

## بیان ترش‌چی ژن بتا-گزیلوزیداز باکتریایی حاوی برچسب هیستیدین در پیکیا پاستوریس

شیرین یوسفیان<sup>\*۱</sup> (M.Sc)، سید امید رعنائی سیادت<sup>۱</sup> (Ph.D)، احسان دهنوی<sup>۱</sup> (Ph.D)، محمدتقی برجیان بروجنی<sup>۱</sup> (M.Sc) فرناز نیکزادجمانی<sup>۱</sup> (M.Sc)

۱- دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی

### چکیده

سابقه و هدف: بتا-گزیلوزیدازها (EC 3.2.1.37)، از مهم‌ترین آنزیم‌ها در مجموعه آنزیم‌های همی سلولازی با پتانسیل کاربرد بالا در صنعت از جمله تولید بیواتانول، از خانواده گلیکوزیدازها بوده که حذف متوالی بقایای بتا-گزیلوزیل را از انتهای غیر احیاکننده‌ی گزیلوییوز و گزیلوالیگوساکاریدهای خطی با پیوندهای  $\beta$ -1,4 انجام داده و به همراه بتا-گزیلانازها، برای دپلمریزه کردن کامل گزیلان ضروری می‌باشند. هدف از این تحقیق بیان ترش‌چی ژن بتا-گزیلوزیداز باکتریایی حاوی برچسب هیستیدین در میزبان بیانی پیکیا پاستوریس، جهت رسیدن به افزایش سطح بیان و سپس خالص‌سازی نسبی آنزیم بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق توالی پروتئینی آنزیم بتا-گزیلوزیداز باکتریایی پس از بهینه‌سازی کدون برای میزبان بیانی *Pichia pastoris*، و افزودن توالی 6xHis-tag با طراحی پرایمرهای مناسب، به میزبان مخمری انتقال یافت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده در کشت فلاسک، تولید ۴۰ U/L آنزیم بتا-گزیلوزیداز نوترکیب با فعالیت ویژه‌ی ۰/۶ U/mg را در محیط بیانی BMMY نشان داد.

نتیجه‌گیری: کلونینگ و بیان موفق ژن بتا-گزیلوزیداز باکتریایی جهت به‌دست آوردن آنزیم فعال و پایدار از سیستم بیانی مخمر، با مقدار بالای بیان آنزیم انجام شد.

واژه‌های کلیدی: مخمرها، گزیلوزیدازها، هیستیدین، بیان ژنی

### مقدمه

پلی ساکاریدهای فراوان در روی زمین محسوب می‌شوند. توده لیگنوسلولزی که اساساً تشکیل شده از سلولز، همی سلولز و لیگنین است، می‌تواند به عنوان یک منبع، نیاز در حال رشد ما را، به منابع تجدیدپذیر انرژی تامین کند [۲]. گزیلان فراوان‌ترین همی سلولز می‌باشد [۳، ۴]. از نظر ساختاری،

بقایای کشاورزی گوناگون، از جمله فیبر ذرت و تفاله نیشکر حاوی ۲۰-۴۰٪ همی سلولز، می‌باشند [۱]. همی سلولزها (گزیلان‌ها، آرایینوگزیلان‌ها) که از اجزای ساختاری در دیواره سلول‌های گیاهی می‌باشند، دومین

این خصوصیات *P.pastoris* را به عنوان یک سیستم بیانی کارآمد معرفی می‌کند [۱۵، ۲-۱۰].

فرآیند خالص‌سازی پروتئین‌ها در صنعت که شامل جداسازی آن از ترکیبات غیر پروتئینی و نهایتاً خالص‌سازی آن از دیگر پروتئین‌های غیر هدف می‌باشد، فرآیندی دشوار و پرهزینه است. با اضافه کردن توالی شش آمینواسیدی هیستیدین به توالی‌های پروتئین می‌توان آن‌ها را با استفاده از ستون نیکل به راحتی و با خلوص بالا، خالص‌سازی کرد [۱۶].

