

افزایش پایداری دمایی پروتئاز سالینی ویبریو پروتئولیتیکوس AF-2004 با استفاده از



جهش زایی هدفمند مکانی

ماتیا سادات برهانی^۱ و زهرا اعتمادی‌فر^۲^۱ ایران، گنبدکاووس، دانشگاه گنبدکاووس، دانشکده علوم پایه و فنی مهندسی، گروه زیست‌شناسی^۲ ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

روشهای جهش‌زایی هدفمند مکانی، یکی از مؤثرترین روشها در بهبود فعالیت و پایداری آنزیمهای صنعتی است. در مطالعه حاضر، اثر جایگزینی آمینواسید آلانین ۵۶ به ایزولوسین، بر پایداری دمایی متالوپروتئاز تولید شده توسط یک باکتری نسبتاً هالوفیل به نام *سالینی ویبریو پروتئولیتیکوس* بررسی شد. به منظور تهیه سویه جهش یافته مورد نظر، از پرایمرهای جهش‌زا (موتازنیک) و سپس تیمار با آنزیم محدود الاثر *Dpn I* استفاده شد. ژن جهش یافته حاصله در سازه بیانی pQE80L، به سویه‌های بیانی مختلف *اشریشیا کلای* (مانند سویه‌های XL1-Blue، pLysS، BL21(DE3) و Top10) ترانسفورم شد. سپس بیان آنزیم نوترکیب تحت شرایط مختلف کشت، بهینه‌سازی گردید. آنزیم جهش یافته و آنزیم طبیعی، از ژل زیموگرافی استخراج شدند. در نهایت، پایداری دمایی و فعالیت آنزیم جهش یافته و آنزیم طبیعی، بررسی شد. حداکثر میزان بیان آنزیم، با استفاده از سویه میزبانی *E. coli* BL21 (DE3) pLysS، در محیط کشت Terrific براث، در حضور IPTG ۱ میلی مولار و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به دست آمد. آنزیم طبیعی و جهش یافته، به ترتیب حدود ۴۲ و ۲۴ درصد از فعالیت خود را بعد از انکوباسیون در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه از دست دادند. از طرفی، فعالیت آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم طبیعی، حدود ۱۱ درصد بیشتر بود. بنابراین، فعالیت و پایداری دمایی متالوپروتئاز باکتری *سالینی ویبریو پروتئولیتیکوس* جهش یافته (جایگزینی آلانین ۵۶ به ایزولوسین) نسبت به آنزیم طبیعی بهبود یافت.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، همسانه‌سازی بیانی، متالوپروتئاز، هالوفیل، زیموگرافی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۲۳۶۷، پست الکترونیکی: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

مقدمه

با خصوصیات منحصر به فرد محسوب می‌گردند. با این وجود، از آن جایی که شرایط فیزیوشیمیایی مورد نیاز در صنایع مختلف، در تکامل طبیعی پروتئازها وجود نداشته است، اغلب پروتئازها در این شرایط ناپایدار یا غیرفعال هستند (۲۰). روشهای جهش‌زایی هدفمند مکانی، یکی از روشهای پرطرفدار بهبود خصوصیات آنزیم یک سویه صنعتی است. در این روش، برخلاف روشهای تصادفی مانند روش تکامل هدایت شده (Directed evolution method)، نیاز به دانستن ژن و ساختار پروتئین مربوطه

به منظور استفاده از پروتئازها در صنعت، حفظ فعالیت و پایداری آنها در شرایط غیرفیزیولوژیک مانند pH بالا، دمای بالا و در حضور عوامل چلاته‌کننده یونها و دترجنتها، ضروری است (۱۲). ناتوانی پروتئازهای گیاهی و حیوانی در پاسخگویی به نیازهای مطرح در بخش صنعت، منجر به توجه روزافزون به پروتئازهای میکروبی و مخصوصاً باکتریایی شده است. به ویژه آنکه برخی از سویه‌های میکروبی اکستروموفیل مانند آلکالوفیلها، ترموفیلها و هالوفیلها، منابعی ارزشمندی در جهت تولید پروتئازهای

دارای اسیدهای آمینه ۲۰۰ تا ۵۱۱ در ساختار خود می‌باشد و در واقع در طی فرآیند بلوغ خود آمینواسیدهای ۱۹۹-۱- انتهای N-ترمینال و آمینواسیدهای ۶۱۱-۵۱۲ انتهای C- ترمینال خود را از دست می‌دهد. در واقع آنزیم مربوطه، همانند دیگر پروتئازهای خانواده خود (خانواده متالوپروتئازهای M4)، ابتدا به صورت یک پروتئین غیرفعال ساخته شده و با برش در انتهای N-ترمینال و C- ترمینال خود، به صورت آنزیم فعال و بالغ در می‌آید. وزن مولکولی فرم بالغ این آنزیم که در هر دو انتهای N-ترمینال و C-ترمینال خود برش یافته است، حدود ۳۴ کیلو دالتون بوده و با توجه به نتایج SDS-PAGE آنزیمی مونومر است (۱۴).

آنالیز توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین حاصل از این ژن، نشان داد که آنزیم کد شده یک متالوپروتئاز حاوی روی (Zn) می‌باشد و دارای یک موتیف محافظت شده زینک متالوپروتئازی است (HEXXH-E) که در خانواده M4 متالوپروتئازها (خانواده ترمولیزین) بسیار حفاظت شده است. ترمولیزین یک پروتئاز گرمادوست (ترموفیل) با کاربرد در صنعت به ویژه سنتز پپتید بوده و از باکتری باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس به دست می‌آید (۲۱). این موتیف (HEVSH) بین اسید آمینه ۳۵۰-۳۴۶ این آنزیم یافت می‌شود. همچنین نتایج آزمایشگاهی مطالعات قبلی نشان داده است که این آنزیم با چلاتورهای فلزات مانند EDTA (اتیل دی آمین تترا استات) و با چلاتور اختصاصی یون روی (Zn) یعنی او ۱-۱۰-فانتروپین مهار می‌شود، اما با مهار کننده‌های سرین، سیستین و آسپارتیل پروتئازها مهار نمی‌گردد. از طرفی فعالیت آنزیم با فسفورامیدون (phosphoramidon) که یک مهارکننده پپتیدی رقابتی برای پروتئازهای مشابه ترمولیزین است، مهار می‌گردد. بنابراین می‌توان گفت پروتئاز سویه AF-2004، جز متالوپروتئازهای مشابه ترمولیزین می‌باشد (۷ و ۱۴).

آنزیم پروتئاز سویه AF-2004، از خود پایداری خوبی در

است (۱۶). تاکنون تحقیقات بی شماری در ارتباط با جهش‌زایی هدفمند مکانی پروتئازها، که پرکاربردترین آنزیم‌های مورد استفاده در صنعت هستند، صورت گرفته است. در اغلب موارد، هدف از جهش‌زایی هدفمند مکانی، افزایش پایداری آنزیم و همچنین تغییر در ویژگی و طیف سوبسترای آنزیم بوده است (۱۰، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۳).

