بهینه سازی شرایط بیان آنزیم کیتیناز ۴۲ کایمری در میزبان پروکاریوتی و مقایسه فعالیت آن با آنزیم کیتیناز۴۲

سهیلا مطرودی[۱و۲]، 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 دریافت: ۹۲/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۳

چکیده

آنزیمهای کایمری 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 ChBD domain) کیتینازB باکتری *Serratia marcescens* و cDNA ژن کیتیناز۴۲ قارچ *Trichoderma atroviride* (فاقد ChBD) با استفاده از آغازگرهای همپوشان، کیتینازکایمری 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 بهینه سازی 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 کیتینازکایمری 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 وتحلیل شد. نتایج حاصل نشان داد که در بین عوامل مختلف، غلظت IPTG بیشترین اثر را بر بیان پروتئین کیتینازکایمری دارد. بهترین شرایط بیان برای پروتئین کیتینازکایمری به ترتیب IPTG با غلظت یک میلی‌مولار، دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت به دست آمد.

واژه های کلیدی: بیان پروکاریوتی، تست تاگوچی، کیتینازکایمری، chitin binding domain

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

مقدمه

کیتین پلیمری خطی از واحدهای N-acetylglucosamine است که با پیوندهای β-1,4 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 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 گلیکوزیدهیدرولازها و کیتینازهای قارچی در خانواده ۱۸ گلیکوزیدهیدرولازها قرار دارند (۲، ۹، ۱۷ و ۲۷).

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 کیتیناز۴۲ (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 بیماری زا، 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 بیماری زای 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 بیماری زای *Sclerotinia rolfsii* 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 بهینه سازی شرایط تولید این آنزیمها جهت دسترسی به میزان مناسب آنزیم به منظور بررسی توانمندیهای آنها ضروری می باشد.

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

در این تحقیق کیتینازکایمری طراحی، تکثیر و پس از همسانه‌سازی در وکتور بیانی، به میزبان پروکاریوتی منتقل گردید. بهینه سازی 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 کیتینازکایمری 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 وتحلیل شد.

مواد و روشها

سویه های باکتریایی و پلاسمید: سویه *E. coli* DH5α از

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 محدودالاثر *Xba*I و *Xho*I 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 (NH4)2So4، ۰/۲ گرم KH2Po4، ۱/۶ گرم K2HPo4، ۰/۲ گرم MgSo4.7H2O، ۰/۱ گرم NaCl، ۰/۰۱ گرم FeSo4.7H2O، ۰/۰۲ گرم CaCl2.2H2O در یک لیتر به همراه ۱/۲ درصد کیتین کلوئیدی، ۱/۵ درصد گلوکز و ۱۰ درصد آگار تهیه شد.

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، لوپ۱ شامل ۷ سیکل، مرحله واسرشت دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه،.مرحله اتصال دمای ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه می باشد. در لوپ ۲ شامل ۳۰ سیکل، مرحله واسرشت دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه،.مرحله اتصال دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه می باشد. غلظت مواد مورد استفاده در واکنشهای PCR عبارت است از دو میلی مولار MgSo4، ۱۰ پیکو مول غلظت هر یک از آغازگرها، یک یونیت از آنزیم پلی مراز *pfu* ، ۰/۲ میلی مولار dNTP.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

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

سنجش فعالیت کیتینازی: برای سنجش فعالیت آنزیمهای کیتیناز، مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۲۵۰µl محلول آنزیمی و ۲۵۰µl محلول سوبسترا در بافر (۳/۸ میلی‌گرم کیتین کلوئیدی در بافر سیترات)، به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد متوقف شد. پس از زمان انکوباسیون، جهت توقف واکنش آنزیمی، مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. برای سنجش میزان N-استیل‌گلوکزآمین آزاد شده در طول واکنش، پس از افزودن ۱۰۰µlبافر 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 سانتی گراد قرار گرفت و سپس‌جذب نوری محلول، در طول موج ۵۴۴nm خوانده شده است. هر واحد فعالیت آنزیمی (U)، عبارت از میزان فعالیتی از آنزیم

که در طول یک ساعت واکنش، در دما و pH مشخص، یک میکرومول N–استیل‌گلوکزآمین یا الیگومرهایی از 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 درمحیط LB مایع حاوی ۵۰µg/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 درطول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶ ، IPTG در شرایط استریل اضافه شده و در شیکر انکوباتور نگهداری شدند.

