فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۴

کلونینگ و تعیین توالی ژن متالوپروتئاز مقاوم به گرما از باکتری *Anoxybacillus flavithermus* به دست آمده از چشمه آب گرم قینرجه، مشگین‌شهر

پروانه نجفی[۱]، محمود رضا آقامعالی[۲]*، سید محسن اصغری[۲]

تاریخ دریافت: مهر ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴

چکیده

در موجودات گرمادوست، غالبا بیوماکرومولکول‌ها مقاوم به حرارت هستند. این بیوماکرومولکول‌ها علاوه بر دمای بالا، در شرایط به شدت قلیایی یا اسیدی نیز در برابر دناتوره شدن مقاومت می‌کنند. پروتئازهای پایدار حرارتی پتانسیل قابل توجهی برای بسیاری از صنایع غذایی، تولید کاغذ و شوینده‌ها، حذف ضایعات سمی و حفاری نفت دارند. این آنزیم‌ها را می‌توان از طریق بهینه‌سازی تخمیر گرمادوست در میکروارگانیسم‌ها و یا کلون کردن به روش تکنولوژی DNA نوترکیب در یک میزبان مزوفیل به حداکثر تولید رساند. متالوپروتئازها نیز نوعی پروتئاز وابسته به یون هستند. متالوپروتئازی که در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت یک اندوپپتیداز وابسته به یون روی است. ژن متالوپروتئاز از باکتری *Anoxybacillus flavithermus* کلون شد. از روش PCR برای تکثیر ژن استفاده شد. یک جفت پرایمر با جایگاه برش برای آنزیم‌های *NheI* و *XhoI* طراحی شد، در وکتور pET21a(+) کلون شد و به میزبان *BL21* ترانسفورم شد. نتایج حاصل از آنالیز توالی ژن کلون شده حاکی از تشابه ژن مورد نظر با پروتئاز واریانت‌های مختلف گونه *Anoxybacillus flavithermus* دارد.

واژگان کلیدی: *متالوپروتئاز، کلونینگ*، Anoxybacillus flavithermus، *PCR*.

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
* نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

پروتئازها از مهم‌ترین کاتالیزورهای زیستی از دیدگاه صنعتی هستند که اتصالات پپتیدی را در پروتئین‌ها در محیط آبی هیدرولیز می‌کنند، بنابراین در خانواده هیدرولازها قرار می‌گیرند (Fulzele et al., 2011). گونه‌های *Bacillus* بیش‌ترین بازده تولید آنزیم پروتئاز را دارند (Almas et al., 2009). پروتئازها تقریباً ۴۰ درصد از کل فروش آنزیم را در تولید شوینده‌ها، داروسازی، صنایع غذایی و چرم، مدیریت بازیافت و ترمیم نقره دارند (Uyar et al., 2011). ساده‌ترین تقسیم‌بندی پروتئازها بر حسب درون‌سلولی یا برون‌سلولی بودن آن‌ها است (Gupta et al., 2002). پروتئازهای درون‌سلولی در فرآیندهای متابولیکی و سلولی مختلف مانند اسپورزایی[1] و تمایز، تغییرات و تبدیلات پروتئینی[2]، بلوغ هورمونی و آنزیمی و ابقا مخزن پروتئین[3] نقش دارند. پروتئازهای خارج سلولی هیدرولیز پروتئین‌ها را در محیط آزاد سلولی[4] انجام می‌دهند و سلول قادر به جذب و استفاده از محصولات هیدرولیز می‌شود (An et al., 2004). پروتئازها بر حسب جایگاه برش نیز به دو گروه اصلی اگزوپپتیدازها و اندوپپتیدازها طبقه‌بندی می‌شوند. اگزوپپتیدازها پیوند پپتیدی انتهایی پایانه کربوکسی یا آمینو سوبسترا و نوع اندوپپتیدازها پیوند پپتیدی دور از انتهای سوبسترا را می‌شکنند (Ghafoor and Hasnain, 2010). پروتئازها اغلب بر اساس چهار معیار طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) pH، ۲) اختصاصی عمل کردن برای سوبسترا، ۳) شباهت در فعالیت با آنزیم‌هایی که تعیین ویژگی شده‌اند مثل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز و ۴) باقی‌مانده آمینواسید[5] جایگاه فعال و مکانیسم کاتالیتیک. پروتئازها بر اساس pH بهینه‌ای که در آن حداکثر فعالیت را نشان می‌دهند به سه گروه اسیدی، خنثی و بازی طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئازهای اسیدی با محدوده pH ۲ تا ۶ ، نوع خنثی که در pH خنثی، بازی ضعیف و اسیدی ضعیف فعال هستند و نوع بازی که در محدوده pH ۸ تا ۱۳ بیش‌ترین فعالیت را نشان می‌دهند (Ellaiah et al., 2002). بر اساس حضور گروه عملکردی در جایگاه فعال، پروتئازها به چهار گروه سرین پروتئاز، سیستئین پروتئاز، آسپارتیک پروتئاز و