در این مطالعه، به بررسی افزایش پایداری دمایی پروتئاز یک سویه نسبتاً هالوفیل به نام *سالینی‌ویبریو پروتئولیتیکوس* AF-2004 (IBRC-M 10218) پرداخته شده است. به منظور آشنایی بیشتر با باکتری و پروتئاز آن، ابتدا به بررسی نتایج مطالعات گذشته پرداخته می‌شود. جنس *سالینی‌ویبریو* متعلق به خانواده *ویبریوناسه*، راسته *ویبریونالس* و رده *گاما پروتئوباکتیریا* می‌باشد. این باکتری، باسیل گرم منفی خمیده، نسبتاً هالوفیل، بی‌هوازی اختیاری، متحرک با یک فلاژل قطبی، بدون اسپور، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت است. بهینه رشد این سویه در دمای ۳۲-۳۵ درجه سانتی گراد و در pH = ۸-۷/۵ و در حضور ۵-۱۰ درصد نمک کلرید سدیم اتفاق می‌افتد. سویه AF-2004 قادر به رشد در عدم حضور نمک و همچنین در غلظت ۲۰ درصد نمک نیست (۵). لازم به ذکر است که ژن پروتئاز تولید شده توسط این سویه، از طریق ساخت کتابخانه ژنومی در سازه (وکتور) pBluescript و بررسی ۱۰ هزار سلولهای ترانسفورم شده حاصله، بر روی محیط لوریابرتانی آگار حاوی شیر بدون چربی و آمپی‌سیلین یافت شد. تنها همسانه (کلون) دارای فعالیت پروتئازی از این کتابخانه ژنی، دارای قطعه‌ای حدود ۳/۶ kb بود که آنالیزهای ژنتیکی متعاقب بر روی این همسانه، نشان داد که این همسانه دارای یک قالب باز خواندن (ORF) به طول ۱۸۳۶ bp و در نتیجه آنزیمی دارای ۶۱۱ اسیدآمینه است. همچنین در مطالعات گذشته، ژن کامل این آنزیم به منظور افزایش بیان پروتئاز، در سازه pQE-80L همسانه‌سازی و به سویه *اکلائی BL21 (DE3)* ترانسفورم گردید. آنالیزهای پروتئینی صورت گرفته بر روی این آنزیم، مشخص کرده است که آنزیم بالغ

پیشگویی ساختار سه بعدی آنزیم پروتئاز: ساختار دوم پروتئین با استفاده از سرور swiss model پیش بینی شد. به منظور شبیه‌سازی مدل سه بعدی آنزیم پروتئاز مورد مطالعه، از سرورهای مختلف (swiss model و phyre2) و نرم افزار (Modeller) استفاده شد. در میان پروتئازهای مشابه که ساختار سه بعدی آنها در پایگاههای اطلاعاتی مربوطه موجود بود، آنزیم الاستاز سودوموناس آئروژینوزا (PDB code = 1E2M) به عنوان الگوی ساختاری انتخاب شد. شباهت ۶۱ درصدی بین توالی این دو آنزیم تایید می‌کند که احتمالاً مدل سه‌بعدی به دست آمده، دارای درجه اطمینان بالا به منظور استفاده در آنالیزهای بیوانفورماتیکی بعدی است. سپس ساختار سه بعدی به دست آمده با استفاده از سرور Procheck ارزیابی گردید.

آنالیزهای بیوانفورماتیک و طراحی پرایمر برای ایجاد

جهش: توالی متالوپروتئاز باکتری *سالینی‌وبیریو پروتئولیتیکوس* با متالوپروتئازهای ترموفیل (ترمولیزین، پروتئاز مشابه ترمولیزین باسیلوس استئاروترموفیلوس)، ساکروفیل (وبیریولیزین‌های MCP-02 و E495) و مزوفیل (پسودولیزین) هم خانواده خود که پایداری دمایی متفاوتی داشتند، هم‌ردیفی شد. از روی نتایج هم‌ردیفی، جهش A56I انتخاب گردید. همچنین اثر جهش بر پایداری دمایی آنزیم پروتئاز، با استفاده از سرورهای بیوانفورماتیکی گوناگون (Maestro و HoT MUSiC، PoPMuSiC، Eris) مورد بررسی قرار گرفت.

سپس پرایمرهایی که باعث ایجاد جهش‌زایی هدفمند مکانی در موقعیت ۵۶ آنزیم به ایزولوسین می‌شدند، به صورت دستی طراحی شدند (جدول ۱). موقعیت اتصال پرایمرها و جهش ایجاد شده در توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئاز مورد بررسی، در شکل ۲ نشان داده شده است. در نهایت، پرایمرهای طراحی شده از نظر دمای T_m ، GC clamp، $G+C\%$ ، تشکیل ساختار ثانویه سنجاق سری، تشکیل دایمر پرایمر با خودش و با پرایمر دیگر، مورد

غلظت‌های مختلف نمک، pH قلیایی و در حضور حلال‌های آلی نشان داده است. با این وجود، مطالعات پایداری دمایی متالوپروتئازهای خانواده M4 نشان داده است که ناحیه N-ترمینال پروتئازهای این خانواده پایدار نیست و با مطالعات مهندسی پروتئین، می‌توان پایداری دمایی این پروتئازها را به نحو مؤثری تحت تاثیر قرار داد (۱۱). بنابراین در این مطالعه سعی بر آن بوده است که اثر جهش‌زایی هدفمند مکانی در ناحیه N-ترمینال متالوپروتئاز سویه AF-2004 مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور، از بین آمینواسیدهای ناحیه N-ترمینال در فرم بالغ این آنزیم و با توجه به نتایج هم‌ردیفی توالی آنزیم مربوطه با دیگر اعضای خانواده M4، اثر جایگزینی آمینواسید آلانین ۵۶ به ایزولوسین (A56I) بر پایداری دمایی این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

شرایط کشت و محیط‌های کشت مورد استفاده: در این مطالعه، از محیط‌کشت NZY^+ براث، در مرحله جهش‌زایی استفاده شد. برای تهیه یک لیتر از این محیط‌کشت، به هیدرولیزه کازئین (۱۰ g/L)، عصاره مخمر (۵ g/L)، کلرید سدیم (۱۰ g/L)، کلرید منیزیم ۱M (۱۲/۵ mL)، سولفات منیزیم ۱M (۱۲/۵ mL) و گلوکز ۲۰ درصد (۲۰ mL) نیاز است. همچنین به منظور بهینه‌سازی بیان آنزیم نو ترکیب، از محیط‌های کشت LB (لوریا برتانی)، YT (عصاره مخمر-تریپتون) و TB (Terrific broth) استفاده شد. (۲۱).

ژن و توالی اسید آمینه ای پروتئاز مورد بررسی: شماره دستیابی به توالی ژن و توالی پروتئینی آنزیم مورد مطالعه، در سایت NCBI به ترتیب برابر با DQ908958 و ABI93183 می‌باشد. همچنین توالی پروتئینی آنزیم در سایت EXPASY با شماره دستیابی Q06DP6 یافت می‌شود. در شکل ۱، توالی اسیدآمینه‌ای و جایگاه‌های مربوط به برش آنزیم نابالغ و همچنین جایگاه فعال آنزیم و توالی سیگنال پپتید نشان داده شده است.

ارزیابی قرار گرفتند.

سیگنال پپتید				
10	20	30	40	50
<u>MRLSKLTWLL</u>	<u>TTGVFASTPA</u>	<u>LSAELINVTD</u>	<u>DAVLSQVLDQ</u>	<u>PIGVYAPMGS</u>
60	70	80	90	100
<u>SANPLGFKEV</u>	<u>KRVTLPNGKI</u>	<u>KVRYQQTYQG</u>	<u>VPVLNTNVVA</u>	<u>TEKAGKRSDV</u>
110	120	130	140	150
<u>YGTMAQGLTE</u>	<u>DIMTVAPALD</u>	<u>SLDALGAACA</u>	<u>HFTQSQTTLT</u>	<u>AAPFENENTK</u>
160	170	180	190	200
<u>LVVQLDENQK</u>	<u>AQLVYIVDFE</u>	<u>VAAEEPKRPF</u>	<u>YMVDAETGEI</u>	<u>ISQWDGINHA</u>
210	220	230	240	250
<u>TAGGTGPGGN</u>	<u>EKTGQYLYGT</u>	<u>DYDDFPVDKV</u>	<u>GDVCTMETDN</u>	<u>VKTVNLNHGT</u>
260	270	280	290	300
<u>SGTNAFTYPC</u>	<u>PDGTNYNDTK</u>	<u>YTINGAYSPLN</u>	<u>DAHYFGHVVF</u>	<u>NMYKDWMTA</u>
310	320	330	340	350
<u>PLTFQLTMRV</u>	<u>HYSKDYENAF</u>	<u>WNGSSMTFGD</u>	<u>GKSTFYPLVD</u>	<u>INVS<u>AEVSH</u></u>
360	370	380	390	400
<u>GFTEQNSGLV</u>	<u>YRMSGGINE</u>	<u>AFSDIAGEAA</u>	<u>EFYMHGDVDW</u>	<u>IVGADIFKGS</u>
410	420	430	440	450
<u>GGLRYFEQPS</u>	<u>RDGKSIDHAD</u>	<u>QYYSGINVHY</u>	<u>SSGVFNRAFY</u>	<u>LLANKPNWDV</u>
460	470	480	490	500
<u>RKGFEVFTVA</u>	<u>NQLYWTANST</u>	<u>FDEGGCGVVK</u>	<u>AAKDLNYNEA</u>	<u>DVVAAFNTVG</u>
510	520	530	540	550
<u>VNTSACSDDN</u>	<u>TGSVLLPNEP</u>	<u>KTGLSGSRGS</u>	<u>SELFTFTVDS</u>	<u>NRSVKVMSG</u>
560	570	580	590	600
<u>GTGDADLYVK</u>	<u>AGSAPTTSDW</u>	<u>DCRPYDYGND</u>	<u>ESCTVSAQIG</u>	<u>ETYHVMVRGY</u>
610				
<u>SNYSGVSLVR</u>	<u>N</u>			

