پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۷، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲، صفحات ۲۱۱ تا ۲۱۹

مقاله اصلی
(Original Article)

کلونینگ و بهینه سازی کدون ژن فنیل آلانین دهیدروژناز در سیستم بیانی *E.coli* و مقایسه بیان ژن با دو پروموتور *T7* و *λPR*

سعید حیدری کشل[۱،۲]، صنم زندیان[۴]، فریبا قاسم وند[۳]، سعید رحمان زاده[۳]، معصومه ایمان‌زاد[۵]، نوید نظافت[۳*]

[۱] *مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی*
[۲] *واحد فراهم آوری سلول های بنیادی، مرکز تحقیقات چشم، بیمارستان فارابی، دانشگاه علوم پزشکی تهران*
[۳] *آزمایشگاه تکنولوژی آنزیم، گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران*
[۴] *دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز*
[۵] *دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز*

چکیده

سابقه و هدف: *یکی از کاربردهای پزشکی آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز، تعیین مقدار دقیق سطح L- فنیل آلانین در سرم خون افراد جهت شناسایی بیماران مبتلا به بیماری فنیل کتونوریا می‌باشد. در این مطالعه، میزان بیان پروتئین مورد نظر بعد از بهینه سازی کدون ژنی (pdh) در دو ناقل بیانی pET-23a و pPR37 در میزبان بیانی E.coli بررسی شد.*

روش بررسی: *در این تحقیق تجربی، از ژن فنیل آلانین دهیدروژناز (pdh) بهینه سازی شده مربوط به باکتری B. Sphaericus استفاده شد که در دو ناقل بیانی pET-23a و pPR37 کلون گردید. بیان ژن pdh در ناقلین بیانی pET-23a و pPR37 به ترتیب با افزودن القاگر شیمیایی IPTG(1mM) و تغییر دمایی ۳۰ به ۴۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. بهینه سازی کدون با نرم افزار Jcat انجام گرفت . آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز(PheDH) با استفاده از ستون کروماتوگرافیNi-NTA تخلیص گردید. در ادامه با SDS-PSGE ۱۰٪ وزن مولکولی نسبی زیر واحد PheDH را در حدود ۴۱ KDa نشان داده شد. همچنین خلوص و میزان پروتئین توسط SDS-PAGE تعیین گردید.*

یافته‌ها: *بیشترین میزان بیان ۸ ساعت بعد از القاء در سازه pETpdh/ BL21(DE3)plysS مشاهده شد، در حالی که میزان بیان در همان مدت زمان در سازه دیگر بسیار پایین بود. فعالیت ویژه آنزیم بعد از به کار گیری روش تخلیصی ۷۰۵ U/mg از پروتئین محاسبه شد. بیان پروتئین مورد نظر بعد از بهینه سازی کدون و در سازه ژنی pETpdh بیشتر بود.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به مقایسه دو سازه ژنی در بیان پروتئین مورد نظر، سازهpETpdh احتمالاًجهت تولید آنزیم PeDH در مقیاس بالا مناسب‌تر بوده و بر اساس این تحقیق برای این کار توصیه می‌گردد.*

واژگان کلیدی: *فنیل آلانین دهیدروژناز، بیان، پلاسمید، پروموتور.*

مقدمه

بیماری فنیل کتونوریا نقص متابولیکی مادرزادی نادری است که در آن نقص در سنتز آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز وجود دارد و بر این اساس این نوزادان امکان استفاده از شیر مادر یا شیر خشک‌های معمول را ندارند. اختلال اصلی در این بیماری، تجمع اسید آمینه فنیل آلانین در مایعات بدن و سیستم عصبی است. تجمع این اسید آمینه به دلیل عدم وجود آنزیم مورد نیاز برای تبدیل فنیل آلانین به تیروزین رخ می‌دهد. شناسایی سریع و به موقع این نقص بسیار حائز اهمیت است، لذا از کاربردهای پزشکی آنزیم ، شناسایی و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران ، گروه بیوشیمی، آزمایشگاه تکنولوژی آنزیم، نوید نظافت (**e-mail:** navidnezafat@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۱٤
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۲۰

تعیین میزان دقیق L-phe در سرم خون است که به منظور غربالگری بیماران مبتلا به PKU (فنیل کتونوریا) استفاده می‌شود. آنزیم L- فنیل آلانین دهیدروژناز $^{+}$PheDHNAD) اکسیدوردوکتاز دامیناز؛EC 1.4.1.20 در سال ۱۹۸۴ شناسایی شد (۱) و پس از آن در منابع میکروبی مختلفی از قبیل *Bacillusbadius* (۲)، *Sporocarcina* (۳)، *Microbacterium Maris* k-18 (۴) *Rhodococcus* (۵)، *Nocardia* (۶) و *Thermoactinomyces* (۷) یافت شد. pheDH دارای کاربردهای صنعتی و تجاری نیز می باشد. از مصارف صنعتی pheDH تولید L-فنیل آلانین خالص نوری است (۸، ۹) که از آن به عنوان شیرین کننده مصنوعی آسپارتام (با نام تجاری Nutrasweetener) استفاده می‌شود (۱۰). لذا تولید صنعتی این آنزیم هم جهت مصارف پزشکی و هم صنعتی بسیار مهم است. با توجه به پائین بودن میزان تولید آنزیم در سویه‌های وحشی، محققین از تکنولوژی‌های DNA نوترکیب به منظور افزایش میزان بیان آنزیم استفاده می‌کنند (۱۱). در اولین تحقیقاتی که جهت افزایش تولید آنزیم pheDH صورت گرفت، شرایط رشد در *Brevibacterium*-sp بهینه (۱۲) و سپس با استفاده از تکنیک‌های DNA نوترکیب، ژن فنیل آلانین دهیدروژناز (pdh) مربوط به سویه باکتریایی *Bacilusbadius IAM در ناقل pBR322 کلون و در E.coliRR1 به میزان بالایی بیان شد* (۲). در تحقیق دیگری ژن *pdh* از باکتری *Bacillus sphaericus جدا و وارد پلاسمید* pUC9 شده و در نهایت در *E. coli*JM103 ترانسفورم گردید (۱۳). در ادامه جداسازی ژن *pdh* از کتابخانه ژنومی *Rhodococcus* sp.M4 صورت گرفت و ژن در ناقل بیانی pET-3d کلون و در میزبان *E. coli* BL21(DE3) بیان گردید (۱۰). امیدی نیا و همکاران میزان بیان ژن *pdh* که تحت کنترل دو پروموتور وحشی بود در دو میزبان *B.subtilis* و *E.coli* JM109 مورد مقایسه قرار دادند (۱۴). در این تحقیق میزان بیان pheDH در دو سیستم بیانی مختلف با یکدیگر مقایسه شدند. در سیستم اول از ناقل بیانی pET-23a و میزبان *E. coli*BL21(DE3)plysS استفاده شد. در این سیستم (PET-23a/BL21(DE3) plysS) ژن *pdh* در پائین دست پروموتور T7 قرارمی‌گیرد. در سیستم دوم از ناقل بیانی pPR37 و *E. Coli* TG1 استفاده شد و در آن ژن *pdh* در پائین دست پروموتور سمت راست فاژ لامبدا کلون شد، پروموتور این ناقل به طور حرارتی توسط سرکوب کننده جهش یافته *CI857 مقاوم به حرارت کنترل می‌شود.*

