به دست آمده از میزبان پروکاریوتی با استفاده از تست پلیت. هاله شفاف تشکیل شده در اطراف هر کلنی نشان دهنده تولید و فعالیت آنزیم کیتینازی می‌باشد. ۱، کلنی حاوی ناقل فاقد ژن (شاهد منفی)، ۲، ۳ و ۴ نمونه‌هایی از کلنی‌های نوترکیب

نتایج به دست آمده از روش رنگ سنجی نیز فعال بودن آنزیم کیتینازکایمیری نوترکیب را در این کلنیها نشان داد. کلنی شماره ۴ با فعالیت آنزیمی ۱۴/۵ U/ml دارای بیشترین میزان تولید آنزیم می‌باشد (شکل ۳). از میزبان حاوی ناقل بیانی فاقد ژن (empty vector) نیز به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

همچنین Zarei و همکاران (۲۰۱۰) نیز از این روش برای بهینه‌سازی بیان ژن کیتیناز در باکتری *S. marsescens* استفاده نمودند (۳۵). بر اساس متغیرهای در نظر گرفته شده، روش تاگوچی ۱۶ آزمایش مستقل را طراحی می‌نماید (جدول ۳). پس از انجام این آزمایشها، پروتئین تام از باکتریها استخراج و توسط SDS-PAGE بررسی شد. نتایج حاصل از SDS-PAGE با استفاده از نرم افزار Total Lab آنالیز و در شکل ۴ ارائه شده است. این نرم‌افزار میزان بیان پروتئین کایمیری در SDS-PAGE را نسبت به یک باند پروتئینی مرجع محاسبه می‌کند. پس از آنالیز و کمی کردن داده‌ها نتایج حاصل با برنامه Qualitek-4 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اثرات اصلی مربوط به سطوح مختلف هر عامل محاسبه شد (جدول ۴). با تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از روش تاگوچی، میزان تأثیر هر عامل بر میزان بیان پروتئین نوترکیب تعیین می‌گردد.

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از روش تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد که نتایج آن در جدول ۵ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود میزان تأثیر دمای انکوباسیون و غلظت IPTG از میزان تأثیر مدت زمان انکوباسیون بیشتر می‌باشد.

در آزمایش شماره ۱۶ جدول ۳ نشان داده شده است که بهترین شرایط برای به حداکثر رساندن میزان بیان پروتئین نوترکیب در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۶ ساعت انکوباسیون، غلظت یک میلی‌مولار از IPTG می‌باشد. پروتئین تولید شده در شرایط مذکور توسط SDS-PAGE در شکل ۵ ارائه شده است.

پس از آنالیز نتایج آزمایشهای ۱۶ گانه برای تعیین شرایط بهینه از آنالیز Bigger the better روش تاگوچی استفاده شد. سطح مطلوب و میزان هر یک از عوامل تحت شرایط بهینه در جدول ۶ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود، غلظت IPTG نسبت به دیگر فاکتورها دارای تأثیر بیشتری در بیان پروتئین نوترکیب

باکتری *E. coli* میزان مناسبی برای بیان پروتئین هترولوگ می‌باشد. عوامل مختلفی از قبیل: میزان بالای بیان پروتئین هترولوگ، کم هزینه بودن و رشد سریع از جمله مزایای بیان در این میزبان می‌باشد (۲۵ و ۲۶). برای به دست آوردن پروتئین بیان شده به میزان زیاد در *E. coli* بهینه‌سازی شرایط بیان پروتئین هترولوگ ضروری است (۲۸).

جهت بهینه‌سازی بیان کیتیناز کایمیری در سیستم باکتریایی، طراحی آزمایشها براساس روش آماری تاگوچی صورت گرفت. پیش از طراحی، متغیرهای مؤثر بر بیان پروتئین شناسایی شده و سطوح آنها تعیین شدند. هدف از استفاده از روش تاگوچی، تشخیص تأثیر هر یک از متغیرها بر تولید پروتئین کایمیری، بررسی تأثیر متقابل متغیرها، تعیین شرایط بهینه و تخمین میزان تولید پروتئین کایمیری تحت شرایط بهینه می‌باشد. در این راستا، تأثیر سه متغیر شامل: غلظت IPTG به عنوان یکی از متداولترین القاء کننده‌ها (۵) (بر حسب میلی‌مولار)، دمای انکوباسیون (بر حسب درجه سانتی‌گراد) و زمان انکوباسیون (بر حسب ساعت) هر کدام در چهار سطح (جدول ۲) بر تولید پروتئین کایمیری مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشها در محیط مایع LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و هوادهی توسط شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه انجام شد.