شکل ۱- توالی پروتئینی پروتئاز سویه سالینی ویبریو پروتئولیتیکوس AF-2004. محل سیگنال پپتید به صورت حروف غیرپررنگ و زیرخط دار، آمینواسیدهای موجود در فرم بالغ آنزیم (آمینواسیدهای ۵۱۱-۲۰۰) به صورت پررنگ شده، جایگاه فعال آنزیم به صورت حروف بزرگتر، پررنگ و همچنین به صورت زیرخط دار نشان داده شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های پرایمرهای جهش‌زای استفاده شده در روش جهش‌زایی وابسته به جایگاه. کدون جهش یافته به صورت حروف پررنگ و زیرخط دار نشان داده شده است

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر (نوکلئوتید)	Tm (°C)
A54I-F	CGGCACATCAGGCACCAAC <u>ATC</u> TTTACGTACCCATGTCCAG	۴۱	۶۸٫۴
A54I-R	CTGGACATGGGTACGTA <u>AAGAT</u> GTTGGTGCCTGATGTGCCG	۴۱	۶۸٫۴

پلاسمید (Thermo Scientific K0502)، با استفاده از پرایمرهای جهش‌زا، PCR شد. مواد مورد نیاز PCR برای انجام واکنش ۵۰ μL شامل بافر PCR ۱۰× (۵ μL)، DNA با غلظت ۵-۵۰ ng (۵/۵ μL)، هر کدام از پرایمرها با غلظت

جهش‌زایی هدفمند مکانی: سازه حاوی توالی DNA ژن پروتئاز سویه AF-2004، توسط دکتر حمیدرضا کربلائی حیدری فراهم شد (۱۴). به منظور ساخت رشته جهش یافته، ابتدا سازه استخراج شده باکتری (کیت استخراج

دنا تورا سیون (۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمر (۵۵ درجه سانتی گراد، ۶۰ ثانیه) و سنتز (۶۸ درجه سانتی گراد، ۷ دقیقه) تنظیم گردید.

۱۰ pmol (۱ μL)، مخلوط dNTP (۵ μL) و آنزیم PfuTurbo DNA polymerase با غلظت ۲/۵ U/μL (۱ μL) می‌باشد. برنامه PCR شامل مراحل دنا تورا سیون اولیه (۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه، ۱ سیکل)، و ۱۶ سیکل از

>DQ908958.1 *Salinivibrio proteolyticus* zinc metalloprotease precursor (svp) gene, complete cds

```

1 ATGAGATTAT CCAAGTTAAC TTGGTTATTA ACCACAGGGG TTTTGTCAAG CACACCCGCA
61 CTCAGTGCAG AGCTGATTAA TGTGACCGAC GATGCCGTAC TGAGTCAGGT TCTCGACCAA
121 CCAATCGGTG TGTATGCCCC AATGGGCTCG TCAGCCAATC CGCTAGGTTT CAAAGAAGTA
181 AAACGCGTGA CGCTGCCTAA CGGCAAAATC AAAGTGCCTA ACCAACAGAC GTATCAGGGC
241 GTTCCCGTAC TGAATACCAA TGTGGTCGCC ACTGAAAAAG CAGGAAAACG CAGCGATGTT
301 TACGGCACTA TGGCACAGGG CCTCACGAA GACATTATGA CAGTCGCACC TGCACTAGAT
361 AGTCTAGATG CCTTAGGTGC TGCGAAAGCA CACTTCACAC AAAGCCAGAC CACTCTCACC
421 GCCGCTCCCT TTGAAAATGA GAACACCAAG TTGGTCGTTC AACTCGATGA AAACCAAAAA
481 GCACAGCTCG TGTATATCGT GGATTTCTTC GTCGCCGACG AGGAGCCTAA GCGTCCCTTC
541 TACATGGTTG ATGCAGAAAC AGGTGAAATC ATTAGCCAGT GGGATGGGAT CAATCATGCA
601 ACTGCCGGTG GTACCGGTCC TGGTGGCAAT GAAAAAACGG GCCAATATCT GTATGGCACC
661 GATTATGATG ACTTCCCGT CGATAAAGTG GGCGATGTGT GTACCATGGA AACCGATAAC
721 GTTAAAACGG TTAACCTGAA CCAAGGCACA TCAGGCACCA ACGCGTTTAC GTACCCATGT
781 CCAAGTGGCA CCAACTACAA CGATACAAAA TACACTAATG GCGCATACTC CCCGCTGAAT
841 GACGCGCATT ACTTTGGTCA CGTCGTTTTC AATATGTACA AAGATTGGAT GAACACGGCA
901 CCACCTGACCT TCCAGTTGAC GATGCGAGTC CATTACAGCA AGGATTATGA AAATGCCTTC
961 TGGAAATGGTA GCTCGATGAC GTTCGGTGAT GGTAATCAA CGTTTTATCC GTTGGTCGAT
1021 ATCAACGTTA GCGCCACGGA AGTCAGTCAC GGTTCACCGG AGCAAAACTC TGGACTGGTA
1081 TATCGTGATA TGTCCGGTGG CATTAAACGAG GCGTCTCTG ATATCGCCGG TGAAGCTGCT
1141 GAGTTCTACA TGCATGGTGA TGTAGACTGG ATTGTCCGGT CCGATATCTT CAAAGGCTCA
1201 GGTGGTTTGC GTTACTTTGA ACAGCCTTCG CCGGATGGCA AATCTATTGA CCATGCAGAT
1261 CAATACTACT CAGGTATTA CAGTGCCTAT TCAAGCGGTG TCTTCAACCG TGCCTTCTAC
1321 CTCCTTGCTA ACAAGCCAAA TTGGGATGTC CGCAAAGGTT TTGAAGTCTT TACAGTTGCA
1381 AACCAACTGT ACTGGACAGC CAATAGTACC TTTGATGAGG GTGGTTGTGG TGTCTGTTAA
1441 GCCGCAAAAG ATCTCAACTA CAACGAAGCC GATGTGGTTG CAGCCTTTAA TACCCTCGGT
1501 GTTAAACACT CTGCTGTTT TGATGACAAC ACTGGTTCGG TGTACTTCCC TAACGAGCCA
1561 AAAACAGGTT TAAGTGGTAG CCGTGGCTCC TCTGAGCTAT TCACTTTCC TGTGTGATAGC
1621 AACCGTTCGG TAAAAGTCAC CATGAGTGGC GGTACAGGCG ATGCCGACTT ATATGTAATA
1681 GCTGGTAGCG CCCCCACCAC AAGCGATTGG GATTGTCGTC CATATGACTA TGGAAACGAC
1741 GAGTCATGTA CGGTCAGCGC ACAAATGGT GAAACCTACC ATGTGATGGT TCGTGGCTAC
1801 TCTAACTACT CGGGTGTGAG CTTAGTTCGC AACTAA

```

شکل ۲- محل اتصال پرایمرهای طراحی شده برای ایجاد جهش به توالی ژنی پروتئاز سالینی و بیبریو پروتئولیتیکوس. محل اتصال پرایمر به ژن پروتئاز سالینی و بیبریو پروتئولیتیکوس در شکل با حروف پررنگ و محصور در کادر نشان داده شده است. محل جهش در پرایمرهای طراحی شده به صورت زیر خط دار مشخص شده است. کدون آلانین ۵۶ در آنزیم بالغ (با کدون GCG) با کدون ایزولوسین (با کدون ATC) در پرایمرها تغییر یافته است.