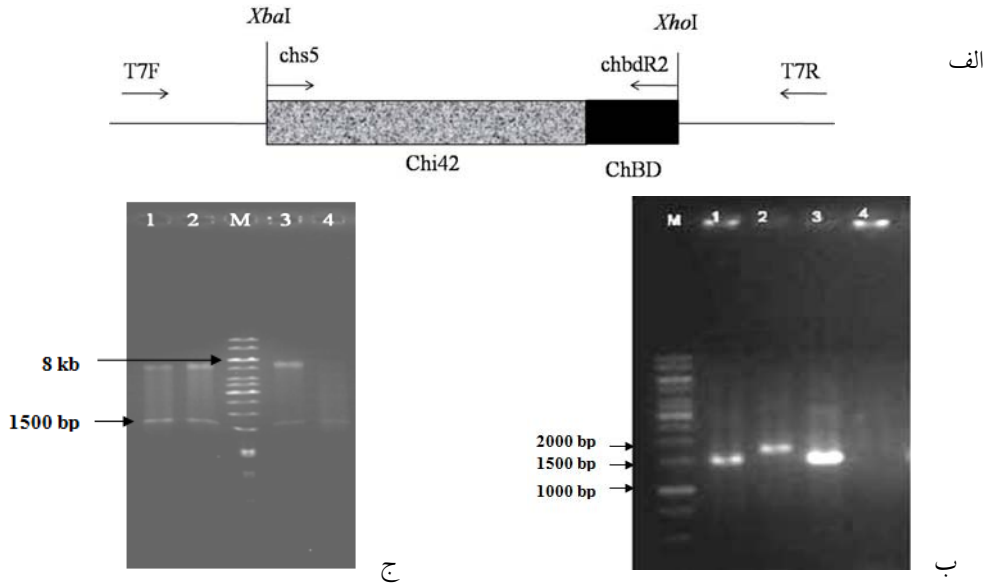
پس از اتمام زمان انکوباسیون مقدار ۱/۵ میلی لیتر از هرکدام از لوله های کشت درون میکروتیوبهای ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و به کمک سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سلولها جمع شدند .

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 اکریل‌آمید اسکن شده و برای کمی کردن داده‌ها از نرم‌افزار Total Lab v1.1استفاده شد. همچنین برای طراحی آزمایش و آنالیز آماری داده‌ها Qualitek-4 استفاده گردید.

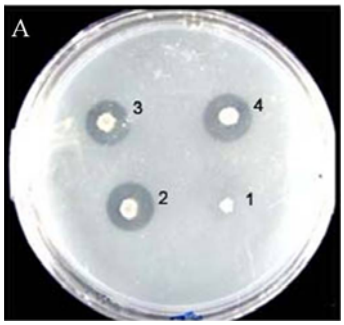
نتایج و بحث

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 می تواند یک ساختار تونل مانندی 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 می دهد 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 کیتینازB باکتری *S. marcescens* و ژن کیتیناز۴۲ قارچ *T. atroviride* (فاقد ChBD) با استفاده از آغازگرهای همپوشان، کیتینازکایمری توسط SOEing PCR تکثیر و در ناقل بیانی pET26b(+) همسانه‌سازی و به میزبان بیانی *E. coli* BL21-DE3 منتقل شد. صحت تکثیر کیتینازکایمری در کلنیهای نوترکیب حاصل، با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی(*Xho*I و *Xba*I) تأیید گردید (شکل ۱). همچنین همسانه سازی ژن مذکور به طور صحیح در قالب خواندن (ORF)، توسط تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت (داده ها نشان داده نشده است). سازه تأیید شده به نام pETSM3 نام گذاری شد.

به منظور اطمینان از بیان صحیح پروتئین کایمری در میزبان پروکاریوتی از روشهای تست پلیت و رنگ‌سنجی استفاده شد. در روش تست پلیت تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنیها 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 کلنیها بستگی دارد (شکل۲).