1- Sporulation
2- Turnover
3- Protein Pool
4- Cell Free Environments
5- Residual Amino Acids

متالوپروتئاز تقسیم می‌شوند (Asoodeh et al., 2012). پایداری پروتئازهای باکتری‌های گرمادوست در دماهای بالا باعث افزایش سرعت واکنش می‌شود. علاوه بر این، افزایش حلالیت واکنش دهنده‌ها، کاهش محصولات غیرگازی و کاهش بروز آلودگی‌ها از مزیت‌های آنزیم‌های گرمادوست نسبت به آنزیم‌های مزوفیل محسوب می‌شودند (Do Nascimento and Martins, 2004). گونه‌های گرمادوست مثل *Bacillus* sp.، *Geobacillus* sp. و *Burkholderia* sp. منابع قابل اطمینانی از آنزیم‌های صنعتی دارند. این آنزیم‌ها علاوه بر پایداری ذاتی بالاتر نسبت به دما، در مقابل همه فاکتورها پایداری بیش‌تری در مقایسه با آنزیم‌های مزوفیل دارند (Asoodeh et al., 2012). جنس *Anoxybacillus* در سال ۲۰۰۲ شناسایی شد اما اطلاعات اندکی از آن در دسترس است (Goh et al., 2013). *Anoxybacillus flavithermus* باکترهای گرم مثبت با کلونی‌های زرد رنگ تولید کننده اسپور هستند که در زیستگاه‌های گرمادوستی مانند چشمه‌های آب گرم، کودهای شیمیایی و غذاهای فرآوری شده مانند ژلاتین و پودر شیر یافت می‌شوند. اولین گونه شناسایی شده از جنس *Anoxybacillus* یک باکتری بی‌هوازی اجباری بود و به همین دلیل اسم جنس با انوکسی شروع می‌شود. اما با گذشت زمان گونه‌های هوازی اجباری یا اختیاری نیز شناسایی شدند. اعضای جنس *Anoxybacillus* گرمادوست و مقاوم به قلیا هستند به همین دلیل برای بسیاری از کاربردهای صنعتی مناسب هستند (Saw et al., 2008).

مواد و روش‌ها

باکتری *Anoxybacillus flavithermus* مورد استفاده در این مطالعه از چشمه آب گرم قینرجه مشگین‌شهر جداسازی شد. آنزیم‌های محدودالاثر *XhoI* و *NheI* و بافرهای آن از شرکت Thermo تهیه شد. پلاسمید مورد استفاده pET21a(+) بود که از شرکت Invitrogen تهیه شد و آنزیم T4-DNA Ligase و بافر آن از شرکت Fermentas تهیه شد. پرایمرهای اولیگونوکلئوتید با نرم افزار Gene Runner طراحی شدند.

استخراج ژنوم

ابتدا باکتری مورد نظر در محیط کشت جامد که شامل آگار ۲ درصد، تریپتون ۰/۵ درصد، سدیم کلرید ۰/۵ درصد و عصاره مخمر

۰/۲ درصد با pH ۷ بود، کشت داده شد. پلیت کشت داده شده به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک لوپ از باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع که همان ترکیبات محیط کشت جامد را به غیر از آگار داشت، انتقال داده شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و شیک ۱۹۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰-۱۶ ساعت قرارگرفت. پس از آن، محیط کشت مذکور ۵ دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hettich، آلمان) با ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل به میکروتیوب ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز (ساکارز ۶/۷ درصد، Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار و pH ۷)، ۵۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۱۵۰ میکرولیتر بافر سدیم استات ۳M با pH ۵/۲ به آن اضافه شد و ۸۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۲ میکرولیتر محلول SDS ۲۰ درصد به میکروتیوب مذکور اضافه شد و سوسپانسیون به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. در طول این مدت، میکروتیوب‌ها هر ۱۵ دقیقه یک بار چرخانده می‌شدند. در مرحله بعد، به نمونه ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) اضافه شد، ۵ دقیقه به آرامی مخلوط شد و بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با ۹۰۰۰ دور بر دقیقه، فاز بالایی محلول به یک میکروتیوب جدید منتقل شد. به مقدار ۰/۸ حجم فاز بالایی به دست آمده از مرحله قبل، به نمونه ایزوروپانول سرد اضافه شد. سپس ۱ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. ۲ برابر حجم سوپرناتانت به رسوب مرحله قبل، اتانول ۹۷ درصد سرد اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و بعد از تبخیر اتانول به رسوب ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه سرد اضافه شد. برای اطمینان از صحت کار، محصول استخراج ژنوم توسط دستگاه الکتروفورز (BioRad، آمریکا) بر روی ژل ۱ درصد آگارز مشاهده شد.