دست‌نخورده باقی‌مانده و با ترنسفورماسیون آن به سلول *اکلائی*، شکاف موجود در رشته‌ها بر طرف خواهد شد. سویه میکروبی مورد استفاده در این کیت، سویه *اکلائی* XLI-Blue می‌باشد.

ترنسفورماسیون و بهینه‌سازی بیان آنزیم جهش یافته: به منظور ترنسفورماسیون سازه حاوی ژن جهش یافته یا

برای انجام جهش‌زایی هدفمند مکانی از پروتکل کیت Quick change Site Directed Mutagenesis (Stratagene Cat No. 200519) استفاده شد. اساس کار این کیت به این صورت است که با استفاده از آنزیم محدود الاثر *Dpn I*، رشته DNA قدیمی که حاوی جهش مورد نظر نیست، به دلیل متیله بودن، توسط این آنزیم برش می‌خورد و در نتیجه تنها رشته DNA که دچار جهش شده به صورت

زیموگرافی با باند مرتبط در ژل SDS-PAGE و مارکر پروتئینی آن مقایسه و تخمین زده می‌شود.

خالص‌سازی پروتئاز از ژل پلی‌آکریل‌آمید: برای خالص‌سازی پروتئین از ژل پلی‌آکریل‌آمید، ابتدا نیاز است که یک زیموگرافی از پروتئین مورد نظر صورت گیرد. بعد از رنگبری ژل زیموگرافی، محل آنزیم با استفاده از تیغ برش یافت و قطعات برش یافته درون میکروتیوب قرار داده شد. سپس به هر میکروتیوب، ۱ mL بافر حاوی Tris-HCl (mM) ۵۰، NaCl (mM) ۱۵۰ و EDTA (mM) ۰/۱ اضافه گردید. قطعات ژل با استفاده از سر سپمبل خرد شدند و میکروتیوب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm به صورت شبانه‌نگهداری شد. به منظور جداسازی پروتئین از باقیمانده ژل بعد از گذشت انکوباسیون شبانه، سانتریفیوژ در دور ۷۳۷۸ ×g به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سوپرناتانت حاصله به میکروتیوب جدیدی انتقال یافت و حضور پروتئین و فعالیت داشتن آن، با استفاده از تست بردفورد و انجام مجدد زیموگرافی تأیید شد (۲۱).

سنجش فعالیت آنزیمی و بررسی پایداری دمایی: به منظور سنجش فعالیت آنزیمی، بعد از طی زمان مناسب حداکثر تولید آنزیم (۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون)، محیط کشت باکتری برداشت شده و سانتریفیوژ (۷۳۷۸ ×g، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد) گردید تا سوپرناتانت به دست آمده به عنوان عصاره خام آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پروتئاز از روش معرف فولین-سیوکالتو مطابق منبع ذکر شده استفاده شد.

بنا به تعریف، یک واحد فعالیت آنزیمی (U/mL) به مقداری از آنزیم گفته می‌شود که قادر است یک میکروگرم تیروزین را در عرض یک دقیقه تحت شرایط واکنش از پروتئین آزاد سازد (۸).

به منظور بررسی پایداری دمایی آنزیم جهش یافته و طبیعی، ابتدا آنزیم‌های جهش یافته و طبیعی در بازه‌های

طبیعی پروتئاز مورد مطالعه، به سلول‌های میزبان باکتریایی، از روش کلرید کلسیم و شیفت دمایی (تغییر ناگهانی دما) استفاده شد. سلول‌های ترنسفورم شده حاصله، بعد از تأیید توسط تعیین توالی ژن، ابتدا از نظر بیان تولید پروتئاز بر روی پلیتهای LB آگار حاوی آمپی‌سیلین و ۲ درصد شیر بدون چربی بررسی شدند. یک پلیت نیز از سویه بدون سازه به عنوان شاهد یا کنترل کشت داده شد. سپس به منظور افزایش بیان آنزیم نوترکیب، چه در سویه طبیعی و چه در سویه جهش یافته، آزمایش‌های مختلفی صورت پذیرفت. این آزمایشات شامل بررسی زمان انکوباسیون بعد از القاء (۱، ۲، ۴، ۵ و ۲۴ ساعت بعد از القاء)، افزودن غلظت‌های مختلف IPTG به عنوان القاگر بیان (۱-۰/۵-۰/۲-۰/۱-۰)، افزودن لاکتوز ۳ درصد همراه با IPTG، کاهش دمای انکوباسیون بعد از القا (۳۰ درجه سانتی‌گراد)، استفاده از محیط‌های کشت مختلف (مانند محیط‌های LB، TB و YT)، استفاده از سویه‌های بیانی مختلف از کلای (مانند سویه‌های BL21(DE3) pLysS، XL1-Blue و Top10) می‌باشد. ژن آنزیم پروتئاز سویه AF-2004، در سازه بیانی pQE80L وارد شده است.

SDS-PAGE و زیموگرافی: تکنیک SDS-PAGE بر اساس پروتکل موجود در منبع ذکر شده انجام گردید (۲۱). از آنجایی که آنزیم مورد مطالعه در حضور ۱۰ درصد SDS کاهش فعالیت از خود نشان نداد، در این مطالعه از روش زیموگرافی در حضور SDS و با افزودن کازئین ۰/۶۵ درصد در ژل به منظور قدرت تفکیک بهتر استفاده شد (۱۵). همچنین لازم به ذکر است که در نمونه زیموگرافی استفاده از مارکر پروتئینی به دلیل عدم فعالیت پروتئازی باندهای پروتئینی آن استفاده نمی‌گردد. در این حالت در ژل الکتروفورز عمودی حاوی دو جایگاه، ژل مربوط به SDS-PAGE و ژل زیموگرافی به صورت همزمان تحت تأثیر شرایط و محلول بافری یکسان اجرا می‌شوند. بعد از اتمام الکتروفورز و مرحله رنگ آمیزی، دو ژل در کنار هم قرار داده شده و وزن مولکولی باند مربوط به آنزیم در ژل

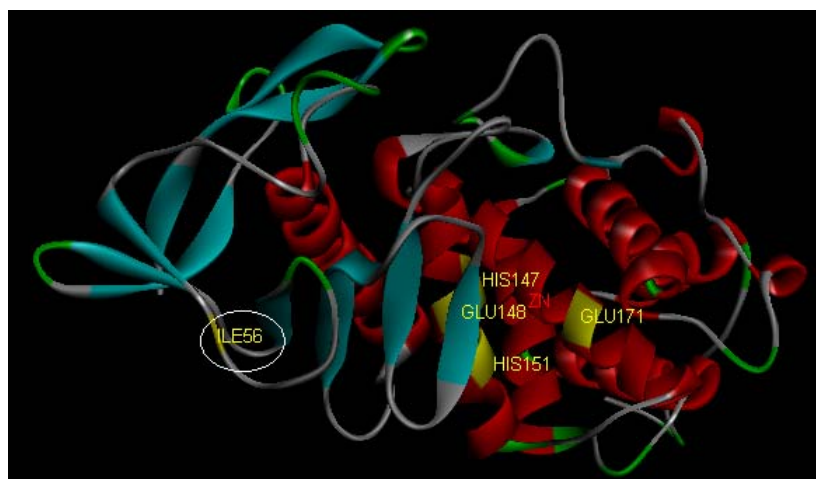
ساختار سه‌بعدی آنزیم و جهش‌زائی آن، از روش‌های همولوژی مدلینگ سرورهای Swiss model و Phyre2 و همچنین نرم افزار Modeller استفاده شد. در میان پروتئازهای مشابه که ساختار سه بعدی آنها موجود بود، آنزیم الاستاز سودوموناس آنروژینوزا (PDB code = 1EZM) تنها آنزیم دارای ساختار سه بعدی تعیین شده بود که بالاترین شباهت را از نظر توالی آمینواسیدی با پروتئاز مورد مطالعه داشت و بنابراین به عنوان الگوی ساختاری انتخاب شد. ارزیابی مدل‌های مختلف به دست آمده توسط سرور Procheck و بر اساس نمودار رامچاندرا (Ramachandran) نشان داد که یکی از مدل‌های به دست آمده دارای درصد بالاتری از آمینواسیدهایی قرار گرفته در مناطق مجاز بوده (۹۹/۶ درصد) و بنابراین از این مدل سه بعدی در آنالیزهای بعدی استفاده گردید (شکل ۳).