بیان بالای ژن‌های هدف در اشرشیا کولی به دلیل اطلاعات وسیع از ژنتیک اشرشیاکولی، گستردگی حامل‌ها و گونه‌های بیانی، راحتی استفاده و قیمت ارزان و بازده بالا در تولید پروتئین‌ها، هنوز روش ترجیحی در بیان پروتئین‌های نوترکیب است. با این وجود دلایل اولیه در عدم موفقیت در تولید کارآمد پروتئین نوترکیب شامل ترجیح استفاده کدونی، سمیت محصول، حلالیت، ساختار دوم mRNA و پایداری mRNA است (۱۶).

بیان پروتئین‌های غیرمتجانس در اشرشیا کولی ممکن است به دلیل ترجیح استفاده کدونی کاهش یابد. در این موارد، اگر تمایل کدونی یک ژنی که می خواهد بیان شود با تمایل کدونی که در اشرشیا کولی استفاده می شود متفاوت باشد. غلظت‌های tRNAs در اشرشیا کولی برای کدون‌هایی که استفاده کمتری دارند کافی نیست و در نتیجه ترجمه بهینه RNA اتفاق نمی‌افتد. وجود کدون‌های نادر باعث اشتباهات ترجمه‌ای مانند توقف، پایان، جایگزینی آمینواسید و تغییر احتمالی چهارچوب خواندن است. رقابت برای tRNA نادر همچنین می‌تواند تاثیر منفی روی بیان ژن‌های میزبان داشته باشد.

کدون‌های آرژنین (AGA و AGG) به طور اختصاصی در اشرشیا کولی نادر است، همان طور که tRNA مرتبط با این کدون‌ها نیز نادر است و این کدون‌ها می‌توانند باعث اشتباهات ترجمه‌ای و در نتیجه کاهش سطح بیان پروتئین مورد نظر شوند. عدم پیوستگی در مورد کدون CGG نیز مشاهده شده است. به دلیل اینکه تمام کدون‌هایی که در یک خانواده کدونی مترادف قرار دارند با یک سرعت یکسان در بیان پروتئینهای غیر متجانس در اشرشیا کولی مورد استفاده قرار نمی‌گیرند (تمایل کدونی)، بهینه سازی کدون در تولید پروتئین‌های یوکاریوتی در میزبان‌های پروکاریوتی لازم است (۱۵).

استراتژی‌های مختلفی برای کاهش تمایل استفاده کدونی به کار می رود. یکی از پر کاربردترین استراتژی‌ها به نام بهینه سازی کدون یا "codon optimization" معروف است.

تکنیک بهینه سازی کدون به طور وسیع برای افزایش بیان پروتئین‌های خارجی استفاده می‌شود و معمولا موجب افزایش ۱۰ تا ۵۰ برابری در تولید پروتئین هدف می‌شود (۱۶).

مواد و روشها

این مطالعه به روش تجربی انجام گرفت. اجزای مورد استفاده در این مطالعه شامل نرم افزار آنلاین Jcat جهت اپتیمایز نمودن کدون ژنی مورد نظر برای میزبان بیانی

E.coli، سازه ژنی سنتز شده در وکتور حدواسط pGEM-5ZF، ناقلین بیانی pET-23a و pPR37، جفت پرایمر های طراحی شده جهت تکثیر و کلون نمودن ژن در داخل ناقلین، آنزیم‌های محدودالاثر *BamHI, HindIII, BgLII* و محیط کشت‌های لازم جهت رشد میزبان بیانی *E.coli* بودند.

بهینه سازی کدون ژن *pdh*

در ابتدا ژن *pdh* وحشی مربوط به باسیلوس اسفریکوس توسط نرم افزار آنلاین (۱۸)Gene script (http://www.jcat.de/) بررسی و سپس به دلیل اینکه کدون‌های این ژن برای بیان در میزبان بیانی *E.coli* ارجحیت نداشت، کدون‌های توالی اصلی با کدون‌های دارای ارجحیت بیشتر در *E.coli* توسط نرم افزار Jcat جایگزین گردید. در نهایت ژن بهینه سازی شده توسط نرم افزار آنلاین Gene script بررسی مجدد شد.

