مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

کلونینگ، بیان ژن، خالص سازی و تعیین خصوصیات آنزیم الاستاز حاصل از باکتری *سودوموناس آئروجینوزا*

سمیه احتشام*[۱]، سید محسن اصغری[۲]، افسانه صدر ممتاز[۳]

[۱] مربی ، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
[۳] کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

چکیده

سابقه و هدف: الاستاز حاصل از سودوموناس آئروجینوزا یک آنزیم مهم در زمینه مطالعات بنیادی بر روی Zn- متالوپروتئازها و نیز بعنوان فاکتور ویرولانس این باکتری مطرح است. در این مطالعه ژن مربوط به آنزیم الاستاز از *سودوموناس آئروجینوزا* (PAE) استخراج و کلون شده و پس از بیان و تخلیص، خصوصیات بیوشیمیایی آن شامل دما و pH بهینه و نیز فعالیت در حضور حلال های آلی گلیسرول، دی متیل فرمامید (DMF)، متانول، اتانول، اتیلن گلایکول و ایزوپروپانول مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها: تایید گونه باکتری با تست های بیوشیمیایی شامل سیترات، MR-VP، SIM و TSI انجام شد. DNA ژنومی توسط کیت استخراج و با پرایمر اختصاصی بوسیله PCR ژن الاستاز بدست آمد. کلونینگ در وکتور pET21a(+) با مکان های برش HindIII و NdeI صورت گرفت. ترانسفورماسیون به روش شیمیایی انجام شد. سپس سلول ها در محیط LB تحت القای IPTG 1mM قرار گرفته و زمان و شرایط تولید بهینه گردید.

یافته ها: ژن الاستاز که بصورت پری پرو الاستاز کد می شود، درون وکتور pET21a(+) کلون و در باکتری E. coli سویه BL21 ترانسفورم گردید. آنالیز سکانس نوکلئوتیدی ژن یک چارچوب خوانش (ORF) دارای ۱۴۹۷ جفت باز کدکننده ۴۹۷ آمینواسید را نشان داد. بدنبال القاء به کمک IPTG، آنزیم فعال در درون سلول یافت شد. سپس آنزیم توسط کروماتوگرافی تمایلی تخلیص گردید. بررسی خصوصیات آنزیم از قبیل دمای بهینه، pH بهینه و غیر فعال سازی حرارتی برگشت ناپذیر انجام شد و همچنین فعالیت آنزیم در حضور حلال های آلی بررسی گردید و بخوبی نشان داده شد که آنزیم مذکور از مقاومت و فعالیت بسیار بالایی در حلال های آلی برخوردار است.

نتیجه گیری: آنزیم الاستاز سویه PTCC ۱۴۳۰ در مقایسه با آنزیم سویه PAO1، که ساختار کریستالی آن تعیین شده، تنها یک تغییر در ناحیه سیگنال را نشان می دهد. خصوصیات بیوشیمیایی نشان می دهد که الاستاز یک آنزیم با پایداری زیاد در حلال های آلی است.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروجینوزا*، کلونینگ، بیان، خالص سازی

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا (Pseudomonas aeruginosa) یک باکتری بیماری زای فرصت طلب است. بندرت باعث بیماریزایی در افراد سالم می شود و در عفونت ها، بویژه زمان نقصان سد دفاعی غیر اختصاصی (پوست- غشای مخاطی) و یا سطح ایمنی (نوتروپنی- نقص سیستم عصبی) دیده می شود. عفونت های سودوموناس آئروجینوزا می تواند هر بخشی از بدن را درگیر کند مثل مجاری تنفسی، پوست، استخوان ها، مجاری معدی روده ای و غیره (۱، ۲، ۳). علاوه بر بیماری زا بودن، این باکتری احتیاجات تغذیه ای کمی دارد و شرایط فیزیکی متنوعی را تحمل می کند. هم چنین بخوبی برای زندگی و بقا در محیط های با غلظت بالای حلال های آلی سازگار است و نیز قادر به رشد در دماهای بالا و قادر به زنده ماندن در شرایط سخت می باشد.