زمانی مختلف (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه) در بن ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیزهای آماری: تمامی آزمایشات به منظور بررسیهای آماری به صورت سه تکرار انجام شدند. نتایج به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس و تست Duncan's multiple range توسط نرم افزار SPSS مورد بررسیهای آماری قرار گرفتند. زمانی تفاوت نتایج از نظر آماری معنادار گزارش شد که p -value به دست آمده کمتر از ۰/۰۵ باشد.

نتایج

مدل سه‌بعدی پروتئاز: از آنجایی که ساختار پروتئین توسط کریستالوگرافی اشعه ایکس یا رزونانس مغناطیسی هسته‌ای تعیین نشده است، الزاماً برای داشتن دید کلی در مورد



شکل ۳- ساختار سه بعدی آنزیم پروتئاز سویه سالینی ویبریو پروتئولیتیکوس AF-2004 با استفاده از نرم افزار Swiss PDB view. محل جهش (A56I) در N-ترمینال پروتئین مشخص شده است. آمینواسیدهای His147, His 151, Glu 148, Glu 171 در فرم بالغ آنزیم، آمینواسیدهای کاتالیتیکی آنزیم می‌باشند.

تشکیل می‌دهند. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود، دومین N-ترمینال بیشتر دارای صفحات بتا می‌باشد، در حالی که در C-ترمینال بیشتر ساختارهای دوم هلیکس یا مارپیچی مشاهده می‌شود. موتیف اتصال به اتم روی، یعنی HEXXH در دومین N-ترمینال و لیگاند سوم اتصال

با توجه به این شکل و همانطور که در مطالعات قبلی نیز در مورد ساختار پروتئاز خانواده‌های M4 گزارش شده است، آنزیم یک ساختار دو دومینی دارد که جایگاه فعال بین دو دومین N-ترمینال و C-ترمینال قرار گرفته است. یون روی (Zn) و آمینواسیدهای His147, His 151, Glu148, Glu 171 مشخص شده در شکل، جایگاه فعال آنزیم را

ذخیره‌سازی شده و از بین آنها، کلونی ۱ که نتیجه تعیین توالی آن تأیید شده بود، برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. بررسی ابتدایی تولید پروتئاز در محیط‌کشت آگاردار حاوی ۲ درصد شیر بدون چربی، نشان داد که پروتئاز به خوبی توسط سویه جهش یافته و طبیعی در مقایسه با سویه بدون سازه، تولید می‌شود.

بهینه‌سازی بیان: نتایج اولیه در بهینه‌سازی بیان آنزیم نوترکیب، به قرار زیر است. از میان محیط‌های کشت مورد بررسی، بهترین مورد، محیط‌کشت TB بوده است. افزودن لاکتوز ۳ درصد به همراه IPTG، اثری بر افزایش بیان آنزیم نداشت. بهترین سویه میزبان بیانی، *اکلای BL21 (DE3) pLysS* می‌باشد. بیان در سویه *XL1-Blue* پایین بوده و تفاوت چشمگیری بین قبل و بعد از القاء مشاهده نشد. از میان غلظت‌های مختلف IPTG غلظت ۱mM بهترین اثر را بر بیان آنزیم داشته است. همچنین کاهش دمای انکوباسیون از ۳۷ به ۳۰ درجه سانتی‌گراد بعد از القاء اثر چشمگیری بر بیان آنزیم مورد نظر نداشت.

بیان آنزیم‌های طبیعی و جهش یافته در زمان‌های مختلف یعنی قبل از القاء، ۴ ساعت بعد از القاء و ۲۴ ساعت بعد از القاء با استفاده از ۱mM IPTG مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مربوط به SDS-PAGE و زیموگرافی آن در شکل‌های ۴ و ۵ به نمایش گذاشته شده است. لازم به ذکر است در شکل‌های ۴ و ۵ سویه میزبانی *اکلای BL21 (DE3) pLysS*، محیط‌کشت TB، دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت همزنی ۱۵۰ rpm استفاده شده است.

نتایج زیموگرافی بیان آنزیم نوترکیب در سازه بیانی pQE80L در مقایسه با سویه کنترل حاوی سازه pQE80L بدون ژن مورد نظر (نمونه شماره ۵) تأیید می‌کند که سویه میزبان، آنزیم مورد مطالعه را بیان کرده است. همچنین افزایش فعالیت آنزیم نوترکیب بعد از القاء با IPTG، با توجه به هاله‌های شفاف‌تر ایجاد شده در نمونه‌های ۴-۳ و ۹-۶ نسبت به نمونه‌های ۲ و ۱ نیز مؤید این موضوع

به اتم روی یعنی Glu171 در دومین C-ترمینال قرار گرفته است.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی پایداری دمایی: نتایج آنالیزهای بیوانفورماتیکی جهش A56I توسط سرورهای مختلف در جدول ۲ به نمایش درآمده است. $\Delta\Delta G$ به تغییرات در انرژی آزاد گیبس و ΔT_m به تفاوت دمای ذوب بین آنزیم جهش یافته و طبیعی اشاره دارد. بنابراین، منفی بودن عدد $\Delta\Delta G$ و مثبت بودن عدد ΔT_m به پایداری بیشتر آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم طبیعی اشاره دارد.

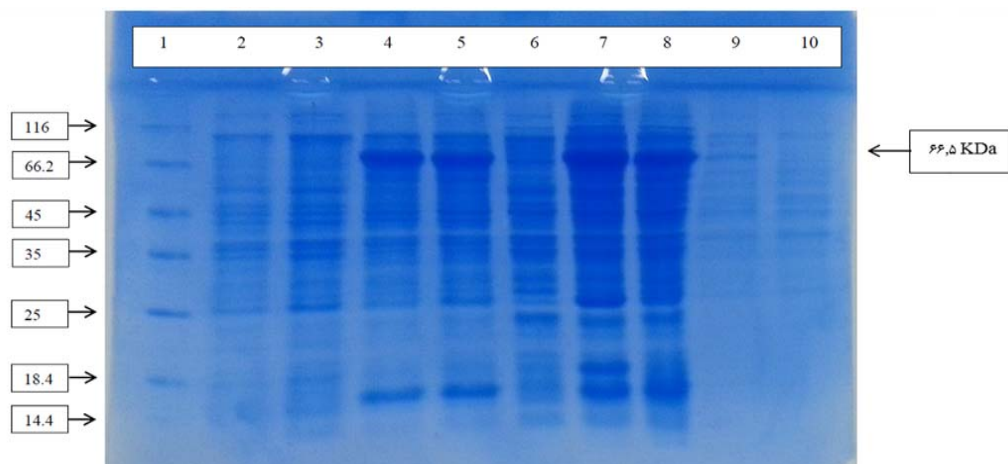
با توجه جدول ۲، تمام سرورهای بیوانفورماتیکی افزایش پایداری آنزیم جهش یافته را تأیید می‌کردند. با این وجود همانطور که در این جدول مشاهده می‌گردد، از سرورهای بیوانفورماتیکی که نتایج آنالیز خود را به طور مشابه و بر اساس $\Delta\Delta G$ (Kcal/mol) گزارش کرده اند (سرورهای Eris، PoPMuSiC و Maestro)، سرور Eris بالاترین میزان پایداری دمایی را بعد از انجام جهش در آلانین ۵۶ نشان داده است. این موضوع ضرورت استفاده از چندین سرور مختلف و مقایسه نتایج آنها را خاطر نشان می‌کند.

جدول ۲- نتایج آنالیز سرورهای مختلف بیوانفورماتیکی در مورد اثر جهش A56I در افزایش پایداری دمایی پروتئاز سویه *سالینی‌ویبریو پروتئولیتیکوس*.