جدول ۲- عوامل و سطوح مورد بررسی در طراحی آزمایش تاگوچی

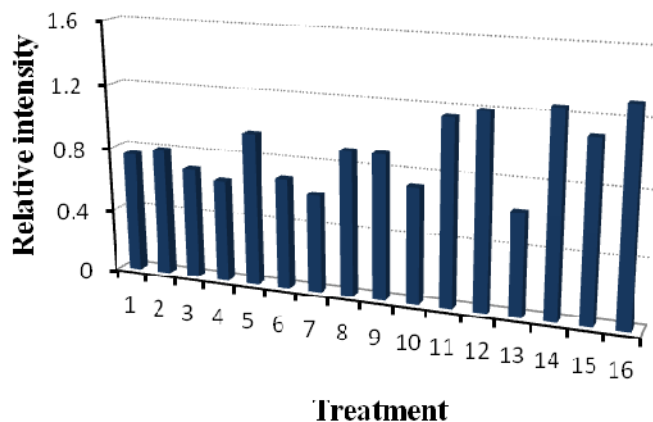
سطح عامل	۱	۲	۳	۴
غلظت IPTG (mM)	۰/۲	۰/۵	۰/۷	۱
دمای انکوباسیون (°C)	۲۵	۲۸	۳۲	۳۷
زمان انکوباسیون (h)	۲	۴	۶	۱۶

با استفاده از روش تاگوچی می‌توان فاکتورهای متعددی را به صورت همزمان مورد ارزیابی قرار داد (۱۵ و ۳۰). Ghane و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از این روش بیان پروتئین اینترفرون بتا در میزبان *E. coli* را بهینه کردند (۱۰).

می باشد (جدول ۶).

آزمایش شماره ۱۶ روش تاگوچی (جدول ۳) می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که طراحی آزمایش جهت بهینه‌سازی تولید آنزیم کیتینازکایمیری مناسب می‌باشد.

میزان تولید پروتئین در جدول ۶ با میزان پروتئین به دست آمده در شرایط بهینه با یکدیگر مقایسه شد و در شرایط بهینه پیش‌بینی شده (۱/۳۰۳) برابر میزان پروتئین حاصل از



شکل ۴- بهینه‌سازی بیان ژن کیتینازکایمیری با استفاده از تست تاگوچی. نتایج حاصل از آنالیز ۱۶ تیمار حاصل از تست تاگوچی با استفاده از نرم افزار

TotalLab

جدول ۳- آزمایشات انجام شده مطابق با جدول آرایه‌های متعامد تاگوچی و عوامل و سطوح انتخابی

آزمایش	غلظت IPTG (mM)	زمان انکوباسیون (h)	دمای انکوباسیون (°C)	نتایج حاصل از انجام آزمایش
۱	۰/۲	۲	۲۵	۰/۷۶
۲	۰/۲	۴	۲۸	۰/۸
۳	۰/۲	۶	۳۲	۰/۷
۴	۰/۲	۱۶	۳۷	۰/۶۴
۵	۰/۵	۲	۲۸	۰/۹۵
۶	۰/۵	۴	۲۵	۰/۶۹
۷	۰/۵	۶	۳۷	۰/۶۱
۸	۰/۵	۱۶	۳۲	۰/۹
۹	۰/۷	۲	۳۲	۰/۹
۱۰	۰/۷	۴	۳۷	۰/۷۲
۱۱	۰/۷	۶	۲۵	۱/۱۵
۱۲	۰/۷	۱۶	۲۸	۱/۲
۱۳	۱	۲	۳۷	۰/۶۳
۱۴	۱	۴	۳۲	۱/۲۵
۱۵	۱	۶	۲۸	۱/۱
۱۶	۱	۱۶	۲۵	۱/۳