تکثیر پلاسمیدها در *E. coli*DH5α و XL1-Blue (Invitrogen, USA) صورت گرفت. ناقل pET-23a از شرکت Novagen(USA)، محیط کشت لوریا برتانی (LB) برای رشد باکتری *E.coli*، آنتی‌بیوتیک‌ها، X-gal، IPTG از شرکت MERCK و آنزیم های محدودکننده و DNA لیگاز T4 از شرکت فرمنتاز خریداری شدند. همچنین کیت‌های PCR، تخلیص DNA از روی ژل، تخلیص پلاسمید از شرکت فرمنتاز خریداری شدند.

آماده سازی ژن *pdh*

سازه ژنی مورد استفاده در این تحقیق، ژن *pdh* بهینه سازی شده متناسب با میزبان *E.coli* بود که در وکتور حدواسط pGEM-5ZF (شرکت ندای فن) سنتز گردید. ژن*pdh* باسیلوس اسفریکوس ۱۱۴۶ جفت باز طول داشت که از بانک ژنی NCBI به دست آمد و کد دسترسی آن (Accession No.) M26661.1 بود.

ساب کلون کردن *pdh* در pET-23a

آماده سازی ژن *pdh*

ژن *B.sphaericuspdh* بهینه‌سازی شده با نرم افزار Jcat که در داخل سازه ژنی pGEM-pdh تهیه شده بود، توسط واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) از سازه ژنی فوق به عنوان الگو توسط پرایمر جلو رونده ۲۲ جفت بازی 5´TGGATCCATGGCAAAACAGCTT3´ و عقب رونده ۲۵ جفت بازی 5´GCGAAGCTTCTCTTTTATGTTCCAC3´ جدا شد. پرایمر جلو رونده دارای جایگاه برش *Bam*HI و کدون آغاز ATG است و پرایمر عقب رونده فقط دارای جایگاه برش *Hind*III است. محصول PCR (۱۱۴۶ جفت باز) توسط دو آنزیم محدودکننده *Hind*II و *Bam*HI بریده شده، قطعه ژنی به دست آمده وارد جایگاه برش *Hind*III, *Bam*HI ناقل pET-23a گردید. سازه جدیدی که بدین ترتیب حاصل شده، pETpdh نامیده می‌شود.

ساب کلون کردن *pdh* در pPR37

آماده سازی ژن *pdh*

ژن *B.*sphaericuspdh بهینه سازی شده توسط نرم افزار Jcat که در داخل سازه ژنی pGEM-pdh ساخته شده، توسط واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) از سازه ژنی فوق به عنوان الگو، توسط پرایمر جلو رونده 5´GCAGATCTATGGCAAAACAGCTT3´ که دارای جایگاه برش *Bgl*II و کدون آغاز ATG است و پرایمر عقب رونده که جایگاه برش *Bam*HI در آن طراحی شده است، جدا سازی شد . ناقل pPR37 که دارای پروموتور قابل القاء توسط حرارت در بالا دست جایگاه برش *Bam*HI و *BgL*II است، توسط دو آنزیم *BgL*II و *Bam*HI بریده شده و قطعه ژنی حاصل وارد جایگاه *BgL*II و *Bam*HI ناقل pPR37 شد. سازه جدید pPRpdh نامیده می‌شود. به منظورتعیین کلون‌های مناسب در ناقل بیانی pPR37، که در آنها جهت ژن‌های کلون شده نسبت به پروموتور صحیح بود، بعد از بررسی آنزیمی قطعه ترانسفورماسیون ، ۱۰ کلون انتخاب و در محیط کشت LB رشد داده شد که ۲ تا از این کلون‌ها دارای بیان پروتئینی مورد نظر بودند.

ترانسفورماسیون

سلول‌های BL21(DE3)plysS و TGL به ترتیب توسط pETpdh و pPRpdh ترانسفورم شدند. تهیه سلول‌های مستعد برای ترانسفورماسیون بر اساس پروتکل ذکر شده در کتاب Sambrook انجام شد. سویه BL21(DE3)plysS فاژ لامبدا لیزوژن دارای ژن ۱ T7 است (که RNA پلیمراز T7 را کد می‌نماید) و توسط توالی پروموتور – اپراتور LacUV5 کنترل می‌شود و با IPTG القاء می‌گردد (۱۸). *E.coli*DH5α و XL1-Blue به ترتیب برای تکثیر و تخلیص pETpdh و pPRpdh استفاده می‌شود.

بیان pheDH

سلول‌های ترانسفورم شده در محیط کشتLB ۳۷ درجهسانتی‌گراد حاوی آمپی سیلین با غلظت۵۰ µg/ml

رشد داده شدند و رشد باکتری‌ها به OD_{600}=۰/۶ رسید. سلول‌هایی که دارای pETpdh بودند، با اضافه کردن ۱mM IPTG القاء شدند و سلول‌های حاوی pPRpdh با افزایش دما از ۳۷ به ۴۲ درجه سانتی‌گراد القاء گردیدند و سپس در زمان‌های مختلف ۳ ساعت، ۵ ساعت و ۸ ساعت پس از القاء، سلول‌ها توسط سانتریفوژ ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه جمع آوری شده و دو بار توسط محلول ۰/۹٪NaCl شستشو داده شدند و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گرتد نگهداری گردیدند.