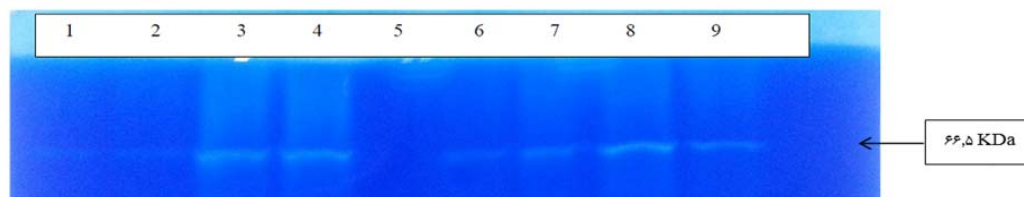
سرور	نتیجه آنالیز	نتیجه گیری
Eris	$\Delta\Delta G = -14/64$ Kcal/mol	افزایش پایداری
PoPMuSiC	$\Delta\Delta G = -0/79$ Kcal/mol	افزایش پایداری
HoTMuSiC	$\Delta T_m = 0/91$ °C	افزایش پایداری
Maestro	$\Delta\Delta G = -0/284$ Kcal/mol	افزایش پایداری

ترنسفورماسیون ژن پروتئاز جهش یافته: ترنسفورماسیون سازه حاوی ژن جهش یافته پروتئاز مورد مطالعه، به سلول‌های *XL1-Blue*، ۱۴ کلونی نتیجه داد که از بین این کلونیه‌ها، مواردی که کلونیه‌های ماهواره در اطراف خود نداشتند (کلونی ۱ و ۷) برای تعیین توالی انتخاب شدند. تمامی کلونیه‌های به دست آمده در گلیسرول ۳۰ درصد

می‌باشد.



شکل ۴- نتایج SDS-PAGE بهینه‌سازی بیان پروتئاز نوترکیب سویه سالینی و بی‌ریپروتئولیتیکوس در سازه pQE80L در زمان‌های مختلف بعد از القا با ۱ mM IPTG. ستون ۱ (مارکر پروتئین، وزن مولکولی بر حسب کیلوالتون)، ستون ۲ (آنزیم طبیعی، قبل القا)، ستون ۳ (آنزیم جهش یافته، قبل القا)، ستون ۴ (آنزیم طبیعی، ۴ ساعت بعد القا)، ستون ۵ (آنزیم جهش یافته، ۴ ساعت بعد القا)، ستون ۶ (سویه کنترل حاوی سازه pQE80L بدون ژن مورد نظر، ۲۴ ساعت بعد القا)، ستون ۷ (آنزیم طبیعی، ۲۴ ساعت بعد القا)، ستون ۸ (آنزیم جهش یافته، ۲۴ ساعت بعد القا).



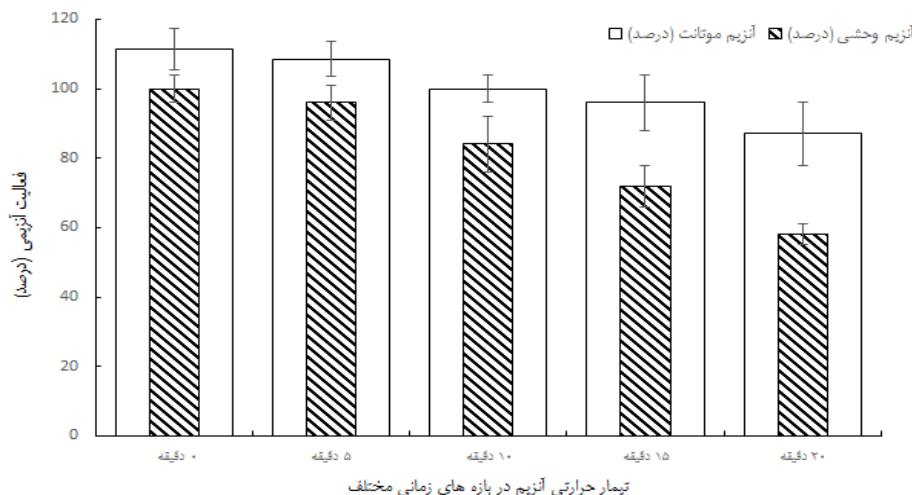
شکل ۵- نتایج زیموگرافی بیان پروتئاز نوترکیب سویه سالینی و بی‌ریپروتئولیتیکوس در سازه pQE80L در زمان‌های مختلف بعد از القا با IPTG ۱ mM. ستون ۱ (آنزیم طبیعی، قبل القا)، ستون ۲ (آنزیم جهش یافته، قبل القا)، ستون ۳ (آنزیم طبیعی، ۴ ساعت بعد القا)، ستون ۴ (آنزیم جهش یافته، ۴ ساعت بعد القا)، ستون ۵ (سویه کنترل حاوی سازه pQE80L بدون ژن مورد نظر، ۲۴ ساعت بعد القا)، ستون ۶ و ۷ (آنزیم طبیعی، ۲۴ ساعت بعد القا)، ستون ۸ و ۹ (آنزیم جهش یافته، ۲۴ ساعت بعد القا).

بهتری نسبت به آنزیم طبیعی از خود نشان داده است. از طرفی، فعالیت آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم طبیعی حدود ۱۱ درصد بهبود یافت.

بحث و نتیجه‌گیری

برخلاف پروتئازهای جداسازی شده از سویه‌های بسیار هالوفیل که برای فعالیت و پایداری خود نیازمند غلظت‌های بالای نمک می‌باشند و در حضور غلظت‌های پایین نمک قادر به فعالیت نیستند، آنزیم‌های سویه‌های نسبتاً هالوفیل، این مزیت را دارند که حتی در عدم حضور نمک فعالیت و پایداری خود را حفظ نمایند و بنابراین کاندیدهای مناسب-تری برای استفاده در صنعت می‌باشند (۱۳).

بررسی پایداری آنزیم جهش یافته: نتایج بررسی فعالیت و پایداری دمایی آنزیم طبیعی و جهش یافته در شکل ۶ به صورت درصد فعالیت باقی‌مانده نسبت به کنترل، آورده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت جهش A56I در آنزیم مورد مطالعه منجر به افزایش پایداری دمایی این آنزیم شده است. از طرفی آنزیم جهش یافته نسبت به آنزیم طبیعی در حالت بدون تیمار حرارتی، فعالیت بیشتری از خود نشان داده است. تیمار آنزیم در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه منجر به از دست دادن حدود ۴۲ درصد از فعالیت آنزیم طبیعی و ۲۴ درصد از فعالیت آنزیم جهش یافته شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم جهش یافته پایداری دمایی



شکل ۶- فعالیت و پایداری دمایی آنزیم پروتئاز طبیعی و جهش یافته A561 سویه سالینی ویربیوپروتئولیتیکوس. نتایج بر اساس درصد فعالیت باقی-

مانده نسبت به آنزیم طبیعی بیان شده است.

آنزیم A268P/A195E می‌تواند منجر به افزایش پایداری دمایی آنزیم در حضور حلالهای آلی مختلف (متانول، ایزوپروپانول، n-پروپانول و دی متیل فورمامید) گردند. تمامی این جهش در لوپهای سطحی، برخی در نزدیکی (A195E و G203D) و برخی دور از جایگاه فعال آنزیم (A268P) قرار داشتند (۶). نتایج مطالعات Asghari و همکاران (۲۰۱۰ و ۲۰۱۱) نشان داد که جهش همزمان در ۴ آمینواسید پروتئاز سالینی ویربیوپروتئولیتیکوس (V189P/A268P/G203D/A195E) منجر به افزایش پایداری آنزیم مربوطه می‌شود. علت این امر به اتصال محکم تر آنزیم جهش یافته به کلسیم، نسبت به آنزیم طبیعی بوده است. علاوه بر افزایش پایداری دمایی، آنزیم جهش یافته مذکور، پایداری بیشتری را در برابر اتولیز، pH و حلالهای آلی نیز از خود نشان داده است (۳ و ۴).