هدف از این تحقیق اضافه کردن برجسب هیستیدین به ژن بتاگزیلوزیداز *Selenomonas ruminantium* و بیان ترشحی آنزیم در مخمر صنعتی پیکیاپاستوریس با استفاده از توالی آلفا فاکتور مخمری به منظور رسیدن به افزایش سطح بیان و سپس خالص‌سازی نسبی آنزیم تولید شده پس از بیان در این میزبان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

آنزیم‌های محدودگر *XhoI* و *KpnI* متعلق به شرکت Vivantis بود. آنزیم DNA پلی‌مراز Max-tag، T4 DNA لیگاز و کیت استخراج پلاسمید، از شرکت Vivantis خریداری شد که طبق شرایط توصیه شده استفاده گردید. سوبسترای پارانتروفنیل گزیلویپرانوزید (PNPX) از شرکت سیگما خریداری شد. سویه باکتری مورد استفاده اشرشیاکلی *DH5α* بوده و از پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک خریداری شد.

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها، از محیط‌های LB و LB-Agar حاوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جهت کلونینگ استفاده گردید. آمپی‌سیلین مورد استفاده به عنوان آنتی‌بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

سنتز ژن. توالی پروتئینی آنزیم بتا-گزیلوزیداز باکتری *Selenomonas ruminantium* با طول ۱۶۱۴ bp از بانک‌های اطلاعاتی پروتئین (GenBank accession no. AF040720.1) استخراج شده، و با توجه به ترجیح کدونیک پیکیاپاستوریس، توالی ژن طراحی و برای سنتز به شرکت

گزیلان‌ها هتروپلی‌ساکاریدهایی هستند که از پیوند خطی  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) تشکیل شده و با توجه به منبع بافت با ریشه‌های ال-آرابینوزیل، دی-گالاکتوزیل، استیل و... جای‌گزین می‌شود [۵، ۳]. تجزیه‌ی کامل گزیلان یک مرحله‌ی کلیدی در چرخه‌ی کربن بوده و به دلیل غیر یکنواختی و طبیعت پیچیده‌ی شیمیایی گزیلان گیاهی، تجزیه کامل آن نیازمند فعالیت چندین آنزیم هیدرولیزکننده (همی سلولازها) با اختصاصیت و طرز عمل متفاوت می‌باشد [۴]. مهم‌ترین آنزیم‌های گزیلانولیتیک عبارتند از: اندو-۱،۴ گزیلاناز، که اسکلت گزیلان غیر محلول را به گزیلوالیگوساکاریدهای کوتاه‌تر محلول هیدرولیز کرده و بتا-گزیلوزیداز، که گزیلوالیگوساکاریدهای محلول و گزیلویبوز را از انتهای غیر احیاکننده هیدرولیز کرده و گزیلوز آزاد می‌کند [۴، ۳]. میکروارگانیزم‌ها اساساً مسئول تجزیه‌ی گزیلان در طبیعت می‌باشند. از این رو وجود بتا-گزیلوزیدازها در انواع مختلفی شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها گزارش شده است [۷، ۶].

بتا - دی - گزیلوزیداز از باکتری *Selenomonas ruminantium* (SXA) پارامترهای کینتیکی آن در مقایسه با بتا - گزیلوزیدازهای گزارش شده از دیگر گونه‌ها حدوداً ۱۰ برابر بزرگ‌تر بوده و در ترکیب با فعالیت گزیلانازها، SXA دارای پتانسیل کاربردی بسیار بالا در پروسه‌های تبدیل زیست توده‌ی گیاهی به قندهای ساده قابل تخمیر برای تولیدات زیستی همانند اتانول زیستی می‌باشد [۹، ۸، ۶].

به عنوان یک یوکاریوت، *Pichia pastoris* بسیاری از فواید سیستم‌های بیانی یوکاریوت‌های پیش‌رفته‌تر، از جمله پردازش پروتئین، فولدینگ پروتئین و تغییرات پس از ترجمه را دارا می‌باشد. در مقایسه با سایر سیستم‌های بیانی یوکاریوتی سریع‌تر، راحت‌تر و با هزینه کم‌تر برای استفاده بوده و سطوح بالاتری از بیان را دارا می‌باشد. به عنوان یک مخمر، *P.pastoris* خصوصیات مفید دست‌کاری شده، از نظر مولکولی و ژنتیکی در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* را هم دارا می‌باشد.

جدول ۳. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و توالی آن‌ها

نام	توالی	توضیحات
Xs43His FWD	5'GAGCTCCTCGAGAAAA GGCCTATG	پرایمر بالادست ژن
Xs43His REV	5'AGGGTACCCTACTAGT GGTGGTGGTGGTGGTGA TCCAACCTCTTTG	پرایمر پایین دست ژن

GENE ART آلمان فرستاده شد. ژن مورد نظر به صورت کلون شده در وکتور PMK بین دو جایگاه برش XhoI و KpnI به آزمایشگاه تحویل داده شد. این پلاسمید دارای ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان مارکر انتخابی می‌باشد.