آدرس نویسنده مسئول:گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحدپرند، تهران، ایران
Email:smy.ehtesham@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله:۱۳۹۱/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۱۳

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]

سودوموناس آئروجینوزا شماری از پروتئین های خارج سلولی از جمله پروتئاز الاستاز را ترشح می کند (۴). الاستاز قادر است انواع پروتئین ها از قبیل الاستین، فیبرین، مهارکننده پروتئیناز آلفا ۱ سرم، IgG انسانی را هضم و یا غیر فعال کند. تحقیقات پیشین نشان داده اند که الاستاز نقش مهمی در بیماری زایی باکتری سودوموناس آئروجینوزا دارد (۵، ۶، ۷). تعیین خصوصیات الاستاز دریچه هایی برای درک بهتر کاتالیز الاستاز و مکانیزم مولکولی عفونت های سودوموناسی فراهم آورده است. الاستاز یک Zinc-metalloprotease خنثی (neutral)، دارای یک اتم روی (Zn^{+2}) به ازای هر مولکول می باشد. اتم روی برای فعالیت آنزیمی ضروری است. Zn- متاوپروتئازها از تنوع زیادی برخوردارند. در هنگام کاتالیز، کاتیون دو ظرفیتی Zn^{+2} این آنزیم ها سبب فعال نمودن مولکول های آب می گردند. یون فلزی توسط ۳ لیگاند آمینواسیدی نگهداری می شود. این لیگاندها برای اتصال به یون فلزی Asp، Glu، His یا Lys. می باشد.

تا کنون ژن ساختاری الاستاز (*las* B) از *سودوموناس آئروجینوزا* PAO1 و *سودوموناس آئروجینوزا* IFO۳۴۵۵ کلون و تعیین توالی شده است. محصول ابتدایی بیان ژن، یک پری پروالاستاز با ۴۹۷ آمینو اسید (۵۳/۶ kDa) می باشد و پس از اتولیز پروپپتیدهای انتهایی، الاستاز بالغ (۳۳kDa) پدید می آید. بنابر این الاستاز بصورت پری پرو آنزیم ساخته شده، سپس ترادف سیگنال طی جابجایی از غشای داخلی برداشته شده و در نهایت آنزیم بالغ با ۳۰۱ آمینو اسید از طریق غشای خارجی ترشح می شود (۸). الاستاز از لحاظ ترادف آمینو اسیدی با دیگر متالوپروتئازهای شناخته شده همولوژی دارد (۹). هم چنین تعیین ساختار سه بعدی الاستاز در سال ۱۹۹۱ آشکار ساخت که ساختار سه بعدی الاستاز با پروتئاز شناخته شده ترمولیزین همولوژی دارد (۱۰). در مقایسه با ترمولیزین که آنزیم شناخته شده این خانواده آنزیمی است، تاکنون مطالعات زیادی در رابطه با خواص بیوشیمیایی الاستاز، فعالیت آنزیمی و پایداری آن انجام نگرفته است. از سوی دیگر در مطالعات و تحقیقات بر روی آنزیم های این خانواده تاکنون تنها یک گزارش از بیان در وکتور pET در دسترس می باشد که مربوط به الاستاز نمی باشد (۱۱). با توجه به این که سیستم pET قویترین سیستم توسعه یافته جهت کلونینگ و بیان پروتئین های نوترکیب در E. coli می باشد، در این تحقیق بر آن شدیم تا ژن الاستاز باکتری سودوموناس آئروجینوزا سویه PTCC ۱۴۳۰ که تا کنون الاستاز آن استخراج و کلون نشده است را به کمک وکتور +pET21a در باکتری *E. coli* بیان کرده و سپس خصوصیات بیوشیمیایی آن را مطالعه کنیم.

مواد و روش ها

مواد

آنزیم های Hind III و NdeI جهت هضم قطعات نوکلئوتیدی از شرکت Fermentas ، آنزیم T4-DNA Ligase جهت Ligation از شرکت Fermentas و پلاسمید pET-21a+، جهت کلونینگ و بیان ژن مورد نظر از شرکت Invitrogen تهیه شد.