جدول ۴- اثرات اصلی عوامل مؤثر بر میزان بیان پروتئین نوترکیب

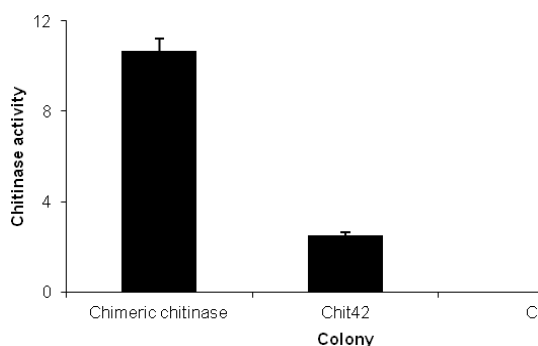
عوامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
۱ غلظت IPTG (mM)	۰/۷۲۵	۰/۷۸۷	۰/۹۹۲	۱/۰۶۹
۲ دمای انکوباسیون (°C)	۰/۸۱	۰/۸۶۵	۰/۸۸۹	۱/۰۰۹
۳ زمان انکوباسیون (h)	۰/۹۷۴	۱/۰۱۲	۰/۹۳۷	۰/۶۴۹

جدول ۵- نتیجه آنالیز واریانس (ANOVA) و تحلیل نتایج برای بهینه کردن شرایط بیان پروتئین نوترکیب

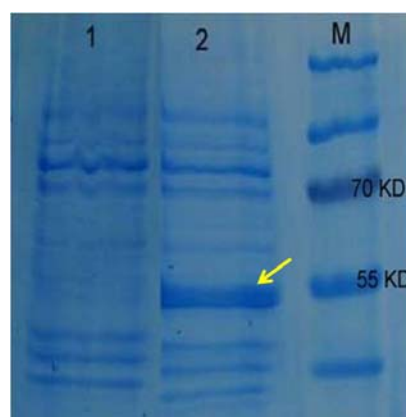
Col# / Factor	DOF (F)	Sum of Sqrs. (S)	Variance (V)	F - Ratio (F)	Pure Sum (S')	Percent P(%)
1 IPTG (mM)	3	.322	.107	6446.497	.322	43.785
2 Time (h)	3	.085	.028	1709.507	.085	11.606
3 Temperature (C)	3	.328	.109	6562.501	.328	44.573
Other/Error	6	0	0			0.036
Total:	15	.736				100.009

جدول ۶- شرایط بهینه پیش‌بینی شده در روش تاگوجی برای بیان پروتئین نوترکیب

Column # / Factor	Level Description	Level	Contribution
1 IPTG (mM)	1	4	.176
2 Time (h)	16	4	.116
3 Temperature (C)	28	2	.118
Total Contribution From All Factors...			409
Current Grand Average Of Performance...			893
Expected Result At Optimum Condition...			1303



شکل ۶- میزان فعالیت آنزیمی در کلنی‌های حاوی ژنهای کیتینازکایمیری و کیتیناز ۴۲ در حضور کیتین کریستالی و توجه به تولید آنزیمهای کیتینازی در شرایط بهینه به دست آمده و به منظور ارزیابی نقش ChBD اضافه شده به انتهای آنزیم Chit42، مقایسه فعالیت آنزیمی کیتینازکایمیری



شکل ۵- بیان کیتینازکایمیری پس از بهینه سازی با استفاده از SDS-PAGE ۱۲ درصد با رنگ آمیزی کوماسی بلو. ۱- نمونه قبل از القاء، ۲- نمونه بعد از القاء در شرایط بهینه، M - نشانگر اندازه پروتئین. نشانگر پروتئین کیتیناز کایمیری بیان شده را نشان می دهد.

افزایش می‌یابد (۱۹)، Fan و همکاران فعالیت کیتینازی کیتیناز کایمری حاصل از افزودن ChBD کرم ابریشم به کیتیناز *Beauveria bassiana* در حضور کیتین کریستالی را ۵/۵ برابر گزارش کرده‌اند (۸).

با توجه به نتایج ارائه شده در این تحقیق امکان تولید آنزیم کیتیناز کایمری توسط بیان پروکاریوتی فراهم شده تا بتوان از این آنزیم جهت تجزیه ترکیبات کیتینی در موارد مختلف نظیر تبدیل زیستی shellfish waste، تولید الیگوساکاریدها و نیز نقش این آنزیم در کنترل فارچهای بیماری‌زای گیاهی که عمدتاً از کیتین کریستالی می‌باشد استفاده نمود.