تخلیص pheDH دارای His-Tag

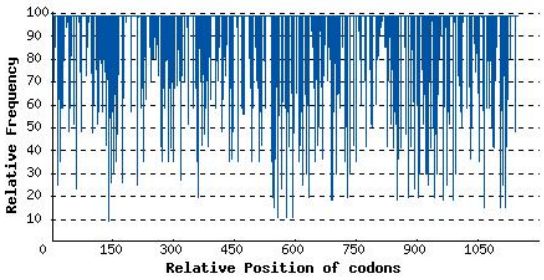
رسوب سلول‌ها در بافر A (50 mMTris-HCl pH 8.3 ، 0.1 mM EDTA ، 5 mM 2-mercaptoethanol دارای ۱mg/ml لیزوزیم) معلق شده، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند و در ادامه سلول‌ها توسط دستگاه اولتراسونیکاسیون به مدت ۱۰ دقیقه با امواج اولتراسونیک ۹ KHz شکسته شدند. به منظور حذف سلول‌های خرد شده، محلول سونیکاسیون به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. آنگاه سوپرناتانت حاصله در محلول بافری Tris-Hcl 20mM با pH8 که شامل NaCl 0.5M و ۲ مرکاپتواتانول 2mM بود، حل شده و سپس به ستون سفارز- شلات کننده (Ni^{2+}(Cl-6B QIAGEN، اضافه شدند. در ادامه ستون با بافر ایمیدازول ۲۵mM شستشو داده شد و پس از آن آنزیم با بافر ۲۰mM HcL و pH8 (شامل NaCl 0.5M ، ۲ مرکاپتواتانول۲mM و ایمیدازول ۲۵۰mM) از ستون جدا و تخلیص شد. پس از جمع‌آوری پروتئین تخلیص شده از ستون‌های مختلف و یکپارچه سازی آنها، علیه بافر B(Tris-HCl25mM,pH8 و EDTA0.05mM و 2-mercaptoethanol2.5mM) دیالیز شدند. در ادامه آنزیم تخلیص شده با SDS-PAGE مورد شناسایی قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیمی

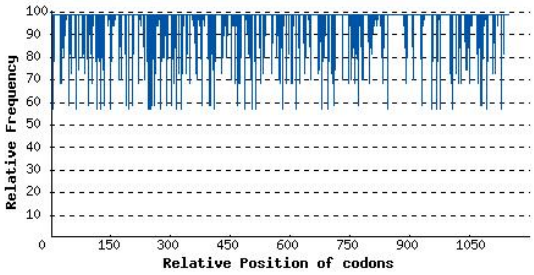
سنجش فعالیت آنزیمی pheDH در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد توسط احیاء NAD^+ با استفاده از L- فنیل آلانین به عنوان سوبسترا در ۱ml مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰mM بافر گلایسین –KCl–KOH,,pH9.0، 1mM NADH، 200mM NH4Cl ، 10mM Sodioumphenylpyrovate انجام گرفت و در نهایت نمونه آنزیمی اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین پارامترهای Km وVmax آنزیم pehDH، غلظت‌های مختلف L- فنیل آلانین وNAD^+به کار برده شد. آمیناسیون احیایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰mM بافر گلایسین –KCl–KOH ، pH 9.0 ، 0.1mM NADH ، 200mM NH4Cl ، 10mM فنیل پیروات سدیم و محلول آنزیمی (در حجم کل 1ml) انجام شد. یک واحد آنزیمی ، مقداری از آن آنزیم است که تشکیل ۱μmol از NADH را در واکنش دآمیناسیون اکسیداتیو کاتالیز کند. غلظت پروتئین توسط اسپکتروفوتومتر (جذب در 280 nm با ضریب جذب $A_{1\%/1cm}$=6.3) با کیت سنجش غلظت پروتئین (Bio-radlaboratories,Inc) تعیین شد (۲۰،۱۹).

یافته‌ها

شاخص ارجحیت کدون ژن *pdh* قبل از بهینه سازی در شکل ۱ و بعد از بهینه سازی در شکل ۲ ارائه شده است و نشان می‌دهد که ژن وحشی در داخل میزبان بیانی *E.coli* با شاخص ارجحیت کمتر از ۰/۶۶ بیان شده و بعد از بهینه سازی در داخل همان میزبان با شاخص بیانی بالای ۰/۸۶ بیان شده است. بر اساس شاخص‌های نرم افزاری این مقدار این شاخص جهت بیان مناسب یک ژن در داخل یک میزبان بزرگ‌تر از ۰/۸ می‌باشد.



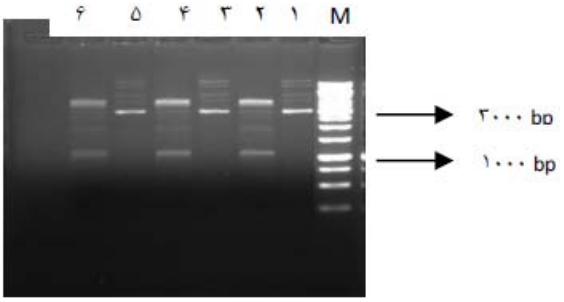
شکل ۱. شاخص ارجحیت کدون (CAI: codon adaption index) ژن pdh قبل از بهینه سازی کدون



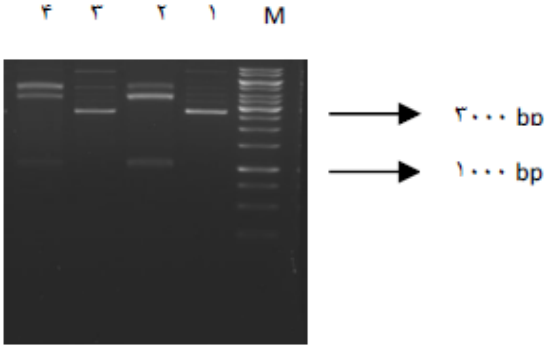
شکل ۲. شاخص ارجحیت کدون (CAI) ژن *pdh* بعد از بهینه سازی کدون

در شکل ۳ و ۴ حضور ژن *pdh* در داخل سازه‌های ژنی پس از بهینه سازی ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که ژن مورد نظر به درستی در داخل سازه‌های ژنی pETpdh و pPRpdh

کلون شده بودند. در شکل ۳، ستون‌های M نمایانگر مارکر 1Kb، ستون ۱: pET-23a برش نخورده، ستون ۲: سازه pETpdh برش خورده با *Hind*III و *Bam*HI و ستون‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب pET-23a برش نخورده و pETpdh برش خورده با *Hind*III و *Bam*HI از کلون‌های مختلف می باشد. در شکل ۴ نیز ستون ۱: pPR37 برش نخورده، ستون۲: سازه pPRpdh برش خورده با *Bam*H و *BgL*II از کلون‌های مختلف و ستون‌های ۳ و ۴: ناقل pPR37 برش نخورده و سازه برش داده شده از کلون دیگر می‌باشد.