سودوموناس آئروجینوزا سویه PTCC ۱۴۳۰ از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران خریداری گردید و جهت کلونینگ از *E. coli* سویه BL۲۱ استفاده شد.

تست های بیوشیمیایی

محیط کشت سیترات محتوی معرف Bromothymol blue، محیط کشت SIM به منظور بررسی تولید ایندول از تریپتوفان، محیط کشتMR-VP جهت بررسی تولید استوئین و محیط کشت TSI محتوی Phenol Red جهت بررسی تولید اسید از سه قند گلوکز، لاکتوز، سوکروز و تولید گاز استفاده شد.

استخراج ژن از باکتری سودوموناس آئروجینوزا

از تک کلون های بدست آمده، چند مورد بطور مجزا در محیط LB کشت و با استفاده از کیت استخراج ژنوم باکتری(Bioneer ,Korea) DNA ژنومی استخراج گردید. سپس با استفاده از پرایمر های اختصاصی forward با ترادف

5´- G G A A T T C C A T A T G A A G A A G G T T T C

T A C G C T T G A C - 3´

(Tm: ۶۶°C) و reverse با ترادف

5´-CGGAAGCTTTTAC AACGCGCTCGGGCAG-3´

Tm: 66°C و به کمک کیت AccuPower PreMi، واکنش PCR انجام شد. دمای annealing براساس Tm پرایمرها جهت تکثیر ژن الاستاز C° ۶۸ و زمان extention نهایی ۲۰ دقیقه انتخاب شد. سپس محصول PCR با ژل الکتروفورز آگارز ۱٪ بررسی شد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]

ترادف ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به سفارش شرکت فزابیوتک تعیین گردید. پس از تایید نهایی، ژن الاستاز جهت کلونینگ بکار گرفته شد.

کلونینگ

محصول PCR توسط کیت تخلیص گردید پس از کشت باکتری حامل وکتور pET-21a$^+$ در محیط LB، وکتور به کمک کیت استخراج شد. وکتور pET-21a$^+$ و هم چنین ژن الاستاز ابتدا توسط آنزیم *HindIII* بصورت زیر هضم شدند. هضم آنزیمی ژن و هضم آنزیمی pET-21a$^+$ با شرایط DNA ۲۵ µl، Buffer ۶ µl و Enzyme ۲-۳ µl; Buffer ۶µl، Vector ۴۵-۵۰ µl و Buffer انجام شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، عمل هضم با انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد بمدت ۱۰ دقیقه متوقف گردید و محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شدند. سپس محصولات هضم مورد نظر توسط کیت تخلیص PCR بازیابی شدند و این بار توسط آنزیم محدودالاثر *NdeI* با شرایط Enzyme۱.۵µl; Buffer ۴ µl;Vector/DNA ۴۰µl انجام گردید. مخلوط واکنش به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و محصولات واکنش هضم روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید. جهت جاگذاری (ligation) ژن مقدار ۶/۵ میکرولیتر از ژن الاستاز هضم شده در یک میکروتیوب ریخته شد. سپس ۱/۵ میکرولیتر بافر جا گذاری و ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Liga-se به محلول DNA افزوده شد و در نهایت ۱ میکرولیتر وکتور pET21a$^+$ هضم شده به میکروتیوپ افزوده شد. میکروتیوب بمدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و متعاقبا بمدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. به منظور غیر فعال کردن آنزیم، نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. سپس وکتور نوترکیب به میزبان *E.coli* سویه BL21 DE3 منتقل (ترانسفورم) شد. پس از استخراج وکتور، تعیین توالی توسط شرکت SEQLAB آلمان انجام شد.