پرایمرها: پرایمرهای بالادست و پایین دست پس از طراحی و آنالیز کامپیوتری توسط شرکت سیناکلون سنتز گردید و در جدول ۳ آمده است. این دو پرایمر برای افزودن توالی شش آمینواسیدی هیستیدین به ژن نو ترکیب بتاگزیلوزیداز طراحی گردید. برای افزایش DNA در شرایط آزمایشگاهی واکنش Touchdown PCR طبق جدول ۱ و ۲ انجام گردید.

جدول ۱. مواد مورد نیاز در واکنش PCR و مقدار آن‌ها

مقدار (μl)	مواد
۲	بافر 10X PCR
۰/۵	dNTPs 1mM
۰/۸	Mgso <sub>4</sub> 50mM
۰/۵	پرایمر بالا دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۰/۵	پرایمر پایین دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۰/۳	آنزیم Max-tag
۱	الگو 100ng (cDNA)
۱۴/۴	آب مقطر (آمبولی)
۲۰	حجم نهایی

لیگاسیون به درون وکتور PTG19-T و ترانسفورم DNA نو ترکیب به درون باکتری اشرشیاکلی. ژن نو ترکیب بتاگزیلوزیداز به همراه توالی شش هیستیدین با استفاده از آنزیم DNA T4 لیگاز به درون وکتور PTG19-T انتقال یافته و پس از انجام مراحل لیگاسیون و تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد [۱۷] محصول لیگاسیون با استفاده از روش شوک حرارتی به درون سلول‌ها منتقل شد.

کلونینگ ژن در باکتری اشرشیاکلی. پس از انتقال پلاسمید PTG19-T به باکتری با استفاده از روش انتقال شوک حرارتی، باکتری‌ها را در محیط LB حاوی ۰/۵٪ عصاره مخمر، ۱٪ تریپتون و ۱٪ سدیم کلرید، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکرانکوباتور با دور ۳۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد و بدین ترتیب مقدار زیادی از پلاسمید را به دست آمد.

پس از انتقال باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت‌های حاوی IPTG, X-gal, amp به علت وجود مادهی X-gal در داخل این پلیت‌ها، پس از فعال شدن آنزیم بتاگالاکتوزیداز در اثر حضور IPTG، کلنی‌های حاوی وکتور فاقد ژن، تنها به رنگ آبی و کلنی‌های حاوی سازهی دارای ژن، به رنگ سفید مشاهده می‌شوند [۱۸، ۱۹].

لیگاسیون به درون وکتور دوگانهی pPink-HC پس از استخراج پلاسمیدهای PTG19-T که حاوی توالی بتا-گزیلوزیداز حاوی برچسب شش هیستیدین بودند، تمام مراحل کلونینگ همانند انتقال وکتور PTG19-T به باکتری اشرشیاکلی انجام و باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی پلیت‌های انتخابی حاوی آمپی‌سیلین گزینش شدند.

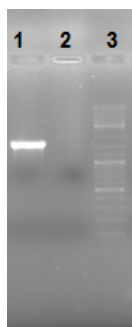
جدول ۲. برنامهی Touchdown-PCR برای اضافه کردن برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین به انتهای ژن بتا-گزیلوزیداز

تعداد سیکل‌ها	زمان (دقیقه)	دما (سانتی‌گراد)
۱	۵	۹۵
۵	۰/۵	۹۵
	۰/۵	۵۳
	۱/۵	۷۲
۲۵	۰/۵	۹۵
	۰/۵	۵۹
	۱/۵	۷۲
۱	۱۰	۷۲

از سوبسترای PNPX انجام شد. این سنجش در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  و بافر سیترات  $\text{pH}=8/4$   $50\text{ mM}$ ، مقدار  $50\ \mu\text{l}$  از PNPX  $10\text{ Mm}$  و مقدار مناسب از محلول آنزیمی رقیق شده در حجم کلی  $0/5\ \text{ml}$  انجام شد. مقدار جذب پارانیتروفنل آزاد شده بعد از مدت زمان ۱۰ دقیقه، در طول موج  $405\ \text{nm}$  خوانده شد. واکنش با اضافه کردن  $1\ \text{ml}$  سدیم کربنات  $1\text{ M}$  متوقف گردید [۲۱].