طراحی پرایمر

ژنوم کامل باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* در بانک اطلاعاتی

www.ncbi.nlm.nih.gov موجود است. پرایمرهای پیشرو و معکوس با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner بر اساس ژنوم باکتری مذکور طراحی شد. در انتهای ´۳ و ´۵ پرایمرها، به ترتیب جایگاه برش آنزیم‌های *NheI* و *XhoI* قرار داده شد و سنتز آن توسط شرکت پیشگام (تهران) انجام شد. پرایمرهای اختصاصی پیشرو ۳۲ بازی با توالی 5′TCCGCCGCTAGCATGTACTTG TATAAGCCTTG3′ (۷۳/۸Tm) و معکوس ۳۳ بازی با توالی 5′ACTATACTCGAGCAAACACGC CGCCTCTAGCTT3′ (۷۵/۳Tm) به منظور تکثیر ژن با روش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

دمای اتصال[1] بر اساس Tm پرایمرها ۵۲ درجه سانتی‌گراد و زمان گسترش[2] نهایی ۱۰ دقیقه انتخاب شد و تکثیر ژن پروتئاز انجام شد. سپس محصول PCR با ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد بررسی شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مذکور تعیین توالی شد. پس از تایید نهایی، ژن پروتئاز در وکتور pET21a(+) کلون شد و به میزبان *BL21* ترانسفورم شد.

1- Annealing
2- Extension

کلونینگ

پس از کشت باکتری حاوی وکتور pET21a(+) در محیط LB، وکتور با استفاده از کیت سیناژن استخراج شد. ابتدا وکتور و ژن پروتئاز توسط آنزیم‌های محدودالاثر *NheI* و *XhoI* به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شدند. در هضم آنزیمی ژن و وکتور، ۳ میکرولیتر بافرتانگو، ۱ میکرولیتر آنزیم *NheI*، ۱ میکرولیتر آنزیم *XhoI* و ۱۵ میکرولیتر وکتور یا محصول PCR استفاده شد. نمونه‌های هضم شده روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد. به منظور اطمینان از هضم آنزیمی وکتور، از پلاسمید برش نخورده به عنوان شاهد استفاده شد.

به منظور جاگذاری[3] ژن مورد نظر در وکتور pET21a(+)، ۵ میکرولیتر از ژن پروتئاز هضم شده در یک میکروتیوب ریخته شد. سپس ۳ میکرولیتر بافر جاگذاری و ۱ میکرولیتر آنزیم T4DNA-Ligase به محصول PCR اضافه شد و در نهایت ۱۱میکرولیتر وکتور pET21a(+) هضم شده به میکروتیوب افزوده شد.

میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در بن ماری

3- Ligation

(Memmert، آلمان) انکوبه شد. سپس وکتور نوترکیب به میزبان *E. coli* سویه *BL21* منتقل شد.

ترانسفورم شیمیایی وکتور نوترکیب در باکتری *E. coli*

انتقال وکتور نوترکیب به باکتری *E. coli* به روش شیمیایی انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول جاگذاری شده به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد تلقیح شد و میکروتیوب مذکور ۴۵ دقیقه روی یخ گذاشته شد. میکروتیوب به منظور شوک حرارتی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه در بن ماری (Memmert، آلمان) قرار داده شد و بعد بلافاصله روی یخ منتقل شد. پس از ۵ دقیقه به میکروتیوب ۹۰۰ میکرولیتر محیط LB فاقد آنتی‌بیوتیک افزوده شد. سپس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه شیک شد. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، رسوب حل شد و به پلیت‌های حاوی آمپی‌سیلین منتقل شد. پلیت‌ها ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پلیت کنترل مثبت تنها حاوی سلول‌های مستعدی بود که با پلازمید اولیه ترانسفورم شده بودند.

به منظور تأیید الحاق ژن درون وکتور و انتقال وکتور نوترکیب به باکتری، کلونی- PCR انجام شد. پس از استخراج وکتور نوترکیب از کلونی‌های مثبت غربال شده توسط کلونی- PCR وجود ژن در پروتئاز در وکتور استخراج شده توسط PCR تایید و سپس وکتور نوترکیب برای تعیین توالی به شرکت پیشگام (تهران) ارسال شد.