در مطالعه حاضر، انتخاب جهش افزایش دهنده پایداری دمایی، بر اساس هم‌ردیفی توالی آن با پروتئازهای هم خانواده خود که دارای پایداری دمایی متفاوتی بودند و بر مبنای نتایج مطالعات Eijsink و همکاران (۱۹۹۵) که در مورد پروتئازهای متعلق به خانواده M4 صورت گرفته

آنزیم زینک متالوپروتئاز تولید شده توسط سویه نسبتاً هالوفیل سالینی ویربیوپروتئولیتیکوس به دلیل تحمل رنج وسیعی از غلظتهای نمک (۴-۰ M)، پایداری در pH قلیایی (۸/۵-۱۰) و در حضور حلالهای آلی، می‌تواند کاندید مناسبی در صنایع مختلف از جمله صنایع شیمیایی سنتزی باشد (۴ و ۹). با این وجود، پایداری دمایی نیز از خصوصیت کلیدی مورد نیاز پروتئازهای صنعتی است. در صورتی پروتئاز مورد استفاده در صنعت، از پایداری دمایی مناسب برخوردار نباشد، دمای بالا می‌تواند میانکتهای غیرکووالان درون یک پروتئین تا خورده را از بین برده و منجر به از بین رفتن تاخوردگی پروتئین و در نتیجه عدم کارایی آن شود (۱۸). بنابراین در این مطالعه، به بهبود پایداری دمایی این آنزیم با استفاده از تکنیک جهش زایی هدفمند مکانی پرداخته شده است.

مطالعات گذشته نشان داده است که ایجاد جهش در یک یا چند آمینواسید در پروتئاز سالینی ویربیوپروتئولیتیکوس می‌تواند منجر به افزایش پایداری دمایی آنزیم مربوطه گردد. در مطالعه Badoei-Dalfard و همکاران (۲۰۱۰) مشخص شد که جهشهای G203D، A268P و

صورت می‌گیرد و در نتیجه پایداری دمایی بیشتری دارد (۱۹). نتایج تمامی سرورهای مورد بررسی در این مطالعه، اثر مثبت جهش A56I در پایداری دمایی آنزیم متالوپروتئاز سالینی ویرریو پروتئولیتیکوس را تأیید نمود. نتایج آزمایشگاهی این مطالعه نیز افزایش پایداری دمایی آنزیم متالوپروتئاز باکتری سالینی ویرریو پروتئولیتیکوس جهش یافته را تأیید نمود.

جهش‌زایی در ژن مورد بررسی، با استفاده از PCR توسط پرایمرهای جهش‌زا و سپس برش رشته قدیمی و طبیعی DNA با استفاده از آنزیم محدود الاثر *Dpn I*، صورت گرفت. در نهایت ژن جهش یافته، به سویه‌های مختلف بیانی *اکلاهی ترنسفورم* شد تا بیان و پایداری آنزیم مورد بررسی قرار گیرد. لازم به ذکر است که برخلاف سازه بیانی pQE-30L که در آن ژن پروتئین رپرسور *lac* (مهارکننده اپرون لاکتوز) به صورت ترانس در پلاسمید pREP4 موجود است و باید از سویه‌های بیانی خاص حاوی پلاسمید pREP4 استفاده کرد (مانند *اکلاهی M15* و *SG13009*)، سازه بیانی pQE80L دارای رپرسور *lac* به صورت سیس بوده و ژن وارد شده در آن می‌تواند توسط هر نوع سویه میزبانی *اکلاهی* بیان گردد (۲۴). بر اساس نتایج بهینه‌سازی بیان آنزیم نوترکیب، بیشترین میزان بیان آنزیم توسط سویه *pLysS (DE3) BL21* و در محیط‌کشت TB، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت بعد القاء و با استفاده از غلظت IPTG برابر با ۱ mM به دست آمد. این در حالی است که در مطالعه بیگی و همکاران (۲۰۱۲) بالاترین میزان بیان این آنزیم که با استفاده از روش شناسی پاسخ سطح به دست آمده است برابر با غلظت IPTG برابر با ۰/۰۰۸۹ mM و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. همچنین در مطالعه بیگی و همکاران (۲۰۱۲) بیان شد غلظت بالاتر IPTG منجر به کاهش بیان آنزیم می‌گردد (۷). با این وجود در مطالعه حاضر، بیان آنزیم با استفاده از شرایط بهینه شده توسط مطالعه *Beigi* و همکاران (۲۰۱۲) به میزان بسیار کمتری

است، می‌باشد. نتایج *Eijsink* و همکاران نشان داد که در پروتئازهای این خانواده، لویهای ناحیه N-ترمینال نسبت به نواحی داخلی پروتئین و C-ترمینال، در برابر تغییرات دمایی بسیار حساس بوده و احتمالاً زودتر از بقیه نواحی آنزیم از حالت طبیعی خود خارج می‌شوند (۱۱). به علاوه، در مطالعه قبلی بر روی متالوپروتئاز باکتری سالینی ویرریو پروتئولیتیکوس با تبدیل اسید آمینه آلانین ۵۶ به پرولین (A56P) و اسید آمینه ترئونین ۷۳ به فنیل آلانین (T73F) پایداری دمایی این پروتئاز افزایش یافته است. با این حال جهش A56P اثر کمی بر پایداری دمایی داشت (۲۲). با توجه به هم‌ردیفی توالی متالوپروتئاز باکتری سالینی ویرریو پروتئولیتیکوس با متالوپروتئازهای ترموفیل هم خانواده خود، در موقعیت ۷۳ فنیل آلانین و در موقعیت ۵۶ ایزولوسین وجود داشته است. بنابراین در این مطالعه، به جای جایگزینی آلانین ۵۶ به پرولین (A56P)، اثر جایگزینی آلانین ۵۶ به ایزولوسین (A56I) بر پایداری دمایی آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اطمینان بیشتر از سرورهای بیوانفورماتیکی مختلف (*Eris*، *PoPMuSiC*، *HoT MUSiC*، *Maestro*) جهت بررسی اثر این جهش در پایداری دمایی آنزیم مربوطه استفاده شد. لازم به ذکر است که نتایج سرورهای *Eris*، *PoPMuSiC* و *Maestro* بر مبنای اختلاف تغییرات انرژی آزاد گیبس ($\Delta\Delta G$) می‌باشد. از آن جایی که این کمیت ترمودینامیکی، میزان خودبه‌خودی انجام شدن یک واکنش و پایدار بودن محصول را نشان می‌دهد، بنابراین منفی بودن آن موید این است که آنزیم جهش یافته پایداری دمایی بیشتری نسبت به آنزیم طبیعی دارد (۹). در حالی که نتایج سرور *HoT MUSiC* بر مبنای اختلاف دمای ذوب (T_m) آنزیم جهش یافته و طبیعی می‌باشد. به عبارت دیگر، به اختلاف دمایی که در آن نیمی از آنزیمها در فرآیند باز شدن ساختار پروتئین (*Unfolding*) قرار می‌گیرند، اشاره دارد. بنابراین مثبت بودن این عدد اشاره دارد که باز شدن فولدینگ آنزیم جهش یافته در دمای بالاتری نسبت به آنزیم وحشی

آمده، می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که آنزیم تولید شده توسط سویه بیانی در ابتدای مسیر بلوغ خود قرار دارد و به صورت فرم نابالغ و دارای حدود ۶۱۱ آمینواسید است و هنوز متحمل برش پروتئولیتیک در دو انتهای خود نشده است.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جایگزینی آلانین ۵۶ به ایزولوسین منجر به بهبود فعالیت و پایداری دمایی در آنزیم متالوپروتئاز باکتری *سالینی‌ویبریو پروتئولیتیکوس* شد. بنابراین روش هم‌ردیفی چندگانه و جهش‌زایی هدفمند مکانی با استفاده از آنزیم *DpnI* به ترتیب در انتخاب جهش مؤثر و تغییر در توالی پروتئینی پروتئاز مورد مطالعه مفید واقع شد. به علاوه، نتایج زیموگرافی سویه‌ها نشان‌دهنده حضور آنزیم پروتئاز در سویه‌های نوترکیب و عدم حضور آن در سویه فاقد سازه بودند. بنابراین تکنیک زیموگرافی به همراه تکنیک SDS-PAGE می‌تواند در نشان دادن فعالیت آنزیم بعد از انجام جهش‌زایی مفید باشد.

تقدیر و تشکر: نویسندگان مقاله از دکتر حسین محمدیان به دلیل رهنمودهایشان کمال تشکر را دارند.

مشاهده شد. این موضوع به اهمیت بهینه‌سازی شرایط بیان آنزیم نوترکیب در هر کار تحقیقاتی مجزا اشاره دارد (۷).