## نتایج

کلونینگ ژن بتا-گزیلوزیداز SXA. افزودن برچسب شش هیستیدین به انتهای ژن جهت خالص سازی آنزیم تولیدشده پس از بیان، با انجام روش PCR با پرایمرهای طراحی شده، بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد. پس از لیگاسیون ژن نوترکیب بتا-گزیلوزیداز به هم راه توالی شش هیستیدین به درون وکتور PTG19-T و انتقال به باکتری جهت تایید حضور ژن از روش PCR استفاده شده و باند مورد نظر رویت شد (شکل ۱). هم چنین توالی بتا-گزیلوزیداز به هم راه برچسب شش آمینواسیدی هیستیدین اضافه شده به انتهای آن پس از انتقال به وکتور PTG19-T با استفاده از آنزیم های محدودگر XhoI و KpnI که به ترتیب ابتدا و انتهای ژن را برش می دهند، بریده شده و مقداری از آن برای اثبات برش، بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل ۲).



شکل ۱. ژل آگارز تایید کننده کلونینگ ژن نوترکیب حاوی برچسب هیستیدین در وکتور PTG19-T در باکتری می باشد. چاهک شماره ۱ حاوی XsHis با طول  $1632\ \text{bp}$ ، چاهک شماره ۲. کنترل منفی. چاهک شماره ۳. نشان گر GeneRuler™ #SM 0331.

تهیه سلول های مستعد مخمر، انتقال پلاسمید نوترکیب به میزبان و بیان ژن مطابق دستورالعمل سازنده کیت (Invitrogen) انجام شد. پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن SXA توسط آنزیم BglII به شکل خطی در آمده و توسط روش الکتروپوریشن در شرایط  $1800\ \text{V}$ ،  $200\ \text{A}$  و  $25\ \mu\text{s}$  به میزبان بیانی مستعد *Pichia pastoris* منتقل شد. محصول انتقال بر روی پلیت PAD (*Pichia Adenine Dropout*) کشت داده شد. پلیت مورد نظر به مدت حداقل ۳ روز جهت رشد کلونی های مورد نظر در انکوباتور  $30^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد قرار داده شد [۲۰ و ۲۱].

بررسی بیان آنزیم بتا-گزیلوزیداز در کلونی های نوترکیب مخمر: حدود  $20$  کلون مخمر که در محیط PAD رشد کرده بودند، در  $10$  میلی لیتر محیط BMGY (Buffered Complex Glycerol Medium) حاوی عصاره مخمر ۱٪، پیتون ۲٪، بافر پتاسیم فسفات  $0/1\ \text{M}$  ( $\text{pH}=6$ )، YNB  $1/34$ ٪، بیوتین  $4 \times 10^{-5}$ ٪ و گلیسرول ۱٪، به مدت ۱ شب در  $29-30^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد با سرعت  $275\ \text{rpm}$  کشت داده شدند، بعد از سانتریفیوژ سلول ها و خارج کردن محلول رویی، رسوب سلولی در  $1$  میلی لیتر محیط BMMY (Buffered Complex Methanol Medium) حاوی عصاره مخمر ۱٪، پیتون ۲٪، بافر پتاسیم فسفات  $0/1\ \text{M}$  ( $\text{pH}=6$ )، YNB  $1/34$ ٪، بیوتین  $4 \times 10^{-5}$ ٪ و متانول ۱٪، سوسپانسیون شده و جهت القای پروموتور AOX1 متانول در غلظت نهایی  $0/5$ ٪ به مدت ۲۴ ساعت اضافه گردید. بیان بتا-گزیلوزیداز نوترکیب و سنجش فعالیت آن با کمک پارانیتروفنیل گزیلوپیرانوزید (PNPX) به عنوان سوبسترا انجام شد. با استفاده از SDS-PAGE بیان و ترشح پروتئین نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور محیط کشت مخمر از سلول ها جدا شده، پروتئین های محلول در آن توسط سولفات آمونیوم  $4\text{ M}$  رسوب داده شده و نمونه ی پروتئین توسط SDS-PAGE الکتروفورز شد.