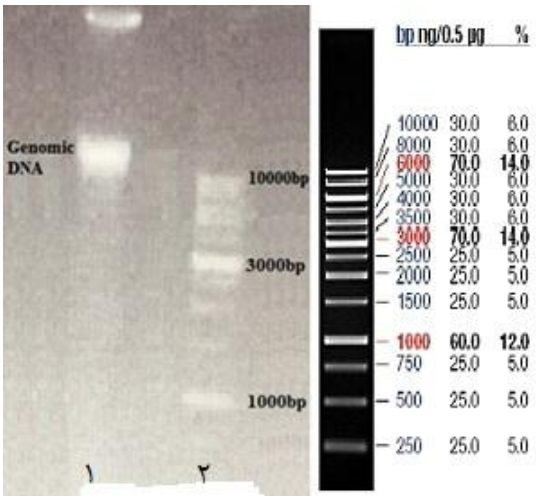
نتایج

استخراج ژنوم و PCR

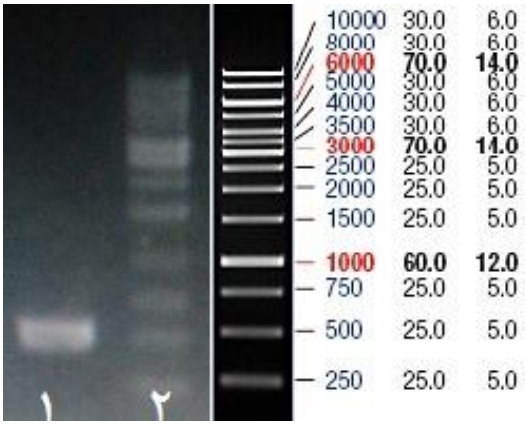
ابتدا DNA ژنوم باکتری استخراج شد (شکل ۱). سپس با استفاده از DNA ژنومی به دست آمده به عنوان الگو و بهره‌گیری از یک جفت پرایمر برای ژن پروتئاز که بر اساس توالی ژنی پروتئاز باکتری *Anoxybacillus flavithermus* سویه *WK1* طراحی شد و تکثیر ژن پروتئاز با استفاده از روش PCR انجام شد. به منظور تأیید تکثیر قطعه DNA مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد (شکل۲).

نتیجه حاصل از ژل نشان داده شده در شکل ۲ حاکی از تکثیر یک قطعه با اندازه‌ای منطبق با اندازه ژن مورد نظر بود. قطعه به دست آمده و تعیین ترادف DNA نشان داد که

قطعه حاصل از PCR همان ژن پروتئاز مورد نظر بود (شکل۳).



شکل ۱: محصول استخراج DNA ژنومی. ۱: محصول استخراج DNA ژنومی از باکتری *Anoxybacillus flavithermus*. ۲: مارکر وزن مولکولی DNA.



شکل ۲: محصول PCR ژن پروتئاز ۱: محصول PCR. ۲: مارکر وزن مولکولی DNA.

```
Atgtacttgtataagccttgcgacttagaaaagcgcatctcggaagcatatcagcaaaac
M  Y  L  Y  K  P  C  D  L  E  K  R  I  S  E  A  Y  Q  Q  N
gggatcatctatccttctcatcttgatgaagagtatatcgcaaggaaattcgatattttg
G  I  I  Y  P  S  H  L  D  E  E  Y  I  A  R  K  F  D  I  L
cttgtcgagtcaaaattcggatcgtttgcggaatactgcggcgacttgaaaattgtagcg
L  V  E  S  K  F  G  S  F  A  E  Y  C  G  D  L  K  I  V  A
cttcatcacgatttaaactcactcaagcgtagagaagtatttttcatgaaatcgggcat
L  H  H  D  L  N  S  L  K  R  R  E  V  F  F  H  E  I  G  H
ttattcttacatgtgggcgaccagtcgaaaatgaccgactcatttcgttcttttcaagaa
L  F  L  H  V  G  D  Q  S  K  M  T  D  S  F  R  S  F  Q  E
tcgcaagcaaaacgctttacgttatttgcagcgatcccttatcatatgcttacatatatc
S  Q  A  K  R  F  T  L  F  A  A  I  P  Y  H  M  L  T  Y  I
gatttttcgaaaaaacgcgactttatcatttacgaaatgcaggaaacgttccgtgtgcca
D  F  S  K  K  R  D  F  I  I  Y  E  M  Q  E  T  F  R  V  P
cctaaaatttgcgaaagccgactggtttacatgaaaataaagtgctccagttgccc
P  K  I  C  E  S  R  L  V  Y  M  K  I  K  C  S  S  C
```

شکل ۳: توالی نوکئلوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن پروتئاز

توالی ژن پروتئاز به دست آمده در بانک اطلاعاتی Expasy.org/translate ترجمه و در بانک اطلاعاتی www.ncbi.com، Blast شد. سپس با استفاده از بانک اطلاعاتی www.clustal.org/omega هم‌ردیفی توالی پروتئینی پروتئاز مورد بررسی با آنزیم‌های دارای تشابه بالا، انجام شد (شکل ۴).