شکل ۳. تایید حضور ژن pdh در سازه pETpdh توسط برش آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪



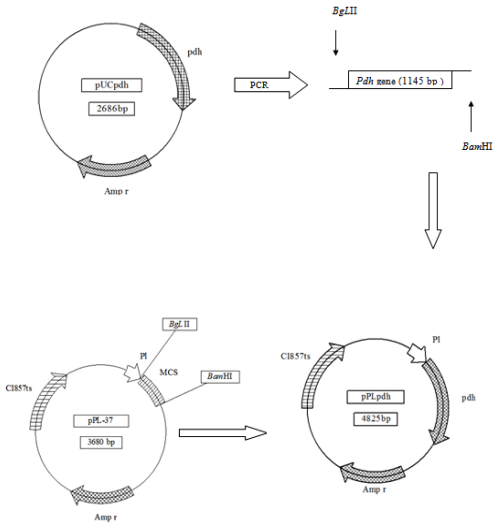
شکل ۴. تایید حضور ژن pdh در سازه pPRpdh توسط برش آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱٪

سازه و ترانسفورماسیون

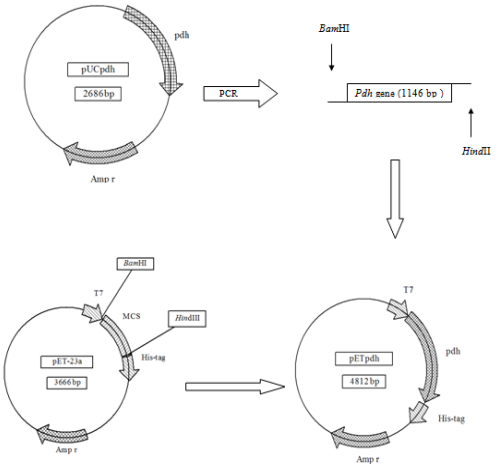
در شکل ۵، نحوه ترانسفورماسیون ژن pdh در ناقل بیانی pPR37 به صورت شماتیک نشان داده شده است و در شکل ۶ نیز نحوه ترانسفورماسیون ژن در ناقل بیانی pET-23a ارائه گردیده است.

بیان ، بررسی SDS-PAGE و تخلیص

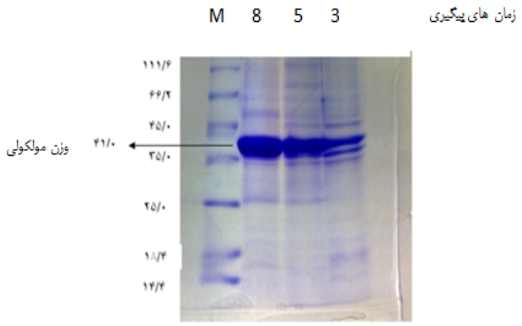
میزان کمی بیان pheDH در سازه pETpdh توسط SDS-PAGE ۱۰٪ بررسی و در شکل ۷ ارائه شده است و در ستون ۳ نشان می‌دهد که در زمان ۸ ساعت بعد از القاء بیشترین بیان را داشته است و کمترین بیان مربوط به ۵ ساعت بعد از القاء بوده است. وزن مولکولی این پروتئین ۴۱ کیلو دالتون بود. به منظور بررسی کمی pheDH، ژل توسط کوماسی بلو R250 رنگ آمیزی و سپس اسکن گردید.



شکل ۵. ساب کلونینگ ژن *pdh* در ناقل بیانی (pPRpdh)pPR37 .

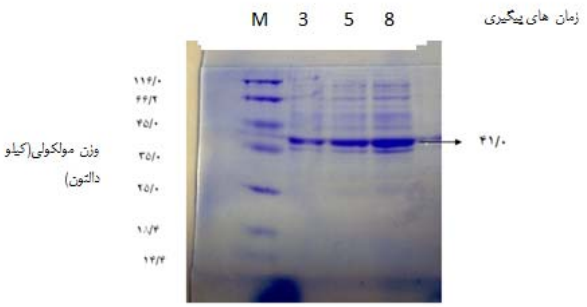


شکل ۶. ساب کلونینگ ژن pdh در ناقل بیانی(pET-23a (pETpdh



شکل ۷. SDS-PAGE میزان بیان pheDH در سازه pETpdh در زمان‌های پیگیری.

در شکل ۸ میزان کمی بیان ژن *pdh* در سازه pPRpdh ارائه شده است و نشان می‌دهد که در ۸ ساعت بعد از القاء میزان بیان بالاتری را داشته است. وزن مولکولی پروتئین مورد نظر ۴۱ کیلو دالتون بود.



شکل ۸. SDS-PAGE میزان بیان pheDH در سازه pPRpdh در زمان‌های پیگیری

میزان بیان محصول pheDH در سازه‌هایpPRpdhpETpdh با استفاده از اسکن دنسیتومتری و نرم افزار Quanti-Scan به صورت کمی در آمد. نتایج نشان دادند که پیک تولید محصول در هر دو سازه در ۸ ساعت بعد از القاء بود و میزان تولید در BL21(DE3)plysS/pETpdh ۶۵/۵٪ و برای TG1/pPRpdh حدود ۱۵/۶٪ از کل پروتئین باکتریایی بود. بنابراین میزان بیان در سازه pETpdh تقریباً ۴ برابر میزان بیان در سازه دیگر بود.

تعیین پروتئین و سنجش آنزیمی :

میزان بیان آنزیم در BL21(DE3)plysS/pETpdh و TG1/pPRpdh توسط اندازه‌گیری فعالیت اکسیداتیو NADH به عنوان شاخص تعیین شد.