سنجش فعالیت آنزیمی. سنجش فعالیت آنزیمی بتا-گزیلوزیداز از طریق اندازه گیری مقدار پارانیتروفنل آزاد شده

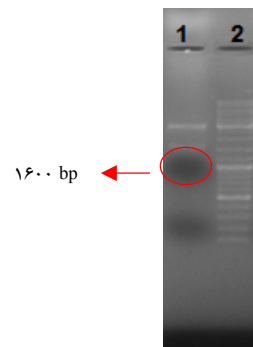
به دنبال انجام الکتروپوریشن به منظور انتقال پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن به مخمر پیکیا پاستوریس و مشاهده کلونی‌ها به منظور اطمینان از حضور ژن در مخمر با استفاده از روش کلونی PCR با پرایم‌های طراحی شده، کلونینگ ژن در مخمر بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد (شکل ۵).



شکل ۵. ژل آگارز تاییدکننده کلونینگ ژن نو ترکیب حاوی برجسب هیستیدین در پلاسمید pPink-HC در مخمر می‌باشد. چاهک‌های شماره ۱۰-۱۱ حاوی XsHis با طول ۱۶۳۲bp. چاهک شماره ۱۱ نشان‌گر GeneRuler™ #SM 0331. چاهک شماره ۱۲ کنترل مثبت

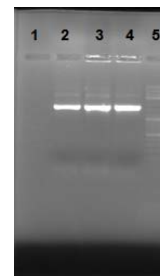
بیان بتا-گزیلوزیداز نو ترکیب. پلاسمید نو ترکیب pPink-HC حاوی ژن بتا-گزیلوزیداز باکتریایی پس از خطی شدن با روش شوک الکتریکی به سلول‌های مستعد مخمر منتقل و محصول انتقال روی محیط کشت جامد PAD کشت داده شد تا کلونی‌های نو ترکیب پدیدار شوند. بعد از پیدایش کلونی‌های نو ترکیب بررسی‌های بیان ابتدا با استفاده از آزمایش سنجش فعالیت آنزیمی با کمک پارانیتروفیل گزیلوپیرانوزید به عنوان سوبسترا انجام شد. صحت بیان ژن نو ترکیب در نمونه‌های مثبت توسط SDS-PAGE بررسی شد. نتیجه SDS-PAGE حضور یک باند پروتئینی حدود ۶۱ کیلو دالتون که معادل آنزیم بتا-گزیلوزیداز بود را نشان داد (شکل ۶).

نتایج به دست آمده از ۵۰۰ ml کشت مخمر در فلاسک حاوی بتا-گزیلوزیداز تولید شده توسط یکی از کلون‌ها، که بیان بالایی را نسبت به سایرین نشان می‌داد، نشان‌دهنده تولید ۴۰ U/L آنزیم بتا-گزیلوزیداز نو ترکیب با فعالیت ویژه ۰/۶ U/mg در محیط بیانی BMMY می‌باشد.

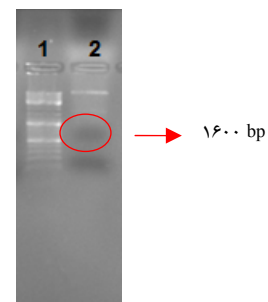


شکل ۲. ژل آگارز تاییدکننده کلونینگ ژن نو ترکیب حاوی برجسب هیستیدین در وکتور PTG19-T در باکتری می‌باشد. چاهک شماره ۱ وکتور نو ترکیب PTG19-T بریده شده با آنزیم‌های محدودگر XhoI و KpnI که نشان دهنده توالی بتا-گزیلوزیداز با طول ۱۶۳۲bp می‌باشد. چاهک شماره ۲ نشان‌گر GeneRuler™ #SM 0331.

پس از لیگاسیون ژن نو ترکیب بتا-گزیلوزیداز به هم‌راه توالی شش هیستیدین به درون وکتور pPink-HC و انتقال به باکتری جهت تایید حضور ژن از روش PCR (شکل ۳) و هضم آنزیمی استفاده شد و باند مورد نظر رویت شد (شکل ۴).



شکل ۳. ژل آگارز تاییدکننده کلونینگ ژن نو ترکیب حاوی برجسب هیستیدین در پلاسمید pPink-HC در باکتری می‌باشد. چاهک شماره ۱ کنترل منفی. چاهک شماره ۲-۴ حاوی XsHis با طول ۱۶۳۲bp. چاهک شماره ۵ نشان‌گر GeneRuler™ #SM 0331.



شکل ۴. ژل آگارز تاییدکننده کلونینگ ژن نو ترکیب حاوی برجسب هیستیدین در پلاسمید pPink-HC در باکتری می‌باشد. چاهک شماره ۱. نشان‌گر GeneRuler™ #SM 0331. چاهک شماره ۲. وکتور نو ترکیب PTG19-T بریده شده با آنزیم‌های محدودگر XhoI و KpnI که نشان دهنده توالی بتا-گزیلوزیداز با طول ۱۶۳۲bp می‌باشد.