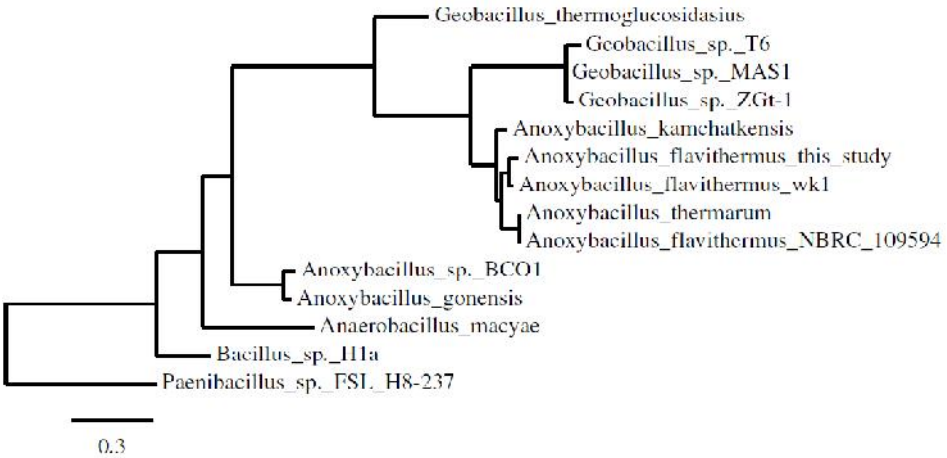
نتیجه هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی پروتئاز شباهت ۹۵ درصدی را با پروتئاز باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* نشان داد و ترجمه پروتئینی حاصل از ژن پروتئاز در مقایسه با پروتئاز *Anoxybacillus flavithermus WK1*، ۹۳ درصد شباهت نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده از Blast، درخت فیلوژنی پروتئین پروتئاز در بانک اطلاعاتی www.phylogeny.fr رسم شد و توالی مذکور به *Anoxybacillus flavithermus WK1* بیش‌ترین شباهت را نشان داد (شکل ۵). نتایج حاصل از درخت فیلوژنی نشان می‌دهد که ژن پروتئاز مورد مطالعه با باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* در یک کلاد خواهری قرار گرفته است.

```
3   MYLYKPCDLEKRISEAYQQNGIIYPSQLDEEYIARKFDILLVESKFGSFAEYCDDLKIVG
4   MYLYKPCDLEKRISEAYQQNGIIYPSQLDEEYIARKFDILLVESKFGSFAEYCDDLKIVG
5   MYLYKPCDLEKRISETYQQNGIIYPSQLDEGYIARKFDILLVDSRFGSFAEYCDDLKIVA
1   MYLYKPCDLEKRISEAYQQNGIIYPSHLDEEYIARKFDILLVESKFGSFAEYCGDLKIVA
2   MYLYKPCDLEKRISEAYQQNGIIYPSQLDEEYIARKFDILLVESKFGSFAEYCDDLKIVA

3   LHNDLELLKRREVFFHEVGELFLHVGDQSKMADSFRYFQESQTKRFTLFAAIPYHMLTYI
4   LHNDLELLKRREVFFHEVGELFLHVGDQSKMADSFRYFQESQTKRFTLFAAIPYHMLTYI
5   LHRDLDSFKRREVFFHEVGELFLHVGDQSKMTNSFRSYQESQAKRFTLFAAIPYHMLKYI
1   LHHDLNSLKRREVFFHEIGELFLHVGDQSKMTDSFRSFQESQAKRFTLFAAIPYHMLTYI
2   LHHDLDSLKRREVFFHEIGELFLHVGDQSKMTESFRFFQESQAKRFTLFAAIPYHMLTYI

3   DFSQKRDFIVYEMQETFRVPAEICERRMDYIENKMLSAKLASICS
4   DFSQKRDFIVYEMQETFRVPAEICERRMDYIENKMFSAKLASICS
5   DFSKKRDLIIYEMQETFRVSAEICESRLDYIENKVLSTKLETACL
1   DFSKKRDFIIYEMQETFRVPPKICESRLVYMKIKCSSC-------
2   DFSKKRDFIIYEMQETFRVPPKICESRLDYIENKVLSTKLEAACL
```