بیان

۵۰ میکرولیتر باکتری رشد کرده به ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین ۱۰۰ mg/ml انتقال داده شد (تلقیح ۱٪) و تا افزایش OD_{600} به حدود ۱/۱ در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد (لازم به ذکر است که ابتدا بهینه کردن بیان در OD های مختلف انجام شد). پس از این مرحله با افزودن IPTG با غلظت نهایی ۱mM، محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس در فاصله زمانی ۴ ساعت، محیط کشت حاوی باکتری برداشته شده و جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۵۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریوفوژ و رسوب باکتری حاصل با افزودن بافر لیزکننده (Tris 20mM pmsf, 2mM با pH 7) به اندازه هم حجم رسوب به حالت سوسپانسیون در آمد و سپس تحت سونیکاسیون (شامل ۱۵ مرحله ۲۰ ثانیه ای، با فواصل زمانی ۴۰ ثانیه) قرار گرفت. جهت جلوگیری از دناتوراسیون آنزیم، تمامی مراحل سونیکاسیون درون یخ انجام گرفت. سلول های لیز شده در ۱۴۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی و رسوب حاصل از سانتریفیوژ که به ترتیب به منزله پروتئین های محلول و نا محلول هستند، جهت آنالیز بیان بر روی ژل اکریل آمید الکتروفورز بارگذاری شدند.

خالص سازی

به منظور خالص سازی پروتئین نوترکیب، کروماتوگرافی تمایلی با استفاده از ستون نیکل آگارز استفاده شد. نمونه پروتئینی روی ستونی که توسط بافر شستشو حاوی، NaH_2Po_4 50mM Nacl 300 mM، ایمیدازول ۲۰ mM با pH= ۸ به تعادل رسیده بود، برده شد و پس از شستشو با همان بافر، جهت جداسازی پروتئین از ستون، از بافر شستشوی NaH_2Po_4 50mM، Nacl 300 mM، ایمیدازول ۲۵۰ mM با pH= ۸ استفاده شد. رقابت ایمیدازول موجود در بافر با دنباله هیستیدینی برای اتصال به نیکل سبب خروج پروتئین از ستون می گردد.

SDS-PAGE

با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ و بر اساس روش Laemmli تحت شرایط احیایی انجام شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۶۰ دقیقه در رنگ کوماسی بلو- G۲۵۰ قرار داده شد و سپس رنگ ژل خارج و رنگ بری شد.

سنجش فعالیت

بدین منظور، سنجش فعالیت آنزیمی با استفاده از سوبسترای

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]

کازئین انجام شد (۱۲). ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی با غلظت مناسب به ۴۸۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱٪ تهیه شده در بافر تریس حاوی کلرید کلسیم ۵ mM، کلرید روی 1mM ,EDTA و PMSF 1mM اضافه گردید و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰٪ (W/V) به محلول واکنش اضافه شد تا واکنش متوقف و کازئین های هیدرولیز نشده رسوب کند. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی گراد، مخلوط واکنش با rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده و جذب محلول رویی در ۲۸۰ نانومتر به عنوان معیاری از فعالیت آنزیمی سنجش شد. مخلوط مشابهی با این تفاوت که TCA ۱۰٪ ابتدا به محلول سوبسترا افزوده شده و سپس محلول آنزیمی را اضافه شد به عنوان بلانک در نظر گرفته شد.

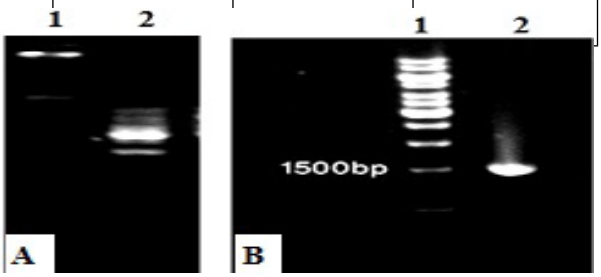
یافته ها

تایید گونه باکتری و استخراج ژن الاستاز

نوع باکتری، با استفاده از تست های بیوشیمیایی و میکروبی تایید شد. نتایج بدست آمده از سویه PTCC ۱۴۳۰ در مقایسه با سویه گزارش شده PAO۱ در جدول ذیل آورده شده است. سپس DNA ژنومی از باکتری استخراج گردید (شکل A۱). سپس با استفاده از DNA ژنومی بدست آمده به عنوان الگو و بهره گیری از یک جفت پرایمر برای ژن الاستاز، که بر اساس ترادف ژنی الاستاز حاصل از باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* سویه PAO۱ طراحی گردید، تکثیر ژن الاستاز با PCR انجام شد. . به منظور تأیید تکثیر قطعه DNA مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد (شکل B۱). نتیجه حاصل از ژل فوق حاکی از تکثیر یک قطعه با اندازه ای منطبق با اندازه ژن مورد نظر می باشد. جهت تایید نهایی قطعه بدست آمده با کیت تخلیص و جهت تعیین ترادف ارسال گردید که نتیجه حاصل از تعیین ترادف DNA نشان داد که قطعه حاصل از PCR همان ژن الاستاز مورد نظر بوده است.