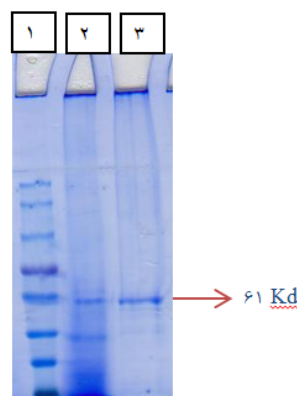
است. به دلیل وجود همین محاسن، امروزه این مخمر انتخاب اول بسیاری از محققان برای بیان پروتئین نوترکیب می‌باشد.

با توجه به مطالعات انجام شده بر روی پژوهش‌های انجام شده در داخل و خارج کشور این اولین گزارش از بیان آنزیم بتا-گزیلوزیداز از خانواده ۴۳ گلیکوزیدازها در این مخمر می‌باشد [۲۲-۲۴]. با توجه به هدف این تحقیق، کلونینگ و بیان موفق ژن بتا-گزیلوزیداز باکتریایی جهت به دست آوردن آنزیم فعال و پایدار از سیستم بیانی مخمر، با مقدار بالای بیان آنزیم (۴۰ U/L) انجام شد. همچنین در این تحقیق توالی شش آمینواسیدی هیستیدین به منظور خالص‌سازی با موفقیت به ژن نوترکیب بتا-گزیلوزیداز افزوده شد (نتایج خالص‌سازی ارائه نشده است).

تقاضای بازار جهانی برای آنزیم‌هایی که به شکل صنعتی تولید می‌شوند دارای رشد شگرفی می‌باشد. گزیلوزیدازها از جمله مهم‌ترین آنزیم‌ها در مجموعه آنزیم‌های همی سلولازی می‌باشند، اما تنها درصد کوچکی از بازار را شامل می‌شوند که البته این میزان به سبب پتانسیل کاربرد بالا در حال افزایش است. گزیلوزیدازها کاربرد وسیعی در صنعت دارند که از آن جمله می‌توان به صنایع غذایی، تغذیه دام و طیور، صنایع خمیر و کاغذ، صنعت نانوایی و تولید بیواتانول اشاره کرد؛ از این رو پرداختن به آنزیم بتا-گزیلوزیداز به عنوان بخشی از سیستم همی سلولازی مهم می‌نماید.

هدف نهایی از این تحقیق بیان آنزیم در مقیاس انبوه و صنعتی بوده و برای افزایش میزان بیان و تولید آنزیم بتا-گزیلوزیداز از پروموتور القایی AOX1 استفاده شد. به دست آوردن آنزیم فعال و پایدار از سیستم بیانی مخمر، همچنین مقدار بالای بیان آنزیم (۴۰ U/L) نشان‌دهنده طراحی صحیح ژن کدکننده آنزیم و عمل‌کرد درست القا توسط متانول بود. این گزارش بالاترین میزان بیان آنزیم گزیلوزیداز را در کشت فلاسک در میان میزبان‌های بیانی نشان می‌دهد.

با توجه به این‌که سلول‌های نوترکیب در اثر یک نوترکیبی همولوگ ایجاد می‌شوند، به دلیل تنوع در جایگاه ورود ژن در ژنوم، ممکن است نوآرایی‌های ژنتیکی گوناگون منجر به



شکل ۶. چاهک شماره ۱ نشان‌گر سیناژن PR.901641. چاهک شماره ۲ بتا-گزیلوزیداز نوترکیب. چاهک شماره ۳. آنزیم تجاری از گونه‌ی *Bacillus pumilus* با وزن مولکولی مشابه آنزیم نوترکیب

## بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق توالی ژن گزیلوزیداز برای بیان در مخمر پیکیا پاستوریس بهینه‌سازی گردید. هر سیستم بیانی دارای ذخیره‌ی tRNA متفاوت و در نتیجه در طی ترجمه دارای یک ترجیح کدونی (Codon preference) مشخص می‌باشد.