جدول ۱. میزان بیان pheDHبه تفکیک سازه‌ها

سازه پروموتر	فعالیت آنزیم در محیط کشت(واحد آنزیمی/لیتر)
BL21(DE3)plysS/pETpdh T7	۱۷۰۰۰
TG1/pPRpdh λ	۴۹۰۰
E. coli BL21(DE3)/pETDHT7 lac and wild	۶۳۰۰
E. coli JM109/pBPDH1-DBL[a]Lac and wild	۷۲۰۰

[a]Asano*et al*. 1990.

داده‌های به دست آمده نشان دادند که بیشترین میزان تولید pheDH در سازه pETpdh است و در سایر موارد میزان بیان کمتری را نشان دادند. بدین دلیل، سازه pETpdh برای تخلیص آنزیم و رنگ آمیزی انتخاب شد (جدول ۲).

جدول ۲. تخلیص آنزیم pheDH از E.coli BL21 (DE3)/pETDH و تعیین میزان فعالیت آنزیم

مرحله	فعالیت (U)	پروتئین (mg)	فعالیت ویژه (U/mg)	محصول (%)
عصاره تام (crude extract)	۱۰۸۵۰	۱۴۰۹	۷/۷	۱۰۰
خالص سازی روی ستون (Ni-NTA column)	۶۳۵۰	۹	۷۰۵	۶۰

همان گونه که داده‌های جدول ۲ نشان می‌دهند در عصاره تام گرفته شده از محیط کشت که حاوی همه پروتئین‌های موجود در باکتری می‌باشد، فعالیت ویژه آنزیم PeDH ۷/۷ واحد در هر میلی گرم می‌باشد، اما در ادامه با خالص سازی این محصول بر روی ستون نیکل و جداسازی آنزیم مورد نظر، فعالیت ویژه آنزیم برای دآمیناسیون اکسیداتیو L- فنیل آلانین ۷۰۵U/mg پروتئین بود، در حالی که فعالیت pheDH تخلیص شده از BL21(DE3)plysS/pETpdh، طبق جدول ۱ ۱۷۰۰۰U/L اندازه گیری شد، به عبارتی بعد از تخلیص فعالیت ویژه آنزیم افزایش یافته است.

بحث

این تحقیق نشان داد که بهینه سازی کدون ژن فنیل آلانین دهیدروژناز جهت بیان در میزبان *E.coli*کارامد بوده و میزان بیان پروتئین در این روش نسبت به استفاده از ژن سویه وحشی باکتری باسیلوس اسفریکوس بالاتر رفته است. همچنین در بررسی و مقایسه قدرت بیان دو ناقل بیانی مورد نظر که هر یک واجد پروموتر خاص خود بودند، به این نتیجه رسیدیم که بیان این ژن در میزبان E.coliتوسط ناقل pET-23a که دارای پروموتور T7 بود، نسبت به ناقل بیانی pPR37 که دارای پروموتر λPR بود، حدود ۴ برابربیشتر بود. در هر دو سازه در بازه زمانی ۸ ساعت بعد از القاء بیشترین میزان بیان دیده شد. فعالیت ویژه آنزیم بعد از تخلیص افزایش یافت که این مقدار ۳۸۶ بار بیشتر از سویه وحشی آن در B.sphaericus (۴۴U/L) بود (۹).

در سیستم‌های بیانی القاء شونده توسط IPTG، مانند سیستم بیانی pET، به منظور تولید پروتئین نوترکیب نیاز به القاء توسط القاءکننده شیمیایی IPTG است. در این سیستم، RNA پلیمرازT7، توسط ژن1 T7 که بر روی ژنوم *E.coli* سویه BL21(DE3)plysS قرار گرفته است، رمز می شود.

پروموتور LacUV5 سنتز RNA پلیمراز T7 را کنترل می‌نماید. بدین منظور القاگر شیمیایی IPTG با غیر فعال نمودن سرکوبگر LacI می‌تواند منجر به فعال سازی پروموتور T7 گردد. سیستم pET که در این مطالعه از آن استفاده شده است، دارای سه مزیت است: ۱) پروموتورقوی T7 در ناقل pET-23a، ۲) وجود شش آمینو اسید پشت سرهم هیستیدین که به انتهای کربوکسیل پروتئین نوترکیب اضافه می شود (His-tag) که تخلیص پروتئین را توسط ستون کوماتوگرافی Ni^{+}-NTA تسهیل می‌نماید، ۳) میزبان بیانی *E.coli* سویه BL(DE3)plysS که دارای پلاسمید plysS است که لیزوزیم T7 را رمز می‌کند که این لیزوزیم به باقیمانده‌های RNA پلیمراز که در غیاب القاء وجود دارند متصل شده و مانع از بیان پروتئین نوترکیب در زمان القاء شدن می‌شود.

این سیستم دارای نقایصی از قبیل هزینه بالا و سمیت بالقوه IPTG است که مانع از استفاده آن در مقادیر صنعتی و کاربردهای درمانی می‌شود. در سیستم‌های قابل القاء توسط حرارت مانند pPR، تولید پروتئین نوترکیب توسط تغییر دمایی، بدون استفاده از القاء کننده های سمی و گران قیمت صورت می‌گیرد. در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و پایین‌تر سرکوبگر CI که توسط ناقل تولید می‌شود، فعال است و پروموتور را سرکوب می‌کند. افزایش دما منجر به غیر فعال شدن سرکوبگر و در نهایت باعث القاء رونویسی از ژن و سنتز pheDH می‌شود (۵، ۲۲). این سیستم دارای دو مزیت عمده است: ۱) القاء آسان و کم هزینه پروموتور(۱۱)، ۲) استفاده از پروتئین نوترکیب حاصله در مصارف درمانی به دلیل استفاده از القاگر غیرسمی.