جدول ۱- تست های بیوشیمیایی شناسایی گونه.

تست ها	*Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1430	*Pseudomonas aeruginosa* PAO1
TSI		
Glu-Suc-Lac	+	+
H_2S	–	–
Protein	+	+
SIM		
Indole	–	–
Malonate	–	+
Citrate	+	+
MR-VP		
MR	–	–



شکل ۱- A) محصول استخراج DNA ژنومی. ۱. DNA ژنومی، ۲. مارکر وزن مولکولی B) .DNA ژل محصول PCR ژن الاستاز. ۱. مارکر وزن مولکولی، ۲.محصول PCR از DNA ژ نومی.

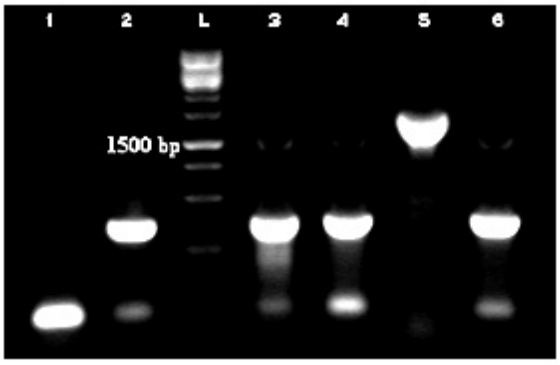
کلونینگ الاستاز

پس از تایید ترادف نوکلوتیدی، ژن الاستاز در یک وکتور بیانی pET-21a$^+$ جاگذاری گردید. بدین منظور ژن و حامل pET-21a$^+$ تحت هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر Hind III قرار داده شده و پس از تخلیص و استخراج محصولات هضم شده توسط کیت، ژن الاستاز و حامل pET-21a$^+$ مجدداً تحت برش آنزیمی توسط آنزیم محدودالاثر NdeI قرار گرفتند. جهت اطمینان از انجام هضم، پلاسمید هضم نشده ی pET-21a$^+$ نیز به عنوان کنترل برش داده شد. سپس کلیه نمونه های هضم شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. ژن الاستاز و ناقل هضم شده

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

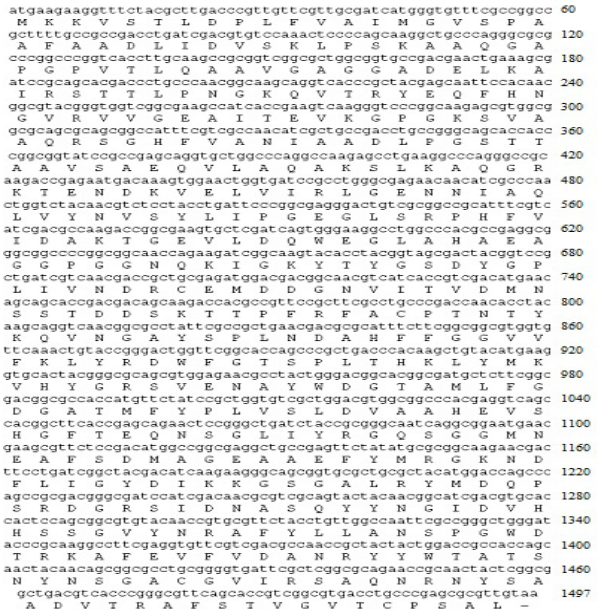
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]