مقاله‌های بسیاری وجود دارد که نشان می‌دهد بیان پروتئین‌های نوترکیب در این میزبان اگر بر اساس ترجیح کدونی آن باشد بسیار بیشتر می‌شود. محققان نشان داده‌اند که وجود کدون‌های نادر سبب افزایش ناپایداری در mRNA حاصل و در نهایت سبب بیان کم‌تر پروتئین می‌گردد. پس از بهینه‌سازی، حدود ۲۲٪ از نوکلئوتیدها تغییر پیدا کردند (۳۶۵ نوکلئوتید از کل نوکلئوتیدهای ژن). در این مطالعه، سیستم بیانی مخمر متیلوتروف *Pichia pastoris* برای تولید آنزیم بتا-گزیلوزیداز نوترکیب استفاده شد. دلیل انتخاب سیستم بیانی پیکیاپاستوریس در این تحقیق، محاسن متعدد آن از جمله، وجود یک پروموتور قوی (AOX1)، امکان رشد در تراکم بالا در فرماتور، انجام فرآیندهای پس از ترجمه، دست‌ورزی آسان و خالص‌سازی آسان آنزیم تولیدی به دلیل بیان ترشچی آن بود. بیان پروتئین‌های نوترکیب در *P. pastoris* به دو صورت ترشچی و داخل سلولی امکان‌پذیر است. از آن‌جایی که پیکیا به طور طبیعی پروتئین‌های کمی به محیط کشت ترشح می‌کند، تخلیص پروتئین در بیان خارج سلولی ساده‌تر

arabinofuranosidase/xylosidase isolated from a compost starter mixture. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 81: 855-863.

[6] Jordan DB, Wagschal K. Properties and applications of microbial  $\beta$ -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: 1647-1658.

[7] Knob A, Terrasan CR, Carmona EC.  $\beta$ -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26: 389-407.

[8] Jordan DB, Li XL, Dunlap CA, Whitehead TR, Cotta MA. Structure-function relationships of a catalytically efficient beta-D-xylosidase. *Appl Biochem Biotechnol* 2007; 141: 51-76.

[9] Jordan DB, Braker JD. Inhibition of the two-subsite beta-D-xylosidase from *Selenomonas ruminantium* by sugars: competitive, noncompetitive, double binding, and slow binding modes. *Arch Biochem Biophys* 2007; 465:231-246.

[10] Buckholz RG, Gleeson MA. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y)* 1991; 9: 1067-1072.

[11] Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 2000; 16: 23-52.

[12] Farber NE, Troshynski TJ, Turco G. Spinal anesthesia in an infant with epidermolysis bullosa. *Anesthesiology* 1995; 83: 1364-1367.

[13] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 2005; 22: 249-270.

[14] Romanos M, Scorer C, Sreekrishna K, Clare J. The generation of multicopy recombinant strains. *Methods Mol Biol* 1998; 103: 55-72.

[15] Sreekrishna K, Potenz RH, Cruze JA, McCombie WR, Parker KA, Nelles L, et al. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Basic Microbiol* 1988; 28: 265-278.

[16] Hemdan ES, Porath J. Development of immobilized metal affinity chromatography: II. Interaction of amino acids with immobilized nickel iminodiacetate. *J Chromatogr A* 1985; 323: 255-264.

[17] Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 1979; 6: 23-28.

[18] Hengen P. Purification of his-tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 285-286.

[19] Zhao C, Hellman LM, Zhan X, Bowman WS, Whitehead SW, Fried MG. Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. *Anal Biochem* 2010; 399: 237-245.

[20] Cregg JM. *Pichia* protocols. *Method Mol Cell Biol* 2007; 389.

[21] Iembo T, Azevedo MO, Jr C, Filho EX. Purification and partial characterization of a new  $\beta$ -xylosidase from *Hemicella grisea* var. *thermoidea*. *World J Microb Biot* 2006; 22: 475-479.

[22] Chen Z, Jia H, Yang Y, Yan Q, Jiang Z, Teng C. Secretory expression of a  $\beta$ -xylosidase gene from *thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* and characterization of its recombinant enzyme. *Lett Appl Microbiol* 2012.

[23] Smaali I, Rémond C, O'Donohue MJ. Expression in *Escherichia coli* and characterization of  $\beta$ -xylosidases GH39 and GH-43 from *Bacillus halodurans* C-125. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73: 582-590.

[24] Suzuki S, Fukuoka M, Ookuchi H, Sano M, Ozeki K, Nagayoshi E, et al. Characterization of aspergillus oryzae glycoside hydrolase family 43  $\beta$ -xylosidase expressed in *Escherichia coli*. *J Biosci Bioeng* 2010; 109: 115-117.

