ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰
صفحه ۲۷۰ - ۲۶۳

# بهینه‌سازی بیان آنزیم سلوبیوهیدرولاز *cel6B* در باکتری *E. coli* BL21 (DE3)

# Optimization of *cel6B* enzyme expression in *E. coli* BL21 (DE3)

فهیمه حیدری قره‌سو[۱]، نسرین مشتاقی*[۱]، براتعلی مشکانی[۲]، سعید ملک‌زاده شفارودی[۱]

۱- به‌ترتیب کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

**Heydari-Gharehsoo F[1], Moshtaghi N[*1], Meshkani B[2], Malekzade-Shafarudi S[1]**

1- MSc of Agriculturral Biotechnology, Associated Professor, Associated Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Associated professor, Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medical, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moshtaghi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳)

## چکیده

**مصرف انرژی و تاثیر آن بر محیط‌زیست یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های بشر است و تولید اتانول زیستی یا سایر مواد شیمیایی به‌وسیله هیدرولیز آنزیمی سلولز می‌تواند تاثیر مهمی در جایگزینی سوختهای فسیلی و کاهش تولید $CO_2$ در اتمسفر داشته باشد. آنزیم *Cel6B* از باکتری گرمادوست *Thermobifidia fusca*، یک CBHII متعلق به خانواده بی سلولازهاست که تا ۵۵°C مقاوم به حرارت است. به‌علت میزان پایین تولید این آنزیم در میزبان اولیه جهت مصارف صنعتی، ابتدا باید تولید آن در سیستم‌هایی نظیر باکتری، بهینه‌سازی شود. در این پژوهش، از آغازگرهای اختصاصی جهت تایید وجود ژن *Cel6B* در وکتور PSZ143 استفاده شد سپس وکتور PSZ143 حاوی ژن *Cel6B* با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* BL21 (DE3) منتقل شد. پس از استخراج پروتئین، بیان یک پروتئین با وزن مولکولی 59.6 KDa با استفاده از ژل الکتروفورز SDS-PAGE تایید شد. نتایج بهینه‌سازی تولید پروتئین نشان داد که بهترین زمان و بهترین غلظت IPTG برای القا و بیان پروتئین در باکتری به‌ترتیب ٦ ساعت بعد از القا و ۰/۸ میلی‌مولار است. فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز با استفاده از سوبسترای پنبه پیش‌تیمار شده با اسید فسفریک در باکتری لیزشده با روش DNS مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنزیمی *cel6B* در هیدرولیز سلولز، در لیزات باکتری و محیط کشت آن پس از ٦ ساعت القا با ۰/۸ میلی‌مولار از IPTG، به‌ترتیب ۱/۲۱ و ۰/۰۷ U(µmol/min) / ml به‌دست آمد و در نهایت نشان داده شد که میزان بیان پروتئین *cel6B* به‌علت پایین بودن شاخص CAI (انطباق کدونی) و تفاوت کدون‌های مورد ترجیح *E. coli*، پایین است. همچنین با بررسی توالی سیگنال بومی این ژن در سرویس‌دهنده Signal P4.1 عدم قابلیت ترشح این پروتئین در *E. coli* اثبات شد.**

**واژه‌های کلیدی**

**القای بیان پروتئین**
**باکتری**
**سلوبیوهیدرولاز**
**سلولز**

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]

## مقدمه

مصرف انرژی و تاثیر آن بر محیط‌زیست یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های بشر است و سلولز به‌عنوان یک منبع تجدیدپذیر جهت تبدیل بیوماس به اتانول زیستی یا سایر مواد شیمیایی مورد توجه است که می‌تواند تأثیر مهمی در جایگزینی سوخت‌های فسیلی و کاهش تولید $CO_2$ اتمسفر داشته باشد (Cunha et al. 2013). به‌طوری‌که تقریبا ٦٠ درصد تقاضای بنزین آمریکا در سال ٢٠٠٤ با اتانول حاصل از دانه‌ها و بیوماس گیاهی تأمین می‌شد (Bayer et al. 2007). بازار جهانی آنزیم‌های صنعتی در سال ٢٠٠٩، ٣/١ میلیارد دلار و تا سال ٢٠١١ حدود ٣/٩ میلیارد دلار رسید (www.bccresearch.com). در حال حاضر سلولازها سومین گروه از آنزیم‌های مورد مصرف در جهان می‌باشند و تقاضا برای این آنزیم‌ها رو به افزایش است. یکی از عوامل کلیدی که به رشد بازار آنزیم‌های صنعتی کمک می‌کند، کاربردهای فراوان فرآورده‌های حاصل از این آنزیم‌ها می‌باشد که عمدتاً ترکیباتی آلی و زیست‌تخریب‌پذیر می‌باشند (Phitsuwan et al. 2013). هیدرولیز آنزیمی سلولز به مخلوطی از آنزیم‌ها از جمله سلولازها نیاز دارد. یک سیستم سلولاز شامل٣ فعالیت آنزیمی است: اندوگلوکانازها، سلوبیوهیدرولازها (CBH) و $\beta$ گلوکوزیدازها.

اکتینومیست Thermobifidia fusca YX که در دمای ٥٥°C بر روی بقایای مواد آلی گرم‌شونده‌ای مثل توده‌های کمپوست رشد می‌یابد، فاقد پروتئاز بوده (Gusek and Kinsella 1987) و از سوپرناتانت کشت آن بر روی سلولز و با استفاده از روشهای خالص‌سازی ٦ سلولاز مختلف، یک پروتئین اتصال‌شونده به سلولز با وزن مولکولی پایین، یک زایلاناز، یک بتاگلوکوزیداز داخل سلولی و یک زایلوگلوکاناز جداسازی شده است (Irwin et al. 2003). ژن‌های سلولازهای این باکتری همسانه‌سازی و توالی‌یابی شدند و توالی‌ها نشان می‌دهند که هر ژن دارای یک دومین اتصال‌شونده به سلولز از نوع خانواده دو (CBD) (Lao et al. 1991) و دومین‌های کاتالیتیک آن متعلق به چهار خانواده مختلف (٥، ٦، ٩ و ٤٨ ) هستند (Irwin et al. 2000). اگزوسلولاز *cel6B* یک CBHII با وزن مولکولی ٥٩/٦ KDa متعلق به خانواده بی سلولازهاست که فعالیت کاتالیتیکی آن مشابه CBHII از *Trichoderma reesei* ولی تا ٥٥°C مقاوم به حرارت است و محدوده pH بهینه آن گسترده و معادل ٧ می‌باشد درحالی‌که آنزیم‌های قارچی pH بهینه محدودی معادل ٤ دارند (Saloheimo et al. 1988). به‌علاوه نسبت به نوع قارچی، جایگاه فعال محصورتر و طویل‌تری دارد (Wu et al. 2013). همچنین حاوی آمینواسیدهای حفظ شده‌ای است که این آمینواسیدها در فعالیت کاتالیتیک در سلوبیوهیدرولاز II از *Trichoderma reesei* و *cel6A* از *T. fusca* ضروری هستند.

همسانه‌سازی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های سلولاز، تولید ارزان و به‌صرفه این آنزیم‌ها را امکان‌پذیر کرد. نتایج پژوهش‌های مرتبط با بیان این آنزیم‌ها در میزبانان دیگر، باعث بهبود شکست آنزیمی سلولز و مطالعات بیوشیمیایی آن، توسعه پایگاه‌های اطلاعاتی توالی ژنومی، پیشرفت در بیولوژی ساختاری آنزیم‌های سلولاز و مطالعات مهندسی پروتئین شد (Cunha et al. 2013). از جمله می‌توان به بیان هترولوگ دو سلولاز *E1* و *GH12* از *Acidothermus cellulolyticus* در میزبان تخمیری *Zymomonas mobilis* اشاره کرد. در این پژوهش هردو پروتئین به‌صورت فعال و محلول بیان شدند و آنزیم *GH12* بیش از ٤/٦ درصد از کل پروتئین سلولی را تشکیل داد ولی آنزیم E1 کمتر بیان شده بود (Linger et al. 2010). در پژوهشی دیگر بیان هترولوگ ژن‌های پیروات دکربوکسیلاز و الکل دهیدروژناز از *Z. mobilis* و بیان هترولوگ ژن آسیل ترانسفراز غیر اختصاصی از سویه *Acrinebacter baylyi* ADP1 در باکتری *Escherichia coli* جهت بیوسنتز بیودیزل (میکرودیزل) از منابع تجدیدپذیری همچون سلولز انجام شد (Kalscheuer et al. 2006).

به‌علت میزان پایین تولید آنزیم *cel6B* در میزبان اولیه جهت مصارف صنعتی، ابتدا باید تولید آن در سیستم‌هایی نظیر باکتری، بهینه‌سازی شود. هدف از این تحقیق، نیز بررسی امکان تولید سلوبیوهیدرولاز *cel6B* از اکتینومیست *Thermobifidia fusca* در *E. coli* و بررسی برخی ویژگی‌ها از جمله امکان افزایش سطح بیان آن به‌منظور استفاده از این آنزیم در صنایع و غیره است.

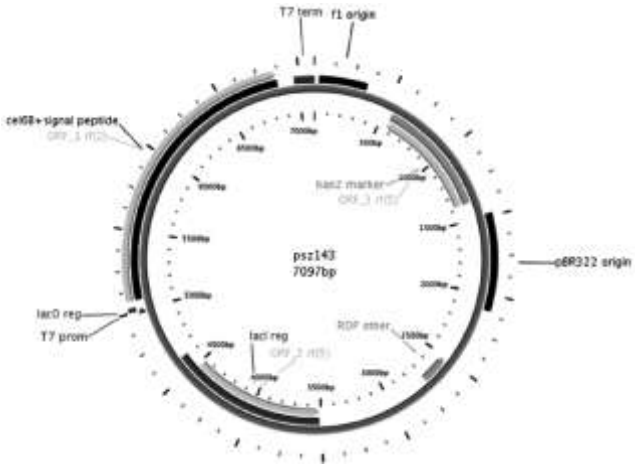


[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش از پلاسمید PSZ143 اهدایی دکتر دیوید بی‌ویلسون از دانشگاه کرنل[1] حاوی ژن *cel6B* (Zhang et al. *2000*)، به‌عنوان حامل بیانی در *E. coli* BL21(DE3) استفاده شد. پلاسمید PSZ143 با اندازه ۷۰۹۷ جفت‌باز (شکل۱) مبتنی بر pET26b(+) (با اندازه ۵۳۶۰ جفت‌باز به‌عنوان پلاسمید شاهد) است.




شکل ۱- نقشه حلقوی پلاسمید PSZ143 طراحی شده با سایت PlasMapper: قطعه ژنی سلوبیوهیدرولاز همراه با توالی سیگنال آن ( bases 5072-6862). (http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper)

تکثیر پلاسمید PSZ143 درون سویه DH5α انجام و برای تأیید حضور ژن *cel6B* در این پلاسمید آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده استفاده شد. برای این منظور، مخلوط واکنش PCR که در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده از PCR master amplicon 2x، آغازگرها و DNA پلاسمیدی و آب دیونیزه تهیه شد. سیکل دمایی این واکنش شامل مراحل، واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل، واسرشته‌سازی در دمای ۹٤°C به مدت۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز، محصولات PCR با استفاده از دستگاه Gel Documentation مشاهده و از ژل عکس‌برداری شد. توالی آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ژن *cel6B* شامل آغازگر رفت 5′-ATCCCGAACGTCTACAACTACATC-3′ و آغازگر برگشت 5′-GATACGGCTCTCTCGTCAACGTA-3′ می‌باشد.

پس از تهیه سلول‌های مستعد باکتری، تراریزش به باکتری *E. coli* BL21 با روش شوک حرارتی انجام شد (Sambrook 1989). در ادامه از روش PCR به‌منظور انتخاب کلنی‌های نوترکیب باکتری *E. coli* BL21 استفاده شد.

به‌منظور استخراج پروتئین از روش Nejadmoghaddam et al. (2006) با کمی تغییر برای لیز باکتری استفاده شد. به این صورت که به جای دستگاه هموژنایزر، رسوب باکتری به مدت ٤ دقیقه به شدت ورتکس شد. همچنین برای تفکیک و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها از ژل پلی‌آکریل‌آمید دارای SDS استفاده شد که دو غلظت آکریل‌آمید شامل ژل پایین (۱۲٪) و ژل بالا (۵٪) در آن به‌کار گرفته شد. آماده‌سازی محلول‌ها و مواد الکتروفورز بر اساس روش Laemmli انجام شد (Laemmli 1970). در این تحقیق برای انجام الکتروفورز از دستگاه BIO-RAD استفاده شد.

به‌منظور تعیین بهترین زمان بیان پروتئین در باکتری، در $OD_{600}$=1 در زمان‌های مختلف (۰، ۱، ۲، ۳، ٤، ۵ و٦ ساعت) بعد از القا با یک میلی‌مولار از IPTG، در دمای ۳۰°C و ۱۰۰ rpm نمونه‌گیری به حجم یک میلی‌لیتر انجام شد. همچنین به‌منظور تعیین بهترین غلظت IPTG در $OD_{600}$=1 از IPTG (با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸ و ۱/۵ میلی‌مولار) بعد از ٦ ساعت القا در دمای ۳۰°C و ۱۰۰rpm استفاده شد و سپس نمونه‌گیری به حجم یک میلی‌لیتر انجام شد. قابل توجه است که از باکتری BL21(DE3) حاوی پلاسمید pET26b(+) به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در مقالات مختلف ارزیابی فعالیت آنزیم *cel6B*، بر روی سوبستراهای مختلفی از جمله CMC، SW، FP، BMCC، PNPC، SC و PC انجام شده است (Vuong and Wilson 2009; Wilson 2004). اما بیشترین فعالیتی که از آن گزارش شده مربوط به پنبه پیش‌تیمارشده با اسید فسفریک (PC) بود. لذا در این تحقیق از PC به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. از روش DNS برای تخمین غلظت قندهای احیاکننده در نمونه استفاده شد (Miller 1959). فرآورده اصلی آنزیم سلوبیوهیدرولاز در تجزیه PC، سلوبیوز است که در روش DNS، در طول موج ٥٤٠ نانومتر قابلیت جذب

[1] Dr David B. Wilson from Cornell University



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]

دارد. جذب اندازه‌گیری شده با استفاده از اسپکتروفتومتر، مستقیماً متناسب با مقدار قند احیاکننده در محلول است. بنابراین برای تبدیل چگالی‌های نوری خوانده شده به فعالیت آنزیم، از منحنی استاندارد سلوبیوز استفاده شد. سپس فعالیت آنزیم بر اساس واحد فعالیت آنزیمی به ازای هر میلی‌لیتر از نمونه ( U(µmol/min)/ml) محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم طبق مراحل زیر انجام شد: ۱. مقدار ۱۴۲ میکرولیتر از سوبسترای PC با غلظت ۱/۷۶٪ (تا غلظت نهایی ۰/۲۵ درصد در واکنش) به بافر سدیم استات ۰/۰۵M ، با pH: ۵/۵ اضافه شد. ۲. سپس تا حجم ۱ میلی‌لیتر، از محلول لیزات باکتری به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در ۵۰°C انکوبه شدند. همچنین به‌عنوان کنترل، سنجش فعالیت آنزیم در محیط‌کشت رویی که قبلا با سانتریفوژ جدا شده بود، انجام شد. ۳. جهت اندازه‌گیری مقدار قند احیاکننده تولید شده، ۱ میلی‌لیتر از محلول DNS[1] اضافه شد و نمونه‌ها در آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سدیم پتاسیم تارتارات ۴۰٪ به‌منظور توقف واکنش رنگی‌شدن، اضافه شد و بعد از سرد شدن نمونه‌ها تا دمای اتاق، دو برابر حجم نمونه (۶ ml) به آن آب‌مقطر اضافه شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت قندهای احیاکننده با منحنی استاندارد سلوبیوز تخمین زده شدند (Irwin et al. 1993).

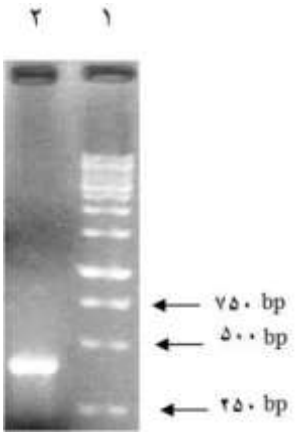
به‌منظور بررسی شاخص انطباق کدونی[2] (CAI) و فراوانی کدون‌های نادر ژن *cel6B* برای بیان در *E. coli*، توالی نوکلئوتیدی ژن *cel6B* از سایت GenScript (https://www.genscript.com) استفاده شد.

به‌منظور بررسی توالی آمینواسیدی سیگنال بومی پروتئین *cel6B* جهت تعیین محل تجمع محصول از سرویس‌دهنده Signal P4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) استفاده شد.

## نتایج

تایید حضور ژن *cel6B* و تأیید تراریزش پلاسمید PSZ143 به باکتری

به‌منظور تایید حضور ژن *cel6B* در پلاسمید PSZ143، به‌عنوان حامل‌بیانی در *E. coli* BL21(DE3) ، از واکنش PCR استفاده شد. باند اختصاصی این واکنش، مربوط به بخش داخلی این ژن بوده و اندازه‌ای معادل ۴۲۳ جفت‌باز مشاهده شد (شکل۲). همچنین به‌منظور بیان ژن *cel6B* در باکتری BL21(DE3)، پلاسمیدهای استخراج شده از مرحله‌ی قبل به درون سویه BL21(DE3) به روش شوک حرارتی منتقل شد و در نهایت با واکنش PCR وجود پلاسمید PSZ143 تایید شد.




شکل۲- الکتروفورز محصول PCR برای تایید حضور ژن *cel6B*. چاهک ۱:. نشانگر DNA . ۲: محصول PCR با اندازه ۴۲۳ جفت‌باز.

بررسی فرآیند بیان سلوبیوهیدرولاز *cel6B* در باکتری

بر اساس یافته‌های تحلیل پیش‌توالی سیگنال ژن cel6B در پلاسمید PSZ143 پیش‌بینی شد که این آنزیم به‌صورت داخل سلولی در *E.* coli تولید شود.

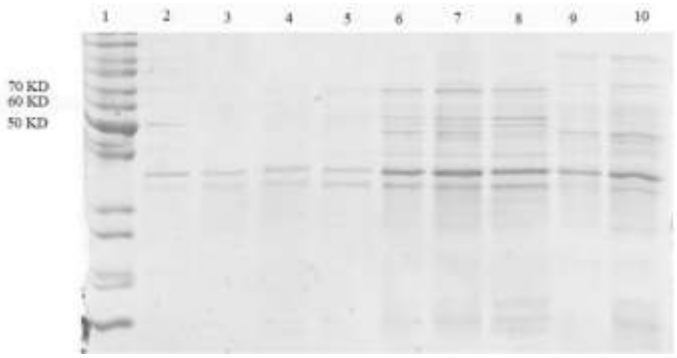
تعیین بهترین زمان و بهترین غلظت IPTG برای القا و بیان پروتئین در باکتری

از ۳ ساعت بعد از القا (چاهک‌های ۵، ۶، ۷ و ۸ ، شکل ۳)، پروتئینی به اندازه ۶۰ کیلودالتون بیان می‌شود ولی قبل از القا (چاهک ۲، شکل۳) و در زمان‌های ۱ و ۲ ساعت بعد از القا (چاهک ۳ و ۴ شکل ۲) هیچ باند پروتئینی با این اندازه بر روی ژل قابل مشاهده نیست (چاهک۲، شکل۳).

[1] 3,5-Dinitrosalicylic acid
[2] Codon Adaptation Index



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]

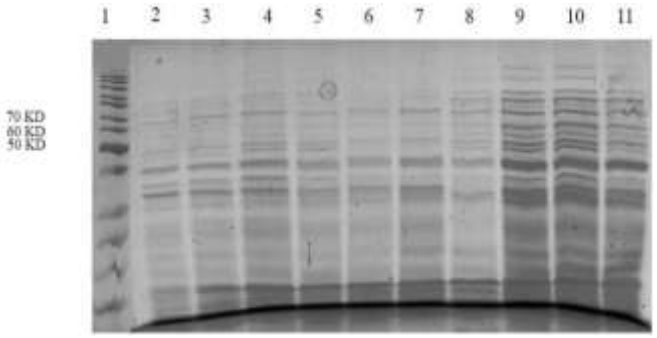



شکل۳- تعیین بهترین زمان بیان سلوبیوهیدرولاز با القای یک میلی‌مولار IPTG در رسوب باکتری چاهک ۱: نشانگر اندازه پروتئین، چاهک‌های ۲ تا ۸ بیان پروتئین *cel6B* به‌ترتیب در ساعت‌های صفر، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥ و ٦ بعد از القا (ساعت‌های ۳ تا ٦ با دایره قرمز نشان داده شده است) و چاهک‌های ۹ و ۱۰ به‌ترتیب نمونه‌های شاهد (*E. coli* BL21 pet26b+) در زمان‌های ۰ و ٦ ساعت.