مجدداً توسط کیت خالص شده و پس از آن ۳ میکرولیتر از هر یک، روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و در مقایسه با وزن نمای DNA (DNA Ladder)، غلظت قطعه ژن درخواستی و ناقل بیانی به ترتیب ng/µl ۲۰و ng/µl ۷۰تعیین شد. از آنجا که وکتور نوترکیب بیانی حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین بود، به کمک محیط کشت حاوی آمپی سیلین امکان جداسازی کلون های حاوی وکتور فراهم شد. به منظور انتخاب کلونی های حاوی وکتور نوترکیب بیانی به طور تصادفی کلونی های ترنسفورم شده BL۲۱ انتخاب و پس از استخراج پلاسمید از این کلونی ها به منظور تأیید انتقال پلاسمید حاوی ژن الاستاز به باکتری نامبرده روش Colony PCR بکار برده شد و نتیجه ی آن بر روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲. آنالیز محصولات Colony-PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بمنظور غربال کلون های BL۲۱ حاوی پلاسمید نوترکیب بیانی (۱. کنترل منفی بدون وکتور، ۲ و ۳ و ۴ و ۶. وکتور فاقد ژن ، L. مارکر وزن مولکولی ۵، DNA. وکتور حامل ژن الاستاز).

در نهایت با تعیین ترادف وکتور بر اساس پرایمرهای پروموتر T۷، کلونینگ تایید گردید. توالی نوکلئوتیدی که در شکل ۳ آمده نشان می دهد که نوکلئوتیدهای شماره ۱ تا ۶۶ مربوط به توالی سیگنال پپتید، نوکلئوتیدهای شماره ۶۷ تا ۵۹۱ مربوط به توالی پروپپتید و نوکلئوتیدهای شماره ۵۹۲ تا ۱۴۹۷ توالی آنزیم بالغ را شامل می گردد.



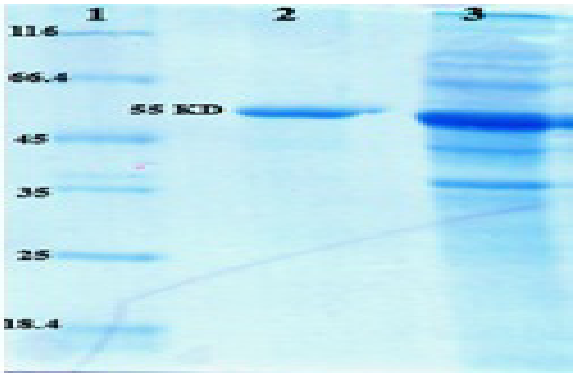
شکل ۳- ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی استخراج شده ژن کد کننده پری پروالاستاز.

بیان و خالص سازی الاستاز

بیان ژن الاستاز در سلول های E. coli سویه ی BL۲۱ توسط القا گر IPTG 1mM در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با هوا دهی مطلوب انجام گرفت. پس از گذشت ۴ ساعت از زمان شروع القاء، آنالیز پروتئین های محلول و نامحلول با استفاده از ژل SDS-PAGE در قسمت نامحلول (Inclusion body) پروتئین یک باند پروتئینی جدید در ناحیه حدود kDa ۵۵ ظاهر شد، اما در آنالیز قسمت محلول (سوپرناتانت) پروتئین به چشم رویت نشد. همان طور که در دیاگرام مربوطه نیز نشان داده شده است. این امر حاکی از بیان پرو آنزیم می باشد. سپس بررسی غلظت های مختلف IPTG و زمان های مختلف انجام گردید. این مرحله به منظور بهینه کردن مدت زمان بیان در فواصل مختلف از باکتری های القاء شده نمونه برداری شد و با این شرایط پروتئین در فاز محلول آشکار شد. با انجام بیان در زمان های مختلف، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۴ ساعت بعد از القاء مناسب ترین شرایط تشخیص داده شد. آنچه بدست آمد یک باند قوی در محدوده حدود ۵۵ کیلو دالتون بود. با وجود دنباله هیستیدینی، عمل خالص سازی براحتی با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی انجام گردید (شکل ۴).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]



شکل ۴. خالص سازی پروالاستاز با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی. ۱) مارکر وزن مولکولی پروتئین. ۲) پروتئین خالص بدست آمده از ستون نیکل آگارز. ۳) محصول لیز سلولی قبل از ستون. برای توضیحات بیشتر به ماد و روش ها مراجعه کنید.

در قدم بعدی بالغ سازی (maturation) یعنی دستیابی به آنزیم بالغ با وزن مولکولی حدود ۳۳ کیلو دالتون از پروآنزیم بهینه شد. بررسی شرایط متعدد و عوامل گوناگون نشان داد که حذف کامل نمک NaCl با غلظت ۳۰۰ میلی مولار از بافر لیز کننده باکتری باعث بلوغ آنزیم در فاز محلول می شود.

خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم

Zn-متالوپروتئازها در سنتز پپتید و تولید شیرین کننده آسپارتام کاربرد دارند (۱۳). از آنجا که این فرایندها در حضور حلال های آلی انجام می شوند، پایداری این آنزیم ها در حلال های آلی از اهمیت کاربردی برخوردار است. خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم خالص شده شامل دمای بهینه، pH بهینه، نیمه غیر فعال سازی حرارتی در دماهای ۵۵، ۶۰، ۶۵ و ۷۰ درجه سانتی گراد مطابق با مطالعات پیشین (۱۴، ۱۵) تعیین گردید. هم چنین پایداری آنزیم در حضور حلال های آلی مختلف شامل گلیسرول، دی متیل فرمامید (DMF)، اتیلن گلیکول، متانول، اتانول و ایزوپروپانول با اندازه گیری میزان درصد فعالیت آنزیم در حضور غلظت ٪۵۰ (v/v) این حلال ها مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۲). بر اساس نتایج بدست آمده دمای بهینه آنزیم در محدوده مابین آنزیم های مزوفیل و ترموفیل می باشد. pH بهینه آنزیم تا حدی قلیایی است و همان گونه که انتظار می رود، در دماهای بالاتر از دمای بهینه، آنزیم غیر فعال می شود که این پدیده در تمام پروتئازها به سبب اتولیز در دماهای بالاست.

جدول ۲. خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم الاستاز نوترکیب. فعالیت آنزیمی با سوبسترای کازئین تعیین شد.

دمای بهینه (°C)	۶۰
pH بهینه	۸/۵
(دقیقه) در دماهای	$t_{1/2}$
۵۵ °C	۱۵۰
۶۰°C	۱۱۲
۶۵°C	۴۷
۷۰°C	۳۲
۷۱°C	۱۸
۸۱°C	۸
۸۵°C	۴
فعالیت (٪) درغلظت ۵۰٪ حلال های	
گلیسرول	>۱۰۰
دی متیل فرمامید	>۱۰۰
اتیلن گلیکول	>۱۰۰
متانول	>۱۰۰
اتانول	۷۵
ایزوپروپانول	۵۵

بحث

در این تحقیق ژن مربوط به آنزیم الاستاز حاصل از باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* سویه PTCC۱۴۳۰ جداسازی و کلون گردید و پس از خالص سازی، خصوصیات بیوشمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. در موارد زیادی بیان در سیستم های بیانی pET بدلیل تشکیل اجسام توده ای (inclusion bodies) با مشکل مواجه می گردد، اما در تحقیق حاضر چنین مشکلی با بکارگیری بافر لیز سلول فاقد نمک کلرید سدیم برطرف گردید. مقایسه ترادف نوکلئوتیدی نشان می دهد که ژن الاستاز *سودوموناس آئروجینوزا* PTCC ۱۴۳۰ با ژن الاستاز *سودوموناس آئروجینوزا* PAO1 تنها در نوکلئوتید شماره ۲۶ تفاوت دارد. این تفاوت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]

منجر به تغییر کدون مربو ط به آمینواسید مربوطه از لوسین به پرولین می گردد. بنابراین ساختمان آنزیم بالغ بطور کامل مشابه آنزیم سویه (PAO1 (PDB code:1EZM است. بر اساس نتایج بدست آمده، یکی از خصوصیات مهم آنزیم مذکور پایداری بسیار زیاد در حلال های آلی است بطوری که در حضور غلظت ٪۵۰ از اکثر حلال های آلی حتی فعالیتی بیش از حالت کنترل (عدم حضور حلال آلی) از خود نشان می دهد. این ویژگی، همانگونه که بدان اشاره شد، از نقطه نظر کاربردی حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و آزمایشگاه بیوشیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان ابراز می دارند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]

منابع

(1) Adekoya OA, Sylte I. The Thermolysin Family (M4) of Enzymes: Therapeutic and Biotechnological Potential. Chem Biol Drug Des, 2009; 73: 7-16.