کلون‌های مختلف با میزان بیان متفاوت شود. بنابراین برای دستیابی به بهترین کلون با بیان بالاتر بایستی تعداد زیادی کلون از لحاظ بیان مورد بررسی قرار گیرند. با سنجش فعالیت آنزیمی با کمک پارانیتروفنیل گزیلویپیرانوزید به عنوان سوبسترا، بهترین کلون از نظر فعالیت آنزیمی انتخاب شد.

نتایج SDS-PAGE بر روی محلول سوپرناتانت آنزیمی، صحت بیان ژن نو ترکیب در نمونه‌های مثبت را تایید کرده و نشان‌دهنده‌ی ترشح مناسب آنزیم در نتیجه‌ی استفاده از توالی آلفافاکتور مخمری در میزان بیانی پیکیاپاستوریس می‌باشد. در این تحقیق نشان داده شده است که پیکیاپاستوریس میزان بسیار مناسبی برای بیان گزیلوزیداز می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده، سویه نو ترکیب ایجاد شده با توجه به بیان مقادیر زیاد، پتانسیل بالایی برای استفاده در صنعت از استفاده در صنایع نساجی تا تولید بیواتانول دارد.

## تشکر و قدردانی

کلیمی مراحل آزمایشگاهی این پژوهش در آزمایشگاه نانوبیوتکنولوژی دانشکده‌ی مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که بدین وسیله از زحمات و مساعدت‌های انجام شده به ویژه استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سید امید رعنائی سیادت سپاس‌گزاری می‌شود.

## منابع

- [1] Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30: 279-291.
- [2] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 905-910.
- [3] Haan RD, Van Zyl WH. Enhanced xylan degradation and utilisation by *Pichia stipitis* overproducing fungal xylanolytic enzymes. *Enzyme Microbial Technology* 2003; 33: 620-628.
- [4] Fan Z, Werkman JR, Yuan L. Engineering of a multifunctional hemicellulase. *Biotechnol Lett* 2009; 31: 751-757.
- [5] Wagschal K, Heng C, Lee CC, Wong DW. Biochemical characterization of a novel dual-function

## Secretive expression of bacterial $\beta$ -xylosidase gene including hexahistidin-tag in *Pichia pastoris*

Shirin Yousefian(M.Sc)<sup>\*1</sup>, Seyyed Omid Ranaei Siadat(Ph.D)<sup>1</sup>, Ehsan Dehnavi(Ph.D)<sup>1,2</sup>, Mohammadtaghy Borjian Borujeni(M.Sc)<sup>1</sup>, Farnaz Nikzad Jamnani(M.Sc)<sup>1,3</sup>

1 - Nanobiotechnology laboratory, Department of biotechnology, faculty of Energy engineering and new technologies, Shahid beheshti University, Tehran, Iran

2 - Faculty of biology science, Tarbiat Moddares University, Tehran, Iran

3 - Dept. of biotechnology, faculty of agriculture and natural resources, science and research branch of Islamic azad University, Tehran, Iran

(Received: 28 Oct 2012; Accepted: 12 Feb 2013)

**Introduction:**  $\beta$ -D-Xylosidases (EC 3.2.1.37), one of the most important hemicellulases with high potential industrial application such as bioethanol production, are exo-type glycosidases that catalyze the successive removal of  $\beta$ -xylosyl residues from the non-reducing termini of xylobiose and higher linear  $\beta$ -1,4-xylooligosaccharides and in conjunction with  $\beta$ -xylanases are essential in completely depolymerizing xylan. The aim of this study was secretive expression of bacterial  $\beta$ -xylosidase gene including hexahistidin-tag in *Pichia pastoris* in order to achieve high level expression and enzyme purification subsequently.

**Materials and Methods:** In this study, after optimizing the sequence of protein encoding bacterial  $\beta$ -xylosidase based on the expression codon usage of *Pichia pastoris* and addition of 6xHis-tag sequence through suitable designed primers to gene, transformation of recombinant plasmids was performed through electroporation method into the expression yeast.

**Results:** The results showed that the recombinant  $\beta$ -xylosidase production was 40 U/L with 0/6 U/mg specific activity in flask culture.

**Conclusion:** Cloning and successful expression of bacterial  $\beta$ -xylosidase gene was carried out in order to obtain an active and stable enzyme with high level expression from yeast expression system.

**Keywords:** Yeasts, Xylosidases, Histidine, Gene expressio

\* Corresponding author: Fax: +98 21 22431782; Tel: +98 9132967850  
sh\_yousefian67@yahoo.com