بر کیتین کریستالی نسبت به آنزیم Chit42 انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کایمری بر کیتین کریستالی نسبت به آنزیم Chit42 به میزان زیادی (حدود ۳/۳ برابر) افزایش یافته‌است (شکل ۶). بدین ترتیب با افزودن ChBD به کیتیناز ۴۲ تمایل آنزیم و اختصاصیت آن به سوبسترای نامحلول افزایش یافته‌است. در حالی که Limon و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کرده‌اند که با افزودن ChBD، از گیاه *Nicotiana tabacum* به کیتیناز ۴۲ قارچ *T. harzianum* فعالیت کیتینازی آنزیم کیتیناز کایمری حاصل روی کیتین کریستالی ۳۶ درصد

منابع

- Adams, D.J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases, *Microbiology*. 150: 2029-2035.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential, *Crit. Rev. Biotechnol.* 27(1):21-28.
- Boer, H., Munck, N., Natunen, J., Wohlfahrt, G., Soderlund, H., Renkonen, O., Koivula, A. (2004). Differential recognition of animal type β 4-galactosylated and - fucosylated chito-oligosaccharides by two family 18 chitinases from *Trichoderma harzianum*, *Glycobiology*. 14:1303-1313.
- Bollag, D.M., Edelstein, S.J. (1996). *Protein Methods*. 2nd ed., New York, Wiley-Liss.
- Cajazeiras, J.B., Melo, L.M., Albuquerque, E.S., Rádis-Baptista, G., Cavada, B.S., Freitas, V.J.F. (2009). Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA, *Genetics and Molecular Research*, 8 (3): 1147-1157.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 929-935.
- De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A., Llobell, A. (1992). Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*, *Eur. J. Biochem.* 206: 859-867
- Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase, *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 295-302.
- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application, *Curr. Protein. Pept. Sci.* 1(1):105-124.
- Ghane, M., Yakhchali, B. and Khodabandeh, M. (2008). Over Expression of Biologically Active Interferon Beta Using Synthetic Gene in *E. coli*, *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran.* 19(3): 203-209.
- Han, J.J., and Rhee, J.S. (1998). Characterization of immobilized lipase catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system, *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 81-88.
- Hardt, M., Laine, R.A. (2004). Mutation of active site residues in the chitin-binding domain ChBDChiA1 from chitinase A1 of *Bacillus circulans* alters substrate specificity: use of a green fluorescent protein binding assay, *Arch. Biochem. Biophys.* 426:286-297.
- Hartl, L., Zach, S., Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 533-543.
- Horton, R.M. (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis SOEing together tailor-made genes, *J. Mol. Biotechnol.* 3: 93-99.
- Houng, J.Y., Liao, L.H., Wu, J.Y., Shen, S.C., Hsu, H.F. (2007). Enhancement of asymmetric