همچنین لازم به ذکر است که با توجه به نتایج مربوط به ژل SDS-PAGE (شکل ۴) وزن مولکولی به دست آمده برای پروتئاز نوترکیب حدود ۶۶/۵ کیلوالتون بوده است و این در حالی است که مطالعات قبلی صورت گرفته وزن مولکولی این پروتئاز را ۳۴ کیلوالتون گزارش کرده اند (۱۴). در توضیح باید گفت وزن مولکولی گزارش شده در مطالعه کربلائی حیدری و همکاران (۲۰۰۸) مربوط به فرم بالغ این آنزیم است یعنی آنزیم پروتئازی که در هر دو انتهای N-ترمینال و C-ترمینال خود برش یافته است (برش پروتئولیتیک که آنزیم در گذر به فرم بالغ خود متحمل می‌شود). از طرفی وزن مولکولی بیان شده توسط دکتر کربلائی حیدری و همکاران با استفاده از اسپکتروفتومتری جرمی و بر روی آنزیم خالص صورت گرفته است (۱۴). در حالی که وزن مولکولی گزارش شده در مطالعه حاضر با استفاده از SDS-PAGE و بر روی آنزیمی که از بلافاصله از سویه بیانی به دست آمده و هنوز خالص سازی نشده است، می‌باشد. با توجه به وزن ۶۶/۵ کیلوالتون به دست

منابع

- صدرممتاز، افسانه و اصغری، سید محسن. ۱۳۹۴. مطالعات مقایسه‌ای مقاومت پروتئاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با ترمولیزین حاصل از باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس در حلال‌های آلی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران); ۲۸(۴): ۵۶۰-۵۶۷.
- وارسته، عبدالعلی، اصغری، سید محسن، تقدیر، مجید، آقا معالی، محمود رضا، پاژنگ، محمد، مهرنژاد، فرامرز. ۱۳۹۶. اثر کلسیم بر فعال سازی ترمولیزین توسط نمک. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران); ۳۰(۱): ۱۰۰-۱۰۵.
- Asghari, S. M., Pazhang, M., Ehtesham, S., Karbalaie-Heidari, H. R., Taghdir, M., Sadeghizadeh, M., ... & Khajeh, K. 2010. Remarkable improvements of a neutral protease activity and stability share the same structural origins. *Protein Engineering, Design & Selection*, 23(8), 599-606.
- Asghari, S. M., Khajeh, K., Dalfard, A. B., Pazhang, M., & Karbalaie-Heidari, H. R. 2011. Temperature, organic solvent and pH stabilization of the neutral protease from *Salinivibrio proteolyticus*: significance of the structural calcium. *BMB reports*, 44(10), 665-668.
- Amoozegar, M.A., Schumann, P., Hajighasemi, M., Fatemi, A.Z., and Karbalaie-Heidari, H.R. 2008. *Salinivibrio proteolyticus* sp. nov., a moderately halophilic and proteolytic species from a hypersaline lake in Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 1159-1163.
- Badoei-Dalfard, A., Khajeh, K., Asghari, S.M., Ranjbar, B., and Karbalaie-Heidari, H.R. 2010.

- Enhanced activity and stability in the presence of organic solvents by increased active site polarity and stabilization of a surface loop in a metalloprotease. *Journal of Biochemistry*. 148, 231-238.
7. Beigi, L., Karbalaee-Heidari, H.R., and Kharrati-Kopaei, M. 2012. Optimization of an extracellular zinc-metalloprotease (SVP2) expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) using response surface methodology. *Protein Expression and Purification*. 84, 161-166.
 8. Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*. 19, 890-899.
 9. Dehouck, Y., Kwasigroch, J. M., Gilis, D., & Rooman, M. 2011. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 151.
 10. Eijsink, V.G., van der Zee, R., van den Burg, B., Vriend, G., and Venema, G. 1991. Improving the thermostability of the neutral protease of *Bacillus stearothermophilus* by replacing a buried asparagine by leucine. *FEBS Letters*. 282, 13-16.
 11. Eijsink, V.G., Veltman, O.R., Aukema, W., Vriend, G., and Venema, G. 1995. Structural determinants of the stability of thermolysin-like proteinases. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2, 374-379.
 12. Haki, G. D. and Rakshit S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89(1): 17-34.
 13. Karbalaee-Heidari, H.R., Ziaee, A.-A., Schaller, J., and Amoozegar, M.A. 2007. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 266-272.
 14. Karbalaee-Heidari, H.R., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A., Cheburkin, Y., and Budisa, N. 2008. Molecular cloning and sequence analysis of a novel zinc-metalloprotease gene from the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its extracellular expression in *E. coli*. *Gene*. 408, 196-203.
 15. Marokházi, J., et al. 2004. Comparison of proteolytic activities produced by entomopathogenic *Photobacterium* bacteria: strain- and phase-dependent heterogeneity in composition and activity of four enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12): 7311-7320.
 16. Mienda, B.S., and Yahya, A. 2011. Engineering of Microbial Proteases: Improving Stability and Catalytic Performances. *Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology (IIOAB) Journal*. 2, 10-15.
 17. Mitchinson, C., and Wells, J.A. 1989. Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN'. *Biochemistry*. 28, 4807-4815.
 18. Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L., and Bryan, P.N. 1988. The engineering of binding affinity at metal ion binding sites for the stabilization of proteins: subtilisin as a test case. *Biochemistry*. 27, 8311-8317.
 19. Pucci, F., Kwasigroch, J. M., & Rooman, M. 2020. Protein thermal stability engineering using HoTMuSiC. In *Structural Bioinformatics* (pp. 59-73). Humana, New York, NY.
 20. Rani, K., Rana, R., Datt, S. 2012. Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Science*. 2, 12-18.
 21. Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press.
 22. Shirdel, S. A., Khajeh, K., Asghari, S. M., & Karbalaee-Heidari, H. R. 2014. Enhancement of thermostability and resistance against autolysis in a zinc metalloprotease. *Engineering in Life Sciences*, 14(2), 229-234.
 23. Takagi, H., Takahashi, T., Momose, H., Inouye, M., Maeda, Y., Matsuzawa, H., and Ohta, T. 1990. Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease. *Journal of Biological Chemistry*. 265, 6874-6878.
 24. Tomasselli, A. G., Paddock, D. J., Emmons, T. L., Mildner, A. M., Leone, J. W., Lull, J. M., and Benson, T. E. 2008. High yield expression of human BACE constructs in *Escherichia coli* for refolding, purification, and high resolution diffracting crystal forms. *Protein and Peptide Letters*, 15(2), 131-143.

Enhancement of *Salinivibrio Proteolyticus* Strain AF-2004 Protease Thermostability Using Site Directed Mutagenesis

Borhani M.S.¹ and Etemadifar Z.²

¹ Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, I.R. of Iran

² Dept. of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Site-directed mutagenesis is one of the most effective methods for enhancing the activity and stability of industrial enzymes. In this study, the influence of Alanine 56 substitution to isoleucine on the thermostability of a metalloprotease produced by a moderately halophilic bacterium named *Salinivibrio Proteolyticus* (SVP) Strain AF-2004 was investigated. The given mutation was constructed using the mutagenic primers and *DpnI* restriction enzyme treatment. The resulted mutant gene in the pQE-80L vector was transformed into the various expression strains of *Escherichia coli* (XL1-Blue, BL21 (DE₃) pLysS, and Top10). Then, the enzyme expression was optimized using different cultural conditions. Subsequently, the wild and mutant enzymes were extracted from zymography gel. Finally, the thermostability and activity of wild and mutant enzymes were assayed. The maximum expression of the enzyme was achieved using *E.coli* BL21 (DE₃) pLysS, in Terrific broth medium, in the presence of 1 mM IPTG, and after 24 h induction at 37 °C. The extracted wild and mutant enzymes lost 42 and 24 percent of their activity after incubation at 70 °C for 20 min, respectively. However, the activity of the mutant enzyme was 11 percent more than the wild enzyme. Therefore, the activity and thermostability of the mutant SVP metalloprotease (A56I) were improved compared to the wild enzyme.

Keywords: Optimization, Metalloprotease, Expression cloning, Halophile, Zymography