بررسی پروتئین‌های تام بیان شده از لیز سلولی در سازه‌های pETpdh و pPRpdh نشان داد که میزان تولید محصول در سیستم pETpdh به طور قابل ملاحظه‌ای از سیستم pPRpdh بیشتر است، اگرچه مزیت λPR قابل القاء توسط حرارت، راحتی و کم هزینه بودن آن است (۲۲). در مطالعات قبلی، مقادیر مختلف آنزیم ازpheDH نوترکیب از *B. badius* IAM ،*Brevibacterium*sp (3342 U/l) (2390U/l)، *B. sphaericus* SCRC-R97a (7200 U/l) ، *B. subtilis* ISW1214 (4700 U/l) و *E. coli* BL21(DE3) (6300 U/l) به دست آمده است (۳، ۴، ۱۰، ۱۲). با این وجود، Hanson و همکارانش تولید مقدار زیادی از pheDH نوترکیب T.intermedius در *E.coli* را گزارش کردند (۱۹۰۰۰U/L) (۲۴) . ظاهراً نتایج مختلف حاصله بستگی به نوع پروموتور، ساختار mRNA و توپولوژی آن و شرایط بیان از قبیل بهینه سازی غلظت IPTG، نوع رده سلولی، محیط کشت و شرایط القاء دارد. در این مطالعه، ژن *pdh* در دو ناقل بیانی مختلف که دارای پروموتورهای متفاوتی‌اند، ساب کلون گردید. میزان بیان pheDH در pETpdh، ۶۹۰۰U/L و در pPRpdh، ۴۹۰۰U/L به دست آمد. بیشترین میزان بیان مربوط به سازه pETpdh/ *E. coli* BL21(DE3)plysS بود. بنابراین، محصول pETpdh با ستون کروماتوگرافی Ni-NTA با هموژنسیته نهایی ۶۰٪ تخلیص شد. در نهایت در این پروژه هدف رسیدن به یک سازه بیانی مناسب‌تر جهت تولید صنعتی آنزیم فنیل آلانین دهیدروژناز بود و بر اساس این تحقیق سازه pETpdh راندمان بالاتری را نشان داد هرچند این ناقل بیانی به توسط القاگر IPTG که یک ترکیب شیمیایی گران و دارای سمیت است، تحریک می‌گردد. شاید بتوان با بررسی‌های بیشتر سازه pPRpdh را با راندمان بالاتری ارائه نمود تا از آن به جای سازه pETpdh استفاده شود. علت موفق شدن در بازده تولید بالاتر به واسطه تغییر کدون‌ها و تبدیل آنها به کدون‌های مناسب برای بیان در سیستم بیانی E.coli را می‌توان این گونه بازگو نمود که در بررسی ارجحیت کدون‌ها، کدون‌هایی که به طور مکرردر میزبان برای بیان پروتئین‌ها استفاده می‌شوند با کدون‌های نادری که در طول توالی ژن درموقعیت‌های مختلف قرار دارند، جایگزین می‌شوند. فرضیه این استراتژی این است که با وارد کردن یک جانبه کدون‌هایی که به طور مکرر در میزبان برای بیان پروتئین‌ها استفاده می‌شوند در طول توالی، پروتئین حاصل با میزان بالایی بیان می‌شود، زیرا دیگر tRNA پذیرنده به عنوان عامل محدود کننده در سنتز پروتئین نیست. این نگرش منجر به بیان موفقیت آمیز تعدادی از محصولات می‌شود، با این وجود در بعضی از موارد افزایش بسیار بالای پروتئین باعث تولید پروتئین‌های نامحلول در ساختارهای انکلوزیون می‌شود که استراتژی‌های برای خالص سازی آنها باید به کار رود (۱۵). نیاز به استفاده‌های گوناگون پروتئین‌ها در پزشکی و صنعت را نمی‌توان از ذخایر طبیعی موجود در باکتری‌ها تامین نمود. توانایی باکتری *E.coli* در رشد سریع، آسانی کشت باکتری در محیط کشت‌های ارزان، ساختار ژنتیکی شناخته شده آن و در دسترس بودن انواع گوناگون ناقلین بیانی برای *E.coli* موجب گردیده است که *E.coli* به عنوان یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین میزبان‌ها به منظور تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده قرار گیرد. هنگام بیان پروتئین‌های نوترکیب، معمولاً انتظار این است که به مقادیر زیادی محصول پروتئینی به دست آید. برخی از پارامترهای مهم که بر میزان بیان پروتئین هترولوگوس در

E.coli تـاثیر مـی گذارنـد عبارتنـد از: تعـداد نسـخه‌هـای پلاسمیدی، پایـداری و فولـدینگ mRNA، پروموتـور، عناصـر موثر در ترجمه، سمیت پروتئین و ارجحیت کدون‌ها (۲۱).

وزن مولکولی زیرواحد pheDH در سویه‌های مختلف بـین ۳۶ تا ۴۲ کیلو دالتون تخمین زده مـی‌شـود (۱۰). وزن مولکـولی pheDH نوترکیب بـه دسـت آمـده در ایـن تحقیـق ۴۱ کیلـو دالتون تخمین زده شده است که بـا گزارشـات قبلـی منطبـق است (۳). تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در سـاختار چهـارم ایـن آنزیم وجود دارد. آنزیم به دست آمده از *Rhodococcusmaris* K-18 و *Rhodococcus* sp.M4 به صورت دایمر گزارش شـده اسـت (۲۵). از طـرف دیگـر *B. badius*, *B. sphaericus*, *Microbacterium*sp و DM 86-1, *S. ureae* به صورت هشـت تایی است *Nocardia* sp . 239 (4)به صورت مونومر است (۶).