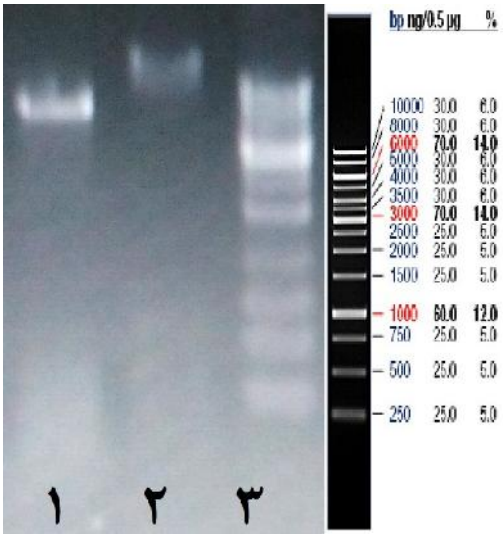
شکل ۴: نتیجه هم‌ردیفی توالی پروتئینی پروتئاز با پروتئازهای با تشابه بالا. توالی‌های پروتئینی ۱: *Anoxybacillus* مورد مطالعه، ۲: *Anoxybacillus flavithermus WK1*، ۳: *Anoxybacillus thermarum*، ۴: *Anoxybacillus flavithermus NRBC109594* و ۵: *Anoxybacillus kamchatkensis*.

کلونینگ پروتئاز

پس از تایید توالی نوکلئوتیدی، ژن پروتئاز در وکتور بیانی pET21a(+) جاگذاری شد. برای تایید جاگذاری نمونه حاصل از واکنش جاگذاری به همراه پلاسمید برش نخورده و پلاسمید هضم شده برروی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شد (شکل ۶). اندازه پلاسمید هضم شده به خاطر حذف قطعه نوکلئوتیدی که بین جایگاه برش آنزیم‌های *NheI* و *XhoI* قرار گرفته بود کوتاه‌تر شده بود (ستون ۱ در شکل ۶). پلاسمید نوترکیب که حاوی ژن پروتئاز مورد نظر بود طولی تقریباً ۶۰۰۰ جفت بازی داشت (ستون ۲ در شکل ۶).



شکل ۵: درخت فیلوژنی حاصل از توالی پروتئینی ژن پروتئاز

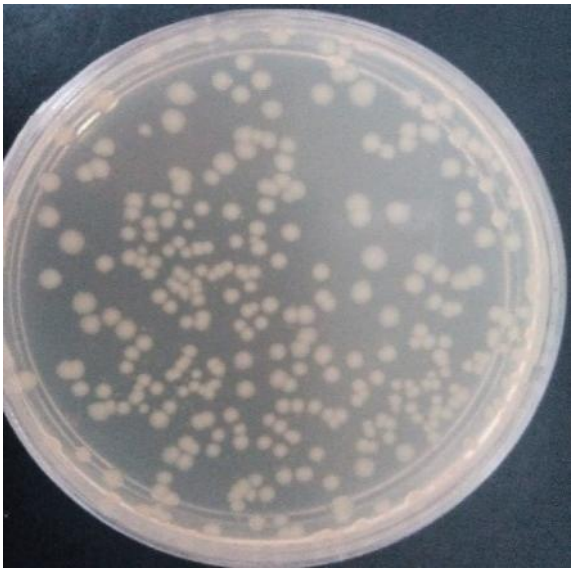


شکل ۶: جاگذاری ژن پروتئاز. ۱: پلاسمید پس از هضم آنزیمی. ۲: محصول جاگذاری ژن پروتئاز. ۳: مارکر وزن مولکولی DNA

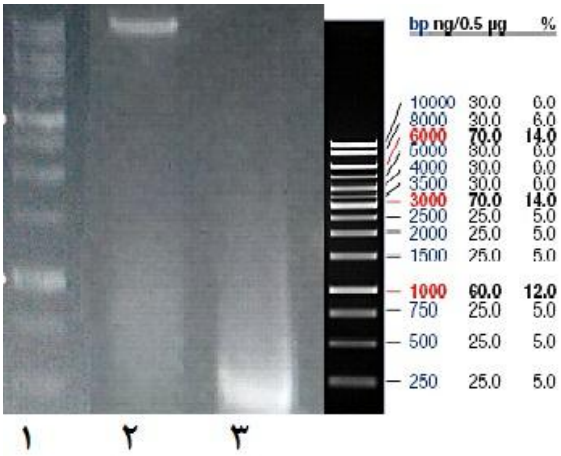
به منظور انتخاب کلونی‌های حاوی وکتور بیانی نوترکیب، کلونی‌های ترانسفورم شده (شکل۷) به طور تصادفی انتخاب و کلونی-PCR انجام شد. پلازمید باکتری‌های نوترکیب