(2) Asghari SM, Khajeh K, Badoei Dalfard A, Pazhang M, Karbalaei-Heidari HR. Temperature, Organic Solvent and pH Stabilization of the Neutral Protease from Salinovibrio Proteolyticus: Significance of the Structural Calcium, 2011; 44; 665-668.

(3) Asghari SM, Pazhang M, Ehtesham S, Karbalaei-Heidari HR, Taghdir M, Sadeghizadeh M, Naderi-Manesh H, Khajeh K. Remarkable Improvements of a Neutral Protease Activity and Stability Share the Same Structural Origins. Protein Eng. Des ,Sel ,2010; 23: 599-606.

(4) Braun P, Tommassen J, Filloux A. Role of the Propeptide in Folding and Secretion of Elastase of Pseudomonas Aeruginosa, Mol, Microbiol, 1996; 19: 297-306.

(5) Gray GL, Vasil ML. Isolation and Genetic Characterization of Toxin-Deficient Mutants of Pseudomonas Aeruginosa PAO, J, Bacteriol, 1981; 147: 275-28.

(6) Haas D , Defago G. Biological Control of Soil-Borne Pathogens by Pseudomonas Fluorescent. Nat Rev Microbiol, 2005; 3: 307–19.

(7) Hazlett L, Rudner X, McClellan s, Barrett B, Lighvani S. Role of IL-12 and IFN-y in Pseudomonas Aeruginosa Conreal Infection. IOVS. 2002; 43; 419-424.

(8) Heck LW, Morihara K, McRae WB, Miller EJ. Specific Cleavage of Human Type III and IV Collagens by Pseudomonas Aeruginosa Elastase. Infect, Immun, 1986; 51: 115-118.

(9) Holder IA. The Pathogenesis of Infection Owing to Pseudomonas Aeruginosa Using the Burned Mouse Model: Expimental Studies from the Shriners Burns Institute, Cincinnation. Can J Microbiol,1985; 31: 393-402.

(10) KonY, Tsukada H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, Suzuki E, Arakawa M, Gejyo F. The Role of Pseudomonas Aeruginosa Elastase as a Potent Inflammatory Factor in a Rat Air Pouch Inflammation Model. FEMS Immunol Med Mic. 1999; 25:313-321.

(11) Pazhang M, Khajeh K, Ranjbar B ,Hosseinkhani S. Effects of water-miscible Solvents and Polyhydroxy Compounds on the Structure and Enzymatic Activity of Thermolysin. J Biotechnol. 2006; 12: 745-753.

(12) Robert A. Bever and Barbara H. Iglewski. Molecular Characterization and Nucleotide Sequence of the Pseudomonas Aeruginosa Elastase Structural Gene. J Bacteriol. 1988; 170: 4309-4314.

(13) Thayer MM, Flaherty KM, McKay DB. Theree-Dimensional Structure of the Elastase of Pseudomonase aeruginosa at 1.5-A resolution. J Biol Chem , 1991; 266: 2864-2871.

(14) Titani K, Hermodson MA, Ericsson LH, Walash KA, Neurath H. Amino-acid Sequence of Thermolysin. Nature,1972; 238: 35-37.

(15) Xie BB, Bian F, Chen XL, He HL, Guo J, Gao X, Zeng YX, Chen B, Zhou BC, Zhang YZ. Cold Adaptation of Zinc Metalloproteases in the Thermolysin Family from Deep Sea and Arctic Sea Ice Bacteria Revealed by Catalytic and Structural Properties and Molecular Dynamics: New Insights into Relationship Between Conformational Flexibility and Hydrogen Bonding J Biol Chem, 2009; 284: 9257-9269.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-12-18]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.2.9]