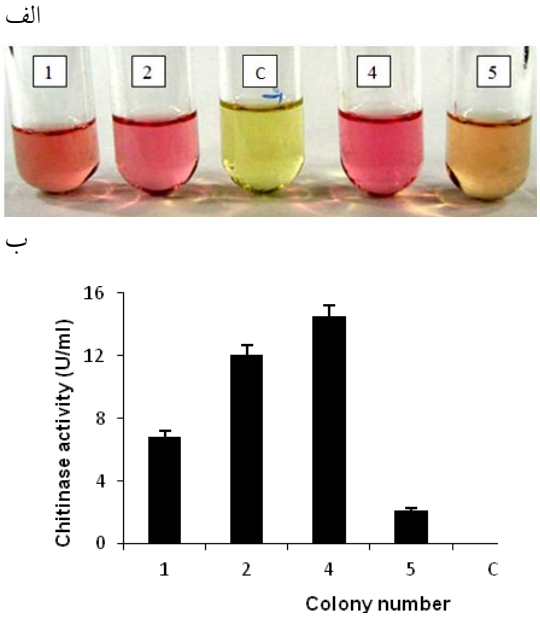


شکل ۱- تایید سازه بیانی نوترکیب pETSM3 الف) طرح شماتیک ژن کیتینازکایمری، آغازگرهای مورد استفاده و همچنین جایگاه آنزیم‌های برشی؛ ب) محصول PCR حاصل از پلاسمیدهای نوترکیب pETSM3 به عنوان DNA الگو، ۱- محصول PCR حاصل از استفاده از آغازگرهای chbdR2 /chs5، ۲- محصول PCR حاصل از استفاده از آغازگرهای یونیورسال (T7F/T7R) ، ۳-کنترل مثبت (آغازگرهای chbdR2 /chs5 و pUCSM2 به عنوان DNAالگو)، ۴- محصول PCR حاصل از پلاسمید pET26b(+) (فاقد ژن کیتیناز) به عنوان DNA الگو و آغازگرهای دو سر ژن (کنترل منفی) ج) pETSM3 هضم شده با آنزیم‌های محدودالاثر؛ ۱، ۲ و ۳- محصول حاصل از هضم آنزیمی با آنزیمهای *XbaI* و *XhoI* ، ۴- محصول PCR حاصل از استفاده از آغازگرهای chbdR2 /chs5، M- مارکر 1kb Ladder، (اندازه قطعات مورد انتظار می‌باشد)



شکل۲- بررسی بیان و فعالیت آنزیم کیتینازکایمری 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 کیتینازکایمری نوترکیب را در این کلنیها نشان داد. کلنی شماره ۴ با فعالیت آنزیمی ۱۴/۵ U/ml دارای بیشترین میزان تولید آنزیم می‌باشد (شکل۳). از میزبان حاوی ناقل بیانی فاقد ژن (empty vector) نیز به عنوان شاهد منفی استفاده شد.



شکل ۳- بررسی بیان و فعالیت آنزیم کیتینازکایمری 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

باکتری *E. coli* میزبان 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* بهینه سازی شرایط بیان پروتئین هترولوگ ضروری است (۲۸).

جهت بهینه سازی بیان کیتینازکایمری 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 کایمری، بررسی تأثیر متقابل متغیرها، تعیین شرایط بهینه و تخمین میزان تولید پروتئین کایمری تحت شرایط بهینه می باشد. در این راستا، تأثیر سه متغیر شامل: غلظت IPTG به عنوان یکی از متداولترین القاء کننده ها (۵) (بر حسب میلی‌مولار)، دمای انکوباسیون (برحسب درجه سانتی گراد) و زمان انکوباسیون (بر حسب ساعت) هر کدام در چهار سطح (جدول۲) بر تولید پروتئین کایمری 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 می توان 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).

همچنین Zarei و همکاران (۲۰۱۰) نیز از این روش برای بهینه سازی بیان ژن کیتیناز در باکتری*S. marsescens* استفاده نمودند (۳۵). بر اساس متغیرهای در نظر گرفته شده، روش تاگوچی ۱۶ آزمایش مستقل را طراحی می نماید (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 کایمری در SDS-PAGE را نسبت به یک باند پروتئینی مرجع محاسبه می کند. 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.

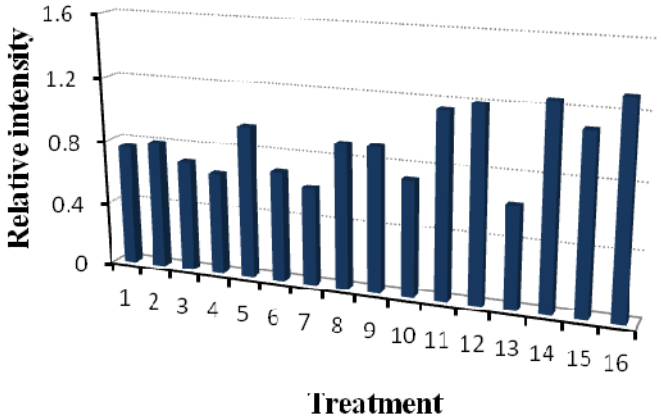
برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از روش تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد که نتایج آن در جدول ۵ ارائه شده است. همان طور که در جدول مشاهده می‌شود میزان تأثیر دمای انکوباسیون و غلظت IPTG از میزان تأثیر مدت زمان انکوباسیون بیشتر می‌باشد.

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 سانتی گراد و زمان ۱۶ ساعت انکوباسیون، غلظت یک میلی مولار از IPTG می باشد. 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 جدول۶ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این جدول مشاهده می‌شود، غلظت IPTG نسبت به دیگر فاکتورها دارای تأثیر بیشتری در بیان پروتئین نوترکیب

می باشد (جدول۶).