استخراج و وجود ژن پروتئاز در آن توسط PCR مورد تایید قرار گرفت. محصول به دست آمده از روش‌های کلونی-PCR و وکتور-PCR باندی به طول ۵۰۰ جفت باز بود که با اندازه ژن کلون شده برابر بود (شکل ۸ و ۹).

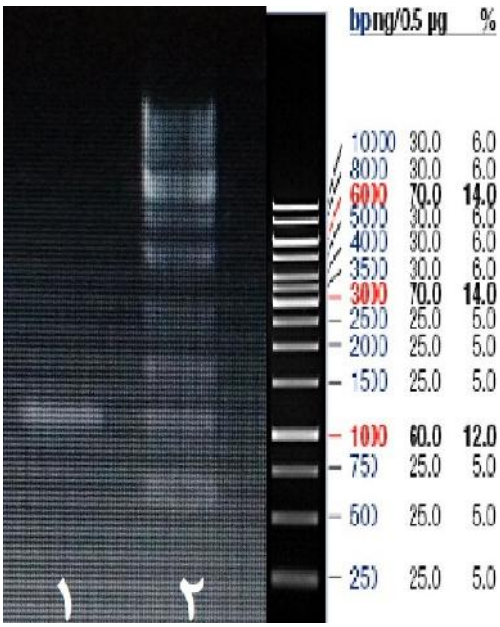
همچنین اندازه پلاسمید نوترکیب استخراج شده تقریباً ۶۰۰۰ جفت باز بود که با اندازه قابل انتظار برای وکتور نوترکیب کلون شده برابر بود (شکل ۹).



شکل ۷: کلنی‌های نوترکیب حاصل از ترانسفورم وکتور حاوی ژن پروتئاز به میزبان (*BL21*)



شکل ۸: وکتور-PCR. ۱: مارکر وزن مولکولی DNA. ۲: محصول استخراج پلاسمید از کلونی‌های ترانسفورم شده. ۳: محصول PCR



شکل ۹: کلونی-PCR. ۱: محصول PCR. ۲: مارکر وزن مولکولی DNA

بحث

یکی از مزایای پروتئازها در صنعت، پایداری آن‌ها در دماهای بالا است. شناسایی گونه مورد نظر با استفاده از پرایمرهای عمومی به منظور تکثیر ژن 16S rDNA و به کارگیری روش کلونی-PCR انجام شد. توالی به دست آمده از ژن 16S rDNA در بانک اطلاعاتی www.ncbi.com، Blast شد و برای توالی‌های مشابه آن توسط برنامه Mega 5 درخت فیلوژنتیکی رسم شد. نزدیک‌ترین گونه به باکتری مورد نظر باکتری *Anoxybacillus* sp. *A371* است که ۹۷ درصد شباهت را در توالی ژن 16S rDNA با توالی مورد نظر نشان داد (Kazemi et al., 2014). اگرچه طبق درخت فیلوژنی به دست آمده از این مطالعات (شکل۵) که بر اساس توالی آمینو اسیدی پروتئاز مذبور از طریق بانک اطلاعاتی www.phylogeny.fr به دست آمد، بیش‌ترین شباهت با باکتری *A. flavithermus WK1* مشاهده شد به این صورت که ژن پروتئاز حاصل از باکتری مورد مطالعه با ژن پروتئاز باکتری *A. flavithermus WK1* در یک کلاد خواهری قرار می‌گیرند.

در این مطالعه ژن مربوط به آنزیم پروتئاز حاصل از باکتری مورد نظر جداسازی و کلون شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که ژن پروتئاز مورد مطالعه با ژن پروتئاز *Anoxybacillus flavithermus WK1* ۹۵ درصد تشابه نشان داد. توالی پروتئینی تشابه ۹۳ درصدی را نشان می‌دهد که این تفاوت‌ها در آمینو اسیدهای شماره ۲۷، ۵۴، ۹۳، ۱۵۱، ۱۵۲، ۱۵۳، ۱۵۵، ۱۵۶ و ۱۵۸ مشاهده شد. اغلب متالوپروتئازهای دارای یون روی موتیف HEXXH دارند که یک مارپیچ α را شکل می‌دهند. در مطالعات کریستالوگرافی این موتیف به عنوان قسمتی از جایگاه اتصال به یون روی نشان داده شده است (Menach et al., 2013). در متالوپروتئاز مورد بررسی نیز موتیف مذبور با توالی HEIGH در موقعیت ۷۶ تا ۸۰ توالی قرار دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به دلیل حمایت‌های مالی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و از جناب آقای مهندس رسا برای تهیه نمونه باکتری مورد استفاده، مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع

Almas S., Hameed A., Shelly D. and Mohan P. 2009. Purification and characterization of a novel protease from *Bacillus* strain SAL1. African Journal of Biotechnology, 8: 3603–3609.