- bioreduction of ethyl 4- chloro acetoacetate by the design of composition of culture medium and reaction conditions, *Process Biochemistry*. 42 (1): 1-7
- 16- Jeney, D., Dobay, O., Lengyel, A., Adam, E. and Nasz, I. (1999). Taguchi optimization of ELISA procedures, *J. Immun. Method*. 223: 137- 146.
- 17- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases—regulation and function, *Cell. Mol. Biol. Lett*. 8(3):809–824.
- 18- Li, D.C. (2006). Review of fungal chitinase, *Mycopathol*. 16:345–360.
- 19- Limon, M.C., Chacon, M.R., Mejias, R., Delgado-Jarana, J., Rincon, A.M., Codon, A.C., Benitez, T. (2004). Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain, *Appl. Microbiol. Biot*. 64:675–685
- 20- Limon, M.C., Margolles-Clark, E., Benitez, T., Penttila, M. (2001). Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*, *FEMS Microbiol. Lett*. 198: 57–63.
- 21- Lin, F.P., Juang, W.Y., Chang, K.H., Chen, H.C., 2001. G561 site-directed deletion mutant chitinase from *Aeromonas caviae* is active without its 304 C-terminal amino acid residues. *Arch. Microbiol*. 175, 220–225.
- 22- Neeraja, C., Moerschbacher, B., Podile, A. R. (2010). Fusion of cellulose binding domain to the catalytic domain improves the activity and conformational stability of chitinase in *Bacillus licheniformis* DSM1, *Bioresource Technol*. 101: 3635–3641.
- 23- Omero, C., Horwitz, B.A., Chet, I.A. (2001). Convenient fluorometric method for the detection of extracellular *N*-acetylglucosaminidase production by filamentous fungi, *J. Microbiol. Methods*. 43: 165-16.
- 24- Ordentlich, A., Elad, Y., Chet, I. (1988). The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*, *Phytopathology*. 78: 84-88.
- 25- Peti, W. and Page, R. (2007). Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost, *Protein Expr. Purif*. 51: 1-10.
- 26- Rivas, F.V., Wohlschlegel, J., Yates, J.R., Parker, R., Hannon, G.J. (2005). Purification Argonaute2 and an siRNA from recombinant human RISC, *Nat. struct. Mol. Boil*. 12: 340-349
- 27- Schrempf, H. (2001). Recognition and degradation of chitin by streptomycetes, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79(3–4):285–289.
- 28- Segupta, P., Meena, K., Jain, S.K. And Maithal, K. (2008). Optimized conditions for high- level expression and purification of recombinant human interleukin-2 in *E. coli*, 45: 91-97.
- 29- Shapira R, Ordentlich A, Chet I, Oppenheim AB (1989) Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*, *Phytopathology* 79:1246–12.
- 30- Stone, R.A. and Veevers, A. (1994). The Taguchi influence on designed experiments, *J. Chemometrics*. 8: 103-10.
- 31- Taguchi, G. (1986). Introduction to quality engineering. Asian productivity organization. New York: UNIPUB.
- 32- Terayama, H., Takahashi, S., Kuzuhara, H. (1989). Large-scale preparation of *N*, *N'*-diacetylchitobiose by enzymatic degradation of chitin and its chemical modification, *J. Carbohydr. Chem*. 12: 81-93.
- 33- Van Aalten, D.M.F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G., Eijsink, V.G.H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase, *PNAS*. 98:8979–8984.
- 34- Vyas, P., Deshpande, M. (1989). Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelia degradation, *J. Gen. Appl. Microbiol*. 35: 343-350.
- 35- Zarei, M., Aminzadeh, S.; Zolgharnein, H., Safahieh, A., Ghoroghi, A., Motallebi, A., Daliri, M.; Lotfi, A.S. (2010). *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach, *Iran. J. Biotech*. 8 (4): 252-262.

Optimization of chimeric chitinase42 prokaryotic expression and comparison of its chitinase activity with Chit42

Matroudi S.¹, Zamani M.R.² and Motallebi²

¹ Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, I.R. of Iran

² National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Chitinases have the ability of chitin digestion that constitutes a main compound of the fungal cell wall, insect exoskeletons, and crustacean shells. Chitinase Chit42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220 is considered to play an important role in the biocontrol activity of this fungus against phytopathogenic fungi. The Chitin-Binding Domain (ChBD) of *Serratia marcescens* chitinase B was selected and fused to the fungal chitinase, *T. atroviride* Chit42 using SOEing PCR with overlapping primers. The chimeric fragment was cloned into prokaryotic expression vector (pET26b⁺) and transformed to *E. coli* BL21-DE3. Culture conditions for chimeric enzyme production by *E. coli* were optimized by Taguchi orthogonal array experimental design methodology. This approach facilitates the study of interaction of a large number of variables spanned by factors and their settings with a small number of experiments leading to considerable saving in time and cost for the process optimization. The objective of the current research was to determine the significant parameters on the production of chimeric chitinase enzyme in the culture. The process variables were IPTG concentration, incubation time, and temperature. The total protein extraction of all experiments were carried out and analyzed by SDS-PAGE, Total lab and Qualitek-4 software. The optimal levels of the different factors for chimeric chitinase production were 1mM IPTG, and 16 hours of incubation time at 28 °C. IPTG concentration was the most important factor in the enzyme production.

Key words: Chimeric chitinase; prokaryotic expression; chitin binding domain; Taguchi method