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



شکل ۴- بهینه سازی بیان ژن کیتینازکایمری 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	سطح۱	سطح۲	سطح۳	سطح۴
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

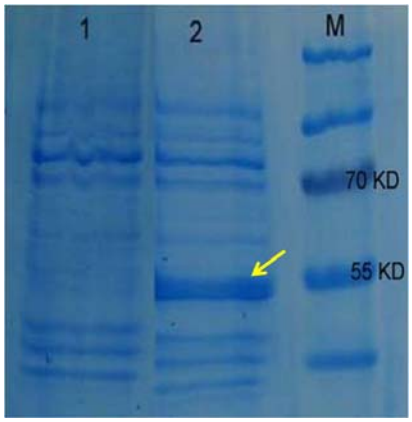
جدول ۵- نتیجه آنالیز واریانس (ANOVA) و تحلیل نتایج برای بهینه کردن شرایط بیان پروتئین نوترکیب

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 Temprature (C)	3	.328	.109	6562.501	.328	44.573
Other/Error	6	0	0			.036
Total:	15	.736				100.009

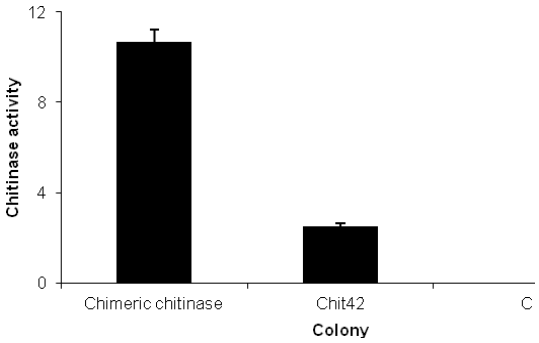
جدول ۶- شرایط بهینه پیش‌بینی شده در روش تاگوچی برای بیان پروتئین نوترکیب

Column # / Factor	Level Description	Level	Contribution
1 IPTG (mM)	1	4	.176
2 Time (h)	16	4	.116
3 Temprature (C)	28	2	.118

Total Contribution From All Factors...	.409
Current Grand Average Of Performance...	.893
Expected Result At Optimum Condition...	1.303



شکل ۵- بیان کیتینازکایمری 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 کایمری بیان شده را نشان می دهد.



شکل ۶- میزان فعالیت آنزیمی در کلنیهای حاوی ژنهای کیتینازکایمری و کیتیناز۴۲ در حضور کیتین کریستالی

با توجه به تولید آنزیمهای کیتینازی در شرایط بهینه به دست‌آمده و به منظور ارزیابی نقش ChBD اضافه شده به انتهای آنزیم Chit42، مقایسه فعالیت آنزیمی کیتینازکایمری

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 (حدود۳/۳ برابر) افزایش یافته‌است (شکل۶). بدین ترتیب با افزودن ChBD به کیتیناز۴۲ تمایل آنزیم و اختصاصیت آن به سوبسترای نامحلول افزایش یافته است. در حالی که Limon و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کرده اند که با افزودن ChBD، از گیاه *Nicotiana tabacum* به کیتیناز۴۲ قارچ *T. harzianum* فعالیت کیتینازی آنزیم کیتیناز کایمری حاصل روی کیتین کریستالی ۳۶ درصد افزایش می یابد (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 کیتینازکایمری 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 قارچهای بیماری‌زای گیاهی که عمدتاً از کیتین کریستالی می‌باشد استفاده نمود.

منابع

1- Adams, D.J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases, Microbiology. 150: 2029-2035.

2- Bhattacharya, D., Nagpure, A., Gupta, R.K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential, Crit. Rev. Biotechnol. 27(1):21–28.

3- Boer, H., Munck, N., Natunen, J.,Wohlfahrt, G., Soderlund, H., Renkonen, O., Koivula, A. (2004). Differential recognition of animal type β4-galactosylated and - fucosylated chito-oligosaccharides by two family 18 chitinases from *Trichoderma harzianum*, Glycobiology. 14:1303–1313.

4- Bollag, D.M., EdelBstein, S.J. (1996). Protein Methods. 2nd ed., New York, Wiley-Liss.

5- 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.

6- 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.

7- 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

8- 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.

9- Fukamizo, T. (2000). Chitinolytic enzymes: catalysis, substrate binding, and their application, Curr. Protein. Pept. Sci. 1(1):105–124.

10- 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.

11- 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.

12- 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.

13- Hartl, L., Zach, S., Seidl-Seiboth, V. (2012). Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93: 533-543.

14- Horton, R.M. (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis SOEing together tailor-made genes, J. Mol. Biotechnol. 3: 93–99.

15- 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 interlukin-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. Carbohyd. 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 Motallebi[2]

[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