An S.Y., Ok M., Kim J.Y., Jang M.S., Cho Y.L., Kim C.H. and Lee Y.C. 2004. Cloning, high-level expression and enzymatic properties of an intracellular serine protease from *Bacillus* sp. *WRD-2*. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 41: 141–147.

Asoodeh A. and Mohammadian Musaabadi H. 2012. Purification and characterization of a thermostable neutrophilic metalloprotease from *Pseudomonas* sp. DR89. Iranian Journal of Biotechnology, 10: 121–128.

Do Nascimento W.C.A. and Martins M.L.L. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology. 35: 91–96.

Ellaiah P., Srinivasulu B. and Adinarayana K. 2002. A review on microbial alkaline proteases. Journal of Scientific and Industrial Research, 61: 690–704**.**

Fulzele R., Desa E., Yadaau A., Shouche Y. and Bhadekar R. 2011. Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolation from the Indian Ocean. Brazilian Journal of Microbiology, 42: 1364–1373.

Ghafoor A. and Hasnain S. 2010. Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacillus subtilis EAG-2* strain isolated from ornamental plant nursery. Polish Journal of Microbiology, 59: 107–112.

Goh K.M., Kahar U.M., Chai Y.Y., Chong C.S., Chai K.P., Ranjani V., Illias R. and Chan K.G. 2013. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(4): 1475–1488.

Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 15–32.

Kazemi M., Aghamaali M.R. and Asghari S.M. 2014. Purification of A-amylase from a strain of thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. Molecular Biology Research Communications, 3: 17–29.

Menach E., Hashida Y., Yasukawa K. and Inouye K. 2013. Effects of conversion of the zinc-binding motif sequence of thermolysin, HEXXH, to that of dipeptidyl peptidase III, HEXXXH, on the activity and stability of

thermolysin. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 77(9): 1901–1906.

Saw J.H., Mountain B.W., Feng L., Omelchenko M.V., Hou S., Saito J.A., Stott M.B., Li D., Zhao G., Wu J., Galperin M.Y. Koonin E.V., Makarova K.S. Wolf Y.I., Rigden D.J. Dunfield P.F. Wang L. and Alam M. 2008. Encapsulated in silica: Genome, proteome and physiology of the thermophiles bacterium *Anoxybacillus flavithermus WK1*. Genome Biology, 9: 1–16 (R161).

Uyar F., Porsuk I., Kizil G. and Yilmaz E.I. 2011. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. EurAsian Journal of BioSciences, 5: 1–9.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 3, Autumn 2015

A metalloprotease molecular cloning and sequencing of *Anoxybacillus flavithermus* from Qinarjeh, Meshgin-Shahr, Iran

Parvane Najafi[1], Mahmoud Reza Aghamaali[2]*, Seyed Mohsen Asghari[2]

Received: October 2015 Accepted: December 2015

Abstract

Biomacromolecules of thermophilic organisms are often thermostable. Apart from high temperature they are also known to withstand denaturants of extremely acidic and alkaline conditions. Thermostable enzymes have capable potentioal in the food and paper industries, detergents, drugs, toxic wastes removal and oil drilling. The enzymes can be produced from the thermophiles through either optimized fermentation of the microorganisms or cloning of fast-growing mesophiles by recombinant DNA technology. Metalloproteases are metal ion dependent protease. Metalloproteases that used in this study was a zinc-dependent endopeptidase. Metalloprotease gene was cloned from *Anoxybacillus flavithermus*. For the amplification of the gene, PCR was performed. A pair of primers designed with a cleavage site for enzymes *XhoI* and *NheI* and vector pET21a(+) clone was transformed into *BL21* host. The results of the cloned gene sequence analysis showed similarity to the protease gene different variants of the species *Anoxybacillus flavithermus*.

Key words: *Metalloprotease, Cloning,* Anoxybacillus flavithermus, *PCR.*

1- M.Sc. in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
*Corresponding Author: aghamaali@guilan.ac.ir