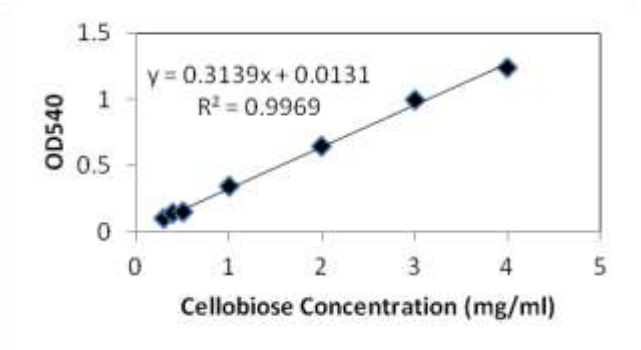
از آن‌جایی که در همه‌ی چاهک‌های شکل۳، مقدار ۱۵ میکرولیتر از نمونه‌های لیزات باکتری بارگذاری شده بود می‌توان نتیجه گرفت پروتئین *cel6B* بعد از ٦ ساعت القا، بیشترین بیان را داشته است. در سویه‌ی BL21(DE3) پیشبر lacUV5 در حضور IPTG القا شده و رونویسی از ژن رمز دهنده T7 RNA polymerase را پیش می‌برد. ولی IPTG برای باکتری سمی می‌باشد بنابراین نه تنها می‌بایست غلظت مناسبی از آن استفاده شود تا بیشترین مقدار پروتئین رونویسی شود همچنین باید توجه داشت این غلظت برای خود باکتری سمی نباشد. نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف IPTG برای القای پروتئین نشان داد که غلظت نهایی ۰/۸ میلی‌مولار از IPTG بعد از ٦ ساعت (چاهک۱۰، شکل٤)، بیشترین مقدار بیان را نشان داد (شکل٤).

سنجش فعالیت آنزیم سلوبیوهیدرولاز

منحنی استاندارد سلوبیوز با استفاده از مقدار جذب غلظت‌های مختلف سلوبیوز در روش DNS در طول موج ٥٤٠ نانومتر، با کمک نرم‌افزار Excel رسم شد (شکل٥). موفقیت روش استخراج آنزیم، برای به‌دست آوردن آنزیم سالم و فعال، در ارزیابی فعالیت پروتئین با سوبسترای PC تایید شد (لوله شماره یک در شکل ٦-الف).




شکل ٤- تعیین بهترین غلظت IPTG بعد از ٦ ساعت القا. چاهک ۱: نشانگر اندازه پروتئین، چاهک‌های ۲ تا ٦: نمونه‌های شاهد ( *E .coli* BL21 +pet26b) به‌ترتیب با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸و ۱/٥میلی‌مولار از IPTG . چاهک‌های ۷ تا ۱۱ : نمونه‌های بیان پروتئین *cel6B* به ترتیب با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/٤، ۰/۸و۱/٥ میلی‌مولار از IPTG .

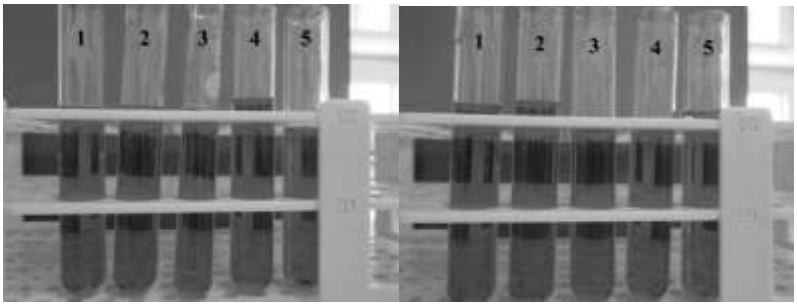



شکل٥ – نمودار استاندارد سلوبیوز

در عکس‌های ژل SDS-PAGE نیز مشاهده می‌شود که علاوه بر سلوبیوهیدرولاز *cel6B* پروتئین‌های دیگری نیز در لیزات باکتری وجود دارند که از معایب این سیستم پروکاریوتی برای بیان این آنزیم می‌باشند، بنابراین لازم است که از سایر پروتئین‌ها تخلیص شود. قابل ذکر است که نمونه‌های بلانک در شکل ٦-الف شامل محلول‌های لیز باکتری، آب،PC، محلول DNS و سدیم پتاسیم تارتارات و در شکل ٦-ب همه این مواد است فقط به‌جای محلول‌های لیز باکتری، از محیط کشت LB تمیز استفاده شد. متوسط فعالیت آنزیمی سلوبیوهیدرولاز *cel6B* از سه تکرار در لیزات باکتری حاوی سازه PSZ143 و محیط کشت آن پس از ٦ ساعت القا با ۰/۸ میلی‌مولار از IPTG، به‌ترتیب ۱/۲۱ و ۰/۰۷ U(µmol/min) / ml به‌دست آمد.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]




شکل ٦- الف: ارزیابی فعالیت cel6B به‌صورت خارج سلولی در محیط‌کشت با سوبسترای PC و روش DNS. ب: ارزیابی فعالیت cel6B حاصل از لیزات باکتری با سوبسترای PC و روش DNS . لوله ۱و۲ به‌ترتیب: بیان پروتئین cel6B بعد و قبل از القا با ۰/۸ میلی‌مولار IPTG. لوله ۳و٤ به‌ترتیب: BL21(DE3) حاوی PET26b(+) و BL21(DE3) بدون پلاسمید بعد از القا با ۰/۸ میلی‌مولار IPTG. لوله ٥: بلانک.

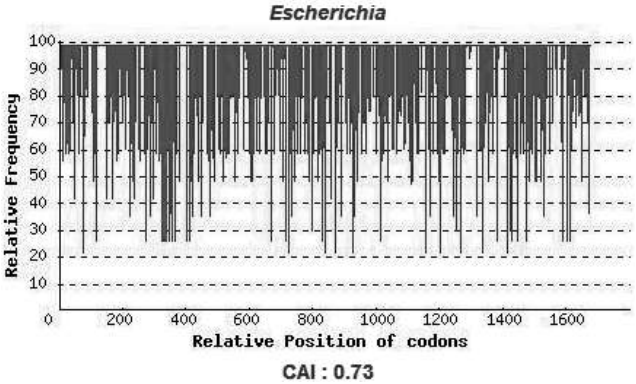
بررسی سازگاری کدونی قطعه کدکننده ژن *cel6B* برای بیان در *E. coli*

شاخص انطباق کدونی (CAI) احتمال بیان بالا یا به نوعی همبستگی که بین ترجیح کدونی یک ژن و سطح بیان آن مشاهده می‌شود، را در میزبان بیانی نشان می‌دهد.

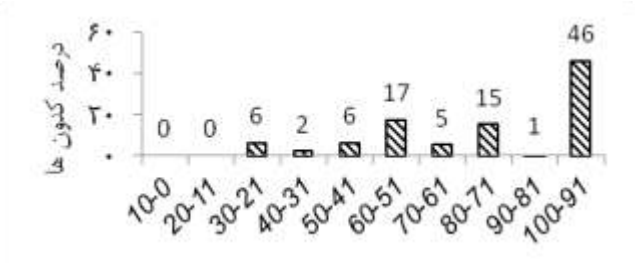
این مقیاس مصرف کدون، ناشی از یک مجموعه مرجع از ژن‌های با بیان بالا جهت امتیازدهی به کدون‌های خاص مورد ترجیح یک موجود است و زمانی که بیان ژن در میکروارگانیسم مورد نظرایده‌آل باشد، CAI=1 خواهد شد و مقادیر بیشتر از ۰/۸ برای بیان در میکروارگانیسم مورد نظر، خوب توصیف شده است. همان‌طور که در شکل۷ نشان داده شده است، در باکتری *E. coli* این ژن دارای CAI= 0.73 می‌باشد بنابراین این ژن برای بیان در باکتری *E. coli* نیاز به بهینه‌سازی دارد. همچنین براساس شکل۸، مقدار ٦ درصد کدون‌ها در این باکتری فراوانی کمتری دارند و ٤٦ درصد آن‌ها بیشترین فراوانی را دارند. با توجه به نزدیکی شاخص انطباق کدونی قطعه کدکننده *cel6B* به حد آستانه ۰/۸ و نبود هیچ کدونی با فراوانی کمتر از ۲۰ درصد تصمیم گرفته شد که در جهت صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌ها در این مرحله (آزمایشگاهی) از بهینه‌سازی توالی صرف‌نظر شود. اگرچه در مرحله تولید صنعتی، بهینه‌سازی توالی کدکننده برای به حداکثر رساندن تولید محصول لازم خواهد بود.

تعیین محل تجمع محصول بر اساس مقایسه توالی سیگنال بومی ژن *cel6B*

باکتری *E. coli* به‌طور طبیعی تحت شرایط استاندارد آزمایشگاه، پروتئین‌ها را به محیط خارج از سلول ترشح نمی‌کند، بنابراین بیان خارج سلولی در *E. coli* با واسطه یک پپتید رهبر خاص صورت می‌گیرد که به آن پپتید سیگنال می‌گویند. پپتیدهای سیگنال مختلف کارآیی ترشحی متفاوتی دارند و برخی ویژگی‌های مشترک دارند که در میان موجودات مختلف حفظ شده‌اند ( Yang et al. 2018).




شکل ۷- وضعیت شاخص انطباق کدونی (CAI) ژن cel6B در باکتری E. coli با استفاده از سایت Genscript.




شکل ۸- توزیع فراوانی کدونی در E. Coli با استفاده از سایت Genscript. ٦ درصد کدون‌ها در این باکتری فراوانی کمتری دارند و ٤٦ درصد آن‌ها بیشترین فراوانی را دارند.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]

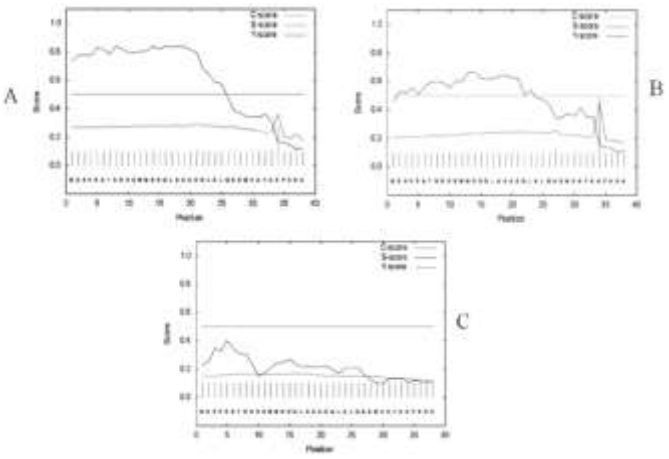
ژن *cel6B* یک پروتئین با ۵۹۶ اسیدآمینه را کد می‌کند (Zhang et al. 1995) که حاوی یک توالی سیگنال ۳۸ آمینواسیدی قبل از توالی N ترمینال پروتئین طبیعی خودش می‌باشد که مشابه سایر توالی‌های سیگنال اکتینومیست‌ها از لحاظ اندازه، ترکیب و جایگاه شکست می‌باشد (Hütter et al. 1988). با وارد کردن توالی آمینواسیدی سیگنال پروتئین در سرویس‌دهنده Signal P4.1 اطلاعاتی درباره آن ارائه می‌شود. از آنجایی که اکتینومیست‌ها جزء باکتری‌های گرم مثبت هستند این سرویس‌دهنده پیش‌بینی می‌کند که توالی سیگنال بومی ژن *cel6B* باعث ترشح پروتئین می‌شود چون مقدار Y- Score (۰/۳۶۵) بیشتر از C-Score (۰/۲۷۹) است. اما در باکتری *E. coli* که جزء باکتری‌های گرم منفی است پیش‌بینی شده که این توالی سیگنال نمی‌تواند پروتئین را به سمت مسیرهای ترشحی هدایت کند که به علت کمتر بودن Y-Score آن (۰/۴۵۲) از C-Score (۰/۴۹۱) می‌باشد که این نتیجه با نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت پروتئین در رسوب باکتری و محیط‌کشت در این مطالعه، سازگار می‌باشد. همچنین استفاده از سیگنال بومی ژن *cel6B* برای بیان این ژن در یوکاریوت‌ها پیشنهاد نمی‌شود چون احتمال شناسایی این سیگنال در یوکاریوت‌ها پایین است که به سبب مقدار کم S-Score (۰/۴۰۳) می‌باشد (جدول ۱و شکل۹).

## بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که فرآیند تراریزش پلاسمید PSZ143، حاوی ژن *cel6B*، (Zhang et al. *2000*) به درون حامل‌بیانی *E. coli* BL21(DE3) با موفقیت انجام شد. سلولاز cel6B با وزن مولکولی 59.6 KDa در باکتری *E. coli* بیان می‌شود که بهترین زمان و بهترین غلظت IPTG برای القا و بیان آن در باکتری به‌ترتیب ۶ ساعت بعد از القا و ۰/۸ میلی‌مولار است، ولی میزان بیان آن پایین و به‌صورت خارج سلولی ترشح نمی‌شود. متوسط فعالیت آنزیمی سلوبیوهیدرولاز cel6B از سه تکرار در لیزات باکتری حاوی سازه PSZ143 و محیط کشت آن، به‌ترتیب ۱/۲۱ و ۰/۰۷ U(µmol/min) / ml به‌دست آمد.

جدول ۱- پیش‌بینی حاصل از سرویس‌دهنده Signal P4.1 برای توالی سیگنال بومی ژن cel6B در *T. fusca* ، *E. coli* و یوکاریوت‌ها.

| score | *T. fusca* | *E. coli* | Eukaryote |
|---|---|---|---|
| max. C | 0.279 | 0.491 | 0.107 |
| max. Y | 0.365 | 0.452 | 0.17 |
| max. S | 0.843 | 0.667 | 0.403 |




شکل ۹- پیش‌بینی حاصل از سرویس‌دهنده Signal P4.1 برای توالی سیگنال بومی ژن *cel6B*. A: پیش‌بینی در *T. fusca*. از آن جایی که Y-Scoreبیشتر از C-Score است، بنابراین این توالی سیگنال باعث ترشح پروتئین به بیرون از سلول می‌شود. B: پیش‌بینی در *E. coli*. به‌علت کمتر بودن Y-Score از C-Score، این پروتئین به‌صورت داخل سلولی منتشر می‌شود. C: پیش‌بینی در یوکاریوت‌ها. مقدار کم S- Score نشان‌دهنده احتمال ضعیف شناسایی این سیگنال در یوکاریوت‌هاست.

کاهش میزان بیان این پروتئین به‌علت پایین بودن CAI و تفاوت کدون‌های مورد ترجیح این باکتری است و علت ترشح نشدن آنزیم مربوط به توالی سیگنال بومی این ژن است. از طرفی سازه‌های قبلی برای این ژن، نیز فاقد سیگنال ترشحی قابل تشخیص برای E. coli بودند و در آن زمان جهت استخراج این پروتئین از رسوب باکتری، از دستگاه French Press استفاده شده بود (Zhang et al. 1995).

در مطالعه‌ای ژن *cel6B* پس از همسانه‌سازی و توالی‌یابی در *Streptomyces lividans* بیان شد. آنزیم نوترکیب مقاوم به حرارت بوده و بعد از انکوباسیون به مدت ۱۶ ساعت در ۵۵°C همه فعالیت خود را حفظ نموده و از نظر فعالیت اتصال به سلولز و مقاومت به حرارت، نیز با آنزیم طبیعی یکسان بود (Zhang et al. 1995). در پژوهشی دیگر بیان *cel6B* و *cel6A* این باکتری، در



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]

کلروپلاست واریته‌های توتون دارای نیکوتین و بدون نیکوتین گزارش شد. به‌طوری‌که حداکثر میزان بیان بین ۲ تا ٤ درصد کل پروتئین محلول تخمین زده شد و ارزیابی‌های آنزیمی هر دو، نشان داد که در هیدرولیز سلولز کریستالین فعال می‌باشند (Yu et al. 2007).

**سپاسگزاری**

بدین‌وسیله از جناب دکتر دیوید بی ویلسون از دانشگاه کرنل به‌سبب اهدای پلاسمید PSZ143، حاوی ژن *cel6B*، تشکر می‌نمایم. همچنین از سرکارخانم دکتر مشتاقی و پرسنل محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه فردوسی بسیار سپاسگزارم.

## منابع

Bayer EA, Lamed R, Himmel ME (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. Current Opinion in Biotechnology 18:237-245.

Cunha E, Hatem CL, Barrick D (2013) Natural and Designed Enzymes for Cellulose Degradation. In: Advanced Biofuels and Bioproducts. Springer New York 339-368.

Gusek TW, Kinsella JE (1987) Purification and characterization of the heat-stable serine proteinase from *Thermomonospora fusca* YX. Biochemical Journal 246:511-517.

Hütter R, Eckhardt T, Goodfellow M, Williams S, Mordarski M (1988) Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, London 89-184.

Irwin DC, Spezio M, Walker LP, Wilson DB (1993) Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. Biotechnology and Bioengineering 42:1002-1013.

Irwin DC, Zhang S, Wilson DB (2000) Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. European Journal of Biochemistry 267:4988-4997.

Irwin DC, Cheng M, Xiang B, Rose JK ,Wilson DB (2003) Cloning ,expression and characterization of a family-74 xyloglucanase from *Thermobifida fusca.* European Journal of Biochemistry 270:3083-3091.

Kalscheuer R, Stölting T, Steinbüchel A (2006) Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. Microbiology 152:2529-2536.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680.

Linger JG, Adney WS, Darzins A (2010) Heterologous expression and extracellular secretion of cellulolytic enzymes by *Zymomonas mobilis*. Applied and Environmental Microbiology 76:6360-6369.

Lao G, Ghangas GS, Jung ED, Wilson DB (1991) DNA sequences of three beta-1,4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*. Journal of Bacteriology 173:3397-3407.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31:426-428.

Nejad Moghaddam M, Modarresi M, BabaShamsi M, Chamankhah M (2006) Streptokinase: extraction, cloning and overexpression of recombinant. Research in Medicine 30:245-252 (In Farsi).

Phitsuwan P, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O, Kyu KL, Ratanakhanokchai K (2013) Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. Folia Microbiologica 58:163-176.

Saloheimo Ma, Lehtovaara P, Penttilä M, Teeri T, Ståhlberg J, Johansson G, Pettersson G, Claeyssens M, Tomme P, Knowles J (1988) EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme Gene 63:11-21.

Sambrook J (1989) Analysis and cloning of leukaryotic genomic DNA. Molecular Cloning 16-23.

Vuong TV, Wilson DB (2009) The absence of an identifiable single catalytic base residue in *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. FEBS Journal 276:3837-3845.

Wilson DB (2004) Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. The Chemical Record 4:72-82.

Wu M, Bu L, Vuong TV, Wilson DB, Crowley MF, Sandgren M, Ståhlberg J, Beckham GT, Hansson H (2013) Loop motions important to product expulsion in the *Thermobifida fusca* glycoside hydrolase family 6 cellobiohydrolase from structural and computational studies. Journal of Biological Chemistry 288:33107-33117.

Yang L, Xu Y, Chen Y, Ying H (2018) Efficient Extracellular Expression of Phospholipase D in *Escherichia Coli* with an Optimized Signal Peptide. In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 301:012105.

Yu LX, Gray BN, Rutzke CJ, Walker LP, Wilson DB, Hanson MR (2007) Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. Journal of Biotechnology 131:362-369.

Zhang S, Lao G, Wilson DB (1995) Characterization of a *Thermomonospora fusca* exocellulase. Biochemistry 34:3386-3395.

Zhang S, Irwin DC, Wilson DB (2000) Site directed mutation of noncatalytic residues of *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. European Journal of Biochemistry 267:3101-3115.



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.3.2.4 ]