بطور خلاصه، ژن *B.sphaericuspdh* به طور موفقیـت آمیـزی در دو ناقـل بیـانی pET و pPR کلـون و در سیسـتم میزبـان *E.coli* بیان شدند. میزان پروتئین بیان شده در دو سیستم بـا یکدیگر مقایسه شد. نتایج نشان داد که میزان پروتئین کـه در سیستم pET بیان می‌شود ، بیشـتر از pPR اسـت. بنـابراین از سیستم pET برای انجام مراحل پائین دست پروتئین اسـتفاده شد، آنزیم بیان شده دارای برچسب پلی هیستیدین مـی‌باشـد که برای تثبیت بر روی سطح پلیت میکرولیتر پوشیده شـده از نیکل ایده آل است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از شورای پژوهشی مرکز تحقیقات پروتئومیکس بیان نموده و مقاله حاضر حاصـل پایان نامه دانشجویی می‌باشد.

REFERENCES

1. Hummel W, Weiss N, Kula MR. Isolation and characterization of a bacterium possessing L-phenylalanine dehydrogenase activity. Arch Microbiol 1984; 137: 47-52.

2. Asano Y, Nakazawa A, Endo K, Hibino Y, Ohmori M, Numao N, et al. Phenylalanine dehydrogenase of *Bacillus badius*. Eur J Biochemistr 1987;168:153-59.

3. Asano Y, Nakazawa A, Endo K. Novel phenylalanine dehydrogenases from *Sporosarcina ureae* and *Bacillus sphaericus.* Purification and characterization. J Biol Chemistr 1987; 262: 10346-54.

4. Asano Y, Tanetani M. Thermostable phenylalanine dehydrogenase from a mesophilic *Microbacterium sp.* strain DM 86-1. Arch Microbiol 1998;169: 220-24.

5. Misono H, Yonezawa J, Nagata S, Nagasaki S. Purification and characterization of a dimeric phenylalanine dehydrogenase from Rhodococcusmaris K-18. J Bacteriol 1989;171: 30-36.

6. Boer L, Rijssel M, Euverink G, Dijkhuizen L. Purification, characterization and regulation of a monomeric L-phenylalanine dehydrogenase from the facultative methylotroph Nocardia sp. 239. Arch Microbiol 1989;153:12-18.

7. Ohshima T, Takada H, Yoshimura T, Esaki N, Soda K. Distribution, purification, and characterization of thermostable phenylalanine dehydrogenase from thermophilicactinomycetes. J Bacteriol 1991;173:3943-48.

8. Tachibana S, Suzuki M, Asano Y. Application of an enzyme chip to the microquantification of *L-phenylalanine.* Anal Biochemistr 2006; 359: 72-78.

9. Asano Y, Yamada A, Kato Y, Yamaguchi K, Hibino Y, Hirai K, et al. Enantioselective synthesis of (S)-amino acids by phenylalanine dehydrogenase from Bacillus sphaericus: use of natural and recombinant enzymes. J Organic Chem 1990;55:5567-71.

10. Brunhuber N, Banerjee A, Jacobs Jr WR, Blanchard JS. Cloning, sequencing, and expression of Rhodococcus L-phenylalanine dehydrogenase. Sequence comparisons to amino-acid dehydrogenases. J Biol Chemistr 1994;269: 16203-11.

11. Peti W, Page R. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. Protein Expression and Purification 2007; 51: 1-10.

12. Hummel W, Schmidt E, Wandrey C, Kula MR. L-Phenylalanine dehydrogenase from Brevibacterium sp. for production of L-phenylalanine by reductive amination of phenylpyruvate. Appl Microbiol Biotechnol 1986;25:175-85.

13. Okazaki N, Hibino Y, Asano Y, Ohmori M, Numao N, Kondo K. Cloning and nucleotide sequencing of phenylalanine dehydrogenase gene of *Bacillus sphaericus*. Gene 1988;63:337-41.

14. Omidinia E, Samadi A, Taherkhani H, Khatami S, Moazami N Pouraie RR, et al. Cloning and expression of *Bacillus sphaericus* phenylalanine dehydrogenase gene in *Bacillus subtilis* cells: purification and enzyme properties. World J Microbiol Biotechnol 2002;18:593-97.

15. Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: a multi-gene study. Protein Expression and Purification 2008;59: 94-102.

16. Jia H, Fan G, Yan Q, Liu Y, Yan Y, Jiang Z. High-level expression of a hyperthermostable Thermotogamaritima xylanase in Pichiapastoris by codon optimization. J Mol Catalysis B: Enzymatic 2012;78: 72-77.

17. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. J Cat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. Nucleic Acids Res 2005;33:W526-31.

18. Chao Y, Law W, Chen P, Hung W. High production of heterologous proteins in Escherichia coli using the thermo-regulated T7 expression system. Appl Microbiol Biotechnol 2002;58: 446-53.

19. Mohamadi HS, Omidinia E. Purification of recombinant phenylalanine dehydrogenase by partitioning in aqueous two-phase systems. J Chromatography B 2007; 854: 273-78.

20. Mohamadi HS, Omidinia E, Dinarvand R. Evaluation of recombinant phenylalanine dehydrogenase behavior in aqueous two-phase partitioning. Process Biochemistr 2007;42: 1296-301.

21. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli.* Curr Opin Biotechnol 1999; 10: 411-21.

22. Menart V, Jevševar S, Vilar M, Trobiš A, Pavko A. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in Escherichia coli based on strong PR, PL promoters from phage lambda. Biotechnol Bioengineer 2003;83: 181-90.

23. Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. Microb Cell Fact 2010;9: 18.

24. Hanson RL, Howell JM, LaPorte TL, Donovan MJ, Cazzulino DL, Zannella V, Montana MA, et al. Synthesis of allysine ethylene acetal using phenylalanine dehydrogenase from Thermoactinomycesintermedius. Enzyme Microb Technol 2000;26: 348-58.

25. Vanhooke JL, Thoden JB, Brunhuber NMW, Blanchard JS, Holden HM. Phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp. M4: high-resolution X-ray analyses of inhibitory ternary complexes reveal key features in the oxidative deamination mechanism. Biochemistry 1999;38: 2326-39.