ژنتیک نوین
دورهجدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
صفحه ۹۵ - ۸۵

جداسازی، همسانه‌سازی مولکولی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *htrB* استخراج شده از *Bacillus licheniformis*

Isolation, Molecular Cloning and Bioinformatics Evaluation of *htrB* Serine Protease Gene Extracted from *Bacillus licheniformis*

زهرا آقایی جشوقانی[۱]، رامین حسین[*۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

Aghaei Jeshvaghani Z[1], Hosseini R[*1]

1- PhD Student, Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.hosseini@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۰۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۳)

چکیده

پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شوند. معمولاً برای تولید این آنزیم‌ها برای مصارف صنعتی از باکتری‌های متعلق به جنس باسیلوس استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش جداسازی، همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *htrB* استخراج شده از باکتری باسیلوس لیکنی‌فورمیس بود. در این مطالعه، پس از استخراج DNA باکتریایی، یکی از ژن‌های سرین پروتئاز با نام *htrB* از باکتری *Bacillus licheniformis* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جداسازی شد. قطعه تکثیر شده به طول ۱۳۷۱ نوکلئوتید در ناقل pTG19-T همسانه‌سازی شد و درستی همسانه‌سازی به‌وسیله توالی‌یابی تأیید شد. سپس ژن همسانه‌سازی شده موجود در پلاسمید نوترکیب pTG19-T-htrB، در ناقل pET41a (+) همسانه‌سازی شد. ساختار مولکولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی پروتئین کد شده توسط این ژن مورد بررسی قرار گرفت. این ژن پروتئینی با ۴۵۶ آمینواسید را کد می‌کند که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده آن به‌ترتیب برابر ۴۸/۶۶ کیلو دالتون و ۴/۸۵ می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد که آنزیم مذکور در دسته آنزیم‌های پایدار قرار گرفته و در باکتری اشرشیاکلای به‌صورت محلول بیان خواهد شد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های فیلوژنتیکی، توالی پروتئینی به‌دست آمده شباهت زیادی را با توالی‌های سایر باسیلوس‌ها از قبیل *B. subtilis*، *B. gobiensis* و *B. pumilus* نشان داد. ساختار سه بعدی آنزیم کلون شده با استفاده از ابزارهای PyMOL، PHYRE2، I-TASSER، RAPTORX و Modeller پیش‌بینی شد. پس از ارزیابی مدل‌های ترسیم شده مشخص شد که مدل‌های ارائه شده توسط دو نرم‌افزار PHYRE2 و RAPTORX مدل‌های مطلوبی برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی این پروتئاز هستند.

واژه‌های کلیدی

سرین پروتئاز
مدل‌سازی پروتئین
همسانه‌سازی مولکولی
Bacillus licheniformis

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

مقدمه

پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی به‌شمار رفته و در بیوتکنولوژی امروزی نقش مهمی ایفا می‌کنند. ۶۰ درصد از فروش آنزیم‌های دنیا به پروتئازها اختصاص دارد (Nascimento et al. 2004). این آنزیم‌ها به‌طور گسترده‌ای در تولید مواد شوینده، مواد غذایی، کالاهای چرمی، تیمار و تجزیه فاضلاب، داروها، منسوجات و به‌عنوان افزودنی به غذای حیوانات برای سهولت هضم استفاده می‌شوند (Pastor et al. 2001). دو سوم از پروتئازهای تولیدی، در صنایع شوینده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Gupta et al. 2001).

منابع اصلی تولید پروتئازها حیوانات، گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند؛ اما تولید آنزیم‌ها از منابع گیاهی و جانوری به‌دلیل شرایط آب و هوایی و موضوعات وابسته به آن محدود است (Huang et al. 2003; Doddapaneni et al. 2009; Olajuyigbe et al. 2013). میکروارگانیسم‌ها منبع مناسبی از آنزیم‌ها هستند؛ چرا که آنزیم‌های موجود در آن‌ها از نظر خصوصیات بیوشیمیایی دارای تنوع بوده و نیز دستکاری ژنتیکی در آن‌ها از امکان بیشتری برخوردار است. این موجودات به‌دلیل رشد سریع، نیاز به فضای محدود برای کشت و آسانی تولید آنزیم‌های جدید با خصوصیات تغییر یافته، بسیار مورد توجه هستند (Chu 2007). در میان پروتئازهای میکروبی که شامل انواع باکتریایی، قارچی و ویروسی می‌باشند؛ پروتئازهای باکتریایی از لحاظ صنعتی بیشتر مورد توجه قرار گرفتند.

کاربرد سرین پروتئازها به‌دلیل این که در pH قلیایی فعال بوده و محدوده وسیعی از مواد را به‌عنوان پیش‌ماده مورد استفاده قرار می‌دهند؛ بیش از سایر پروتئازها می‌باشد (Rani et al. 2012). سرین پروتئازهای قلیایی توسط بسیاری از گونه‌های باسیلوس مانند *Bacillus licheniformis* و *B. pumilus* تولید شده و در صنایع غذایی و شوینده به طور عمده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ward and Fogarty 1983). به‌همین دلیل مطالعات بسیار زیادی در مورد این آنزیم‌ها صورت گرفته است (Çalık et al. 2001). خصوصیات مربوط به بسیاری از پروتئازهای جنس باسیلوس شناسایی شده و ژن مرتبط با آن‌ها همسانه‌سازی و توالی‌یابی شده است (Well et al. 1983; Jacobs et al. 1985; Lin et al. 1995; Kaur et al. 2012; Hadjidj et al. 2012). لین و همکاران پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز متعلق به *B. licheniformis* به‌نام *apr* در ناقل pGM-T، بیان این ژن را در ناقل بیانی مورد مطالعه قرار داده و در ادامه تأثیر اجزای محیط کشت را بر بیان این پروتئاز نوترکیب بررسی کرده‌اند (Lin et al. 2015). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده است که جرم مولکولی سوبتیلیزین تولید شده توسط *B. licheniformis* و سوبتیلیزین جدا شده از *B. amyloliquefaciens* که به‌عنوان آنزیم پروتئاز در فرمولاسیون مواد شوینده به‌کار می‌روند؛ ۲۷ کیلو دالتون بوده و تنها در ۵۸ آمینواسید با یکدیگر متفاوت هستند (Well et al. 1983; Lin et al. 1995).

پروتئازها توسط طیف گسترده‌ای از موجودات تولید می‌شوند؛ با این حال توانایی مقاومت در محیط‌های سخت را نداشته و گاه در تجاری‌سازی موفق نبوده‌اند. بنابراین تکنولوژی DNA نوترکیب می‌تواند به‌طور گسترده برای بهبود و تکامل آنزیم‌هایی با اهداف خاص تجاری مورد استفاده قرار گیرد. از آن‌جایی که گونه *B. licheniformis* از نظر ژنتیکی با گونه *B. subtilis* ۸۴ درصد شباهت دارد (Rey et al. 2004) و بیان ژن *htrB* باکتری *B. subtilis* در شرایط تنش افزایش یافته و موجب تخریب پروتئین‌هایی با تاخوردگی‌ها اشتباه می‌شود (Hyyryläinen et al. 2001)؛ به‌نظر می‌رسد که جداسازی این ژن از *B. licheniformis* و شناسایی پروتئین آن به‌منظور بهره‌وری بیشتر در صنعت، مطلوب باشد.

هدف از این مطالعه، جداسازی و همسانه‌سازی یک سرین پروتئاز از باکتری *B. licheniformis*، تحت عنوان *htrB* می‌باشد تا در پژوهش‌های آتی بتوان از آن به کمک تکنولوژی DNA نوترکیب در مهندسی ژنتیک در جهت تکامل پروتئاز با اهداف خاص تجاری استفاده نمود. همچنین خصوصیات بیوشیمیایی و ساختارهای دو بعدی و سه بعدی پروتئین مورد مطالعه پیش‌بینی شد و در ادامه نیز به‌منظور بررسی تعیین جایگاه آن در گروه ژن‌های پروتئاز، همولوژی و فیلوژنتیکی ژن همسانه شده نیز انجام شد.

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

مواد و روش‌ها

باکتری *Bacillus licheniformis* PTCC ۱۷۲۱ به‌صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (http://ptcc.irost.org) خریداری شد. به‌منظور طراحی پرایمر توالی مربوط به ژن سرین پروتئاز از بانک ژنی (National Center for Biotechnology Information) NCBI استخراج شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Oligo ver ۷ انجام شد؛ سپس اختصاصیت توالی‌های طراحی شده با کمک نرم‌افزار primer Blast بررسی شد. آغازگر رفت و برگشت به گونه‌ای طراحی شدند که به‌ترتیب جایگاه برشی آنزیم *Eco*RI و *Hin*DIII در ابتدای آن‌ها قرار گیرد. به‌علاوه در ابتدای هر دو آغازگر توالی‌هایی اضافه شد تا در زمان تکثیر، اتصال DNA پلیمراز را تسهیل کند (جدول ۱). توالی آغازگرهای طراحی شده، جهت سنتز به شرکت Metabion آلمان ارسال شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

نام آغازگر	توالی آغازگر
sp1371f	ACGGAATTCATGGATTTTAGACGCGATG
sp1371r	CTCAAGCTTTATTTATGATTTGCTTTTCGCAAG

پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از آنزیم لیزوزیم، کمیت و کیفیت آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed-UVD3200، انگلستان) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. واکنش PCR بر روی DNA استخراجی با استفاده از *Pfu* polymerase (fermentas) و پرایمرها در دستگاه Eppendorf Mastercycler Gradient برای ۳۵ سیکل انجام شد. شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از خالص‌سازی محصول PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک Bioneer، اتصال میان ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pTG19-T با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Takara) به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محصول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد اشرشیاکلای (*Escherichia coli*) سویه DH5α انتقال داده شد. در مرحله بعد باکتری روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-gal، به‌منظور انجام آزمون سفید – آبی کشت داده شده و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعدادی کلونی سفید به‌عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب و مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفت. در نهایت، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی با استفاده SDS انجام گرفته (Birnboim and Doly 1979) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*DIII مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌یابی DNA پلاسمیدی حاوی قطعه نوترکیب توسط شرکت Bioneer کره جنوبی و با استفاده از آغازگر پروموتر باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت انجام شد. پلاسمیدهای pTG19-T-htrB و pET41a (+) به صورت جداگانه با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*DIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و ژن مربوط به *htrB* در پلاسمید pET41a (+) همسانه‌سازی شد و صحت همسانه‌سازی مورد بررسی قرار گرفت.

توالی نوکلئوتیدی حاصل از فرایند توالی‌یابی با استفاده از برنامه Translate مورد ترجمه قرار گرفته و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam، ProtScale، TMHMM و Signalp (موجود در تارنمای https://www.expasy.org/proteomics) بررسی شد. هم‌چنین پیش‌بینی موقعیت زیر سلولی این پروتئین با استفاده از سه برنامه ترکیبی TargetP (Emanuelsson et al. 2007)، iPSORT (Bannai et al. 2002) و YLOC (Briesemeister et al. 2010) انجام گرفت. بررسی امکان وجود پیوند دی سولفیدی توسط پایگاه اینترنتی DISULFIND به نشانی http://disulfind.dsi.unifi.it/ انجام شد. امکان محلول بودن پروتئین پس از بیان در باکتری اشرشیاکلای نیز توسط برنامه SCRATCH (موجود در تارنمای http://scratch.proteomics.ics.uci.edu) و سرور آنلاین

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

Recombinant Protein Solubility Prediction به نشانی http://www.biotech.ou.edu بررسی شد. توالی‌های حفاظت شده و دومین‌های موجود در این پروتئین با برنامه‌های ScanProsite (http://prosite.expasy.org/scanprosite)، supfam (http://supfam.org) و Pfam (http://pfam.xfam.org) بررسی شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل پروتئاز مورد مطالعه با سایر پروتئازها از بانک اطلاعاتی MEROPS استفاده شد (Rawlings et al. 2008). توالی اسیدآمینه به‌دست آمده از Translate به‌منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای همردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول شماره ۲) و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ویرایش ۵/۲ و با استفاده از ماتریس‌های تشابه گوناگون ترسیم شد. درجه اعتبارسنجی گروه‌بندی‌های ایجاد شده با Bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد (Felsenstein 1985; Tamura et al. 2007). هم‌چنین به‌منظور آنالیز موتیف‌های مشترک موجود میان توالی‌های همردیف شده از سرور آنلاین MEME به نشانی http://meme-suite.org استفاده شد.

ساختارهای دوم و سوم پروتئین به‌وسیله SOPMA (Geourjon and Deleage 1995)، PHYRE2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index)، I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) و PyMOL (موجود در تارنمای https://www.pymol.org) تعیین شد. هم‌چنین RAPTORX (http://raptorx.uchicago.edu) ساختار سوم پروتئین مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Modeller 9V16 (Sali and Blundell 1993) و به روش چند الگویی مدل‌سازی شد. به‌منظور ارزیابی کیفیت پارامترهای ساختاری مدل‌های ترسیم شده از نرم‌افزاری به‌نام procheck (موجود در تارنمای https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES) برای ترسیم نمودار راماچاندران استفاده شد و در ادامه نیز Q-mean score (http://swissmodel.expasy.org/qmean) و Z-score (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) مدل‌ها محاسبه شد (Benkert et al. 2009). علاوه بر موارد فوق، از امتیاز C (C-score) برای تخمین کیفیت مدل‌های پیش‌بینی شده توسط I-TASSER نیز استفاده شد.

جدول ۲- توالی‌های پروتئینی مورد استفاده برای ساخت درخت فیلوژنتیکی

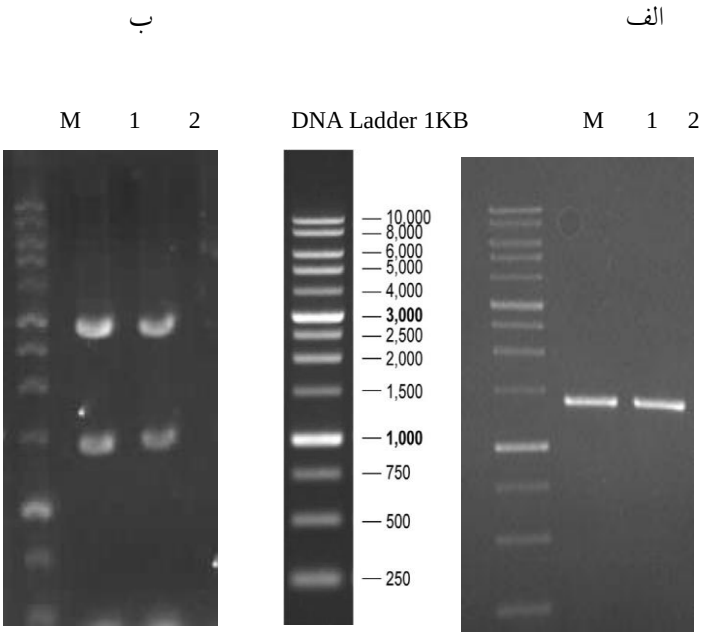
ردیف	جنس و گونه	نام اختصاصی ژن	نام اختصاصی پروتئین در پایگاه UNIPROT	شماره دسترسی	درصد تشابه پروتئین
۱	*B. licheniformis*	*htrB*	Q65F56	NC_006270	۱۰۰
۲	*subtilis.B*	HTRB_BACSU	Q9R9I1	Q9R9I1	۶۳/۵
۳	*pumilus.B*	BPUM_2952	A8FH89	A8FH89	۶۲/۷
۴	*gobiensis.B*	AM592_12510	A0A0M4FHQ8	A0A0M4FHQ8	۵۴
۵	*B. licheniformis*	htrA	A5A684	NC_006270	۵۴/۵
۶	*B. subtilis*	HTRA_BACSU	O34358	O34358	۵۳/۴
۷	*Escherichia coli*	*degQ*	P39099	4A8A_A	۳۵/۹۵
۸	*Escherichia coli*	*degP*	P0C0V0	2ZLE_A	۳۷/۹۲
۹	*Mycobacterium tuberculosis*	*htrA*	O06291	6IEO_A	۳۶/۹۱
۱۰	*Yersinia pestis*	*degS*	A0A384LFU1	5JD8_A	۳۵/۷۴
۱۱	*Legionella pneumophila*	*htrA*	Q5ZVV9	4YO1_A	۳۴/۴۷
۱۲	*Homo sapiens*	*HTRA1*	Q92743	3NZI_A	۳۴/۹۰
۱۳	*Legionella fallonii*	N/A	G1K3R2	3PV4_A	۳۶/۴۵
۱۴	*Escherichia coli*	degQ	P39099	3STJ_A	۳۶/۳۱
۱۵	*Arabidopsis thaliana*	*DEGP1*	O22609	3QO6	۴۱/۸۰

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

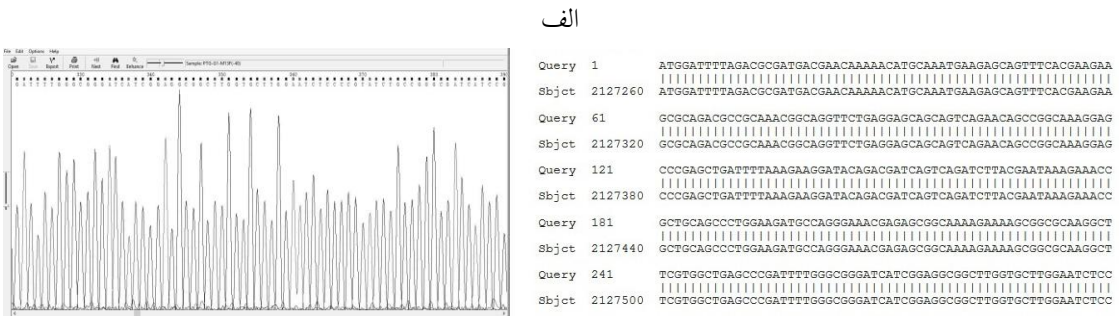
نتایج و بحث

جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی توالی آمینواسیدی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئین به‌دست آمده:

پس از استخراج DNA باکتریایی، ژن رمزکننده *htrB* با استفاده از PCR از باکتری *B. licheniformis* جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pTG19-T همسانه‌سازی شده و نتایج توالی‌یابی DNA نشان داد که موقعیت قرارگیری ژن رمزکننده *htrB*، بر روی جایگاه چندگانه همسانه‌سازی ناقل در جهت معمول می‌باشد که با نتایج به‌دست آمده از هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*DIII مطابقت داشت. انتقال ژن *htrB* به ناقل بیانی pET41a (+) با انجام واکنش هضم آنزیمی دوگانه و الحاق مجدد توسط آنزیم DNA لیگاز T4 انجام شد. فرایند همسانه‌سازی با انجام آزمون‌های PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت.

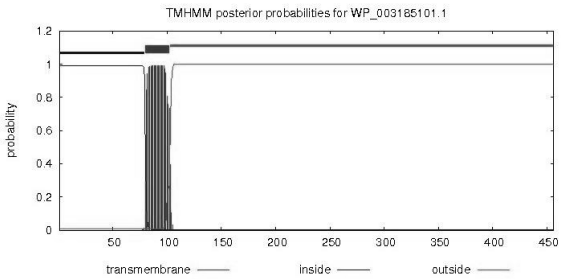


شکل ۱- الف) تکثیر ژن *htrB* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز M) نشانگر مولکولی، ۱ و ۲) نتایج حاصل از تکثیر ژن *htrB* به‌وسیله PCR ب) نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب M) نشانگر مولکولی، ۱ و ۲) پلاسمید نوترکیب هضم شده با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*DIII

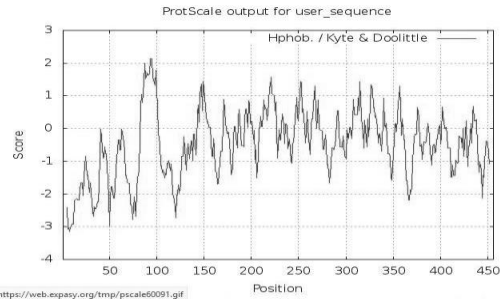


[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

ب



ج



شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی و شاخص‌های TMHMM و Hydropathic ژن htrB. الف) توالی‌یابی ژن همسانه‌سازی شده و همردیف‌سازی توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی ژن همسانه‌سازی شده با توالی نوکلئوتیدی موجود در پایگاه بانک ژنی NCBI. ب) بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین Q65F56 ج) بررسی بخش‌های درون سلولی، غشایی و برون سلولی پروتئین رمز کننده ژن htrB.

بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب بازخوانی DNA رمزکننده سرین پروتئاز *htrB* ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank به شماره دستیابی ۳۰۲۹۳۵۸، به طول ۱۳۷۱ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TAA خاتمه یافته و یک پروتئین با ۴۵۶ آمینواسید را رمز می‌کند (شکل ۲ الف). بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین ژن رمز کننده *htrB* با فرمول مولکولی $C_{2112}H_{3416}N_{586}O_{712}S_8$، به‌ترتیب برابر با ۴۸/۶۶ کیلو دالتون و ۴/۸۵ بوده و شاخص ناپایداری آن در لوله ۳۹/۵۷ می‌باشد که در رسته پروتئین‌های پایدار قرار می‌گیرد (Gasteiger et al. 2005). همچنین شاخص آلیفاتیک به‌عنوان یک عامل مهم به‌منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت ۸۰/۲۰ محاسبه شد که به میزان این شاخص در مورد آلکالین پروتئاز موجود در *B. amyloliquefaciens* SP1 و *B. safensis* بسیار نزدیک است (Elyasi far et al. Guleria et al. 2016;2020) و می‌توان پروتئین مورد مطالعه در این تحقیق را در گروه پروتئین‌های پایدار در برابر حرارت به‌شمار آورد (Ikai 1980). مقدار GRAVY یک پپتید یا پروتئین از مجموع مقدار هیروپاتی همه اسیدآمینه‌ها تقسیم بر تعداد اسید آمینه‌های توالی پروتئین به‌دست می‌آید که در مورد Q65F56 برابر با ۰/۴۸۰- است. مقدار منفی این شاخص نشان می‌دهد که پروتئین غیر قطبی است. نیمه عمر این توالی در یاخته‌های پستانداران ۳۰ ساعت، در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و در *E. coli* بیش از ده ساعت پیش‌بینی شد. شاخص Hydropathy محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolottle نشان داد که سرین پروتئاز مورد مطالعه آب گریز بوده (شکل ۲- ج) و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۶۶ اسید آمینه بار منفی داشتند؛ در حالی که تعداد کل اسید آمینه‌ها با بار مثبت ۴۸ بود (Kyte and Doolittle 1982). طبق اطلاعات دریافتی از پایگاه اینترنتی DISULFIND تنها یک سیستئین در این توالی مشاهده می‌شود و لذا باند دی سولفیدی تشکیل نخواهد شد و احتمال تشکیل و تجمع پروتئین نوترکیب در سلول میزبان به‌صورت اجسام اینکلوژن کاهش می‌یابد (Ciaccio and Laurence 2009; Cozzolino et al. 2008). بر اساس برآوردی که به‌وسیله برنامه SCRATCH صورت گرفته است؛ میزان محلول بودن این پروتئین پس از بیان دارای احتمالی برابر با ۰/۵۳۱۲۵ می‌باشد که این احتمال در سرور آنلاین Recombinant Protein Solubility Prediction به میزان ۰/۸ درنظر گرفته شده است و لذا می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین به‌صورت محلول بیان می‌شود. همچنین پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی این پروتئین با برنامه iPSORT، YLOC و TargetP نشان داد که محل فعالیت پروتئین مورد نظر درون سیتوپلاسم است. در طی بررسی انجام شده با استفاده از برنامه TMHMM در توالی این پروتئین یک دومین گذرنده از غشاء مشاهده شد؛ اما دومین خارج سلولی برای این پروتئین ترسیم نشده که بر این اساس احتمال داده می‌شود که این پروتئین یک پروتئین داخل سلولی متصل به غشا باشد. با توجه به اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله برنامه SMART ناحیه گذرنده از

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

غشا از آمینواسید ۸۰ تا ۱۰۲ این پروتئین را شامل می‌شود. بر اساس نتایج مشاهده شده در برنامه supfam، پروتئین مورد مطالعه متعلق به بالا خانواده Trypsin-like serine protease می‌باشد. نتایج حاصل از برنامه Pfam نشان داد که توالی مورد نظر دارای دو دومین Tyripsin_2 و PDZ_2 است. طبق برآورد برنامه ScanProsite دومین کاتالیتیکی PDZ در ناحیه آمینواسیدی بین ۳۵۸ تا ۴۴۲ واقع شده است. نتایج حاصل از بررسی پروتئین Q65F56 در پایگاه داده MEROPS نشان داد که این پروتئین دارای دو دومین S01.B81 و PDZ می‌باشد که جایگاه فعال در دومین S01.B81 شامل His^{189}، Asp^{219} و Ser^{300} است.

بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی پروتئین Q65F56 با سایر پروتئازها

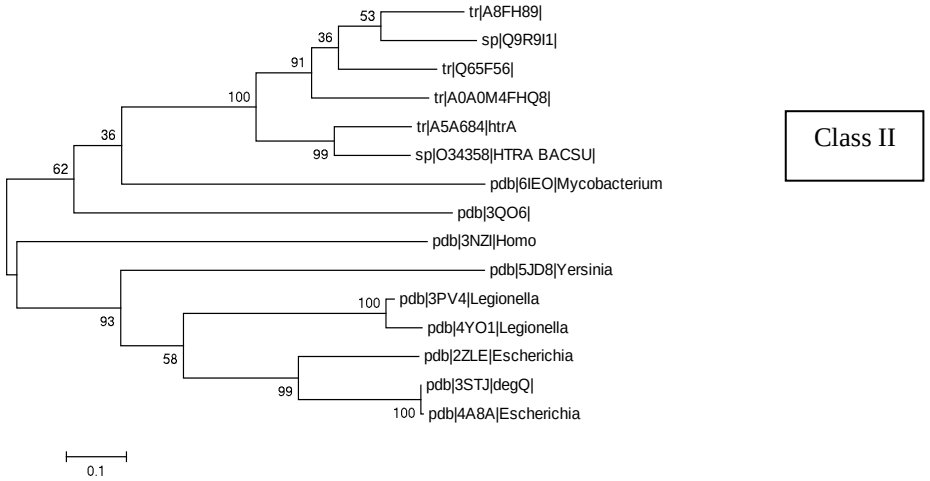
توالی پروتئینی به‌دست آمده از سرین پروتئاز *B. licheniformis* با پروتئازهای موجودات دیگر مورد مقایسه قرار گرفته و مشاهده شد که بالاترین تشابه را با پروتئین‌های Q9R9I1 موجود در *B. subtilis*، A8H89 متعلق به *B. pumilus* و A0A0M4FH88 مربوط به *B. gobensis* به‌ترتیب به میزان ۶۳/۵، ۶۲/۷ و ۵۴ درصد دارد. البته پروتئین کدشونده توسط *htrB* با پروتئین کد شونده *htrA* مربوط به همین باکتری نیز ۵۴ درصد شباهت را نشان داد. بررسی فیلوژنتیکی توالی پروتئینی Q65F56 با توالی‌های مربوط به پروتئازهای سایر موجودات با استفاده از نرم‌افزار Mega4 و به روش Neighbor Joining نشان داد که باکتری‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی به دو کلاس تقسیم‌بندی می‌شوند و در هر کلاس یکی از گروه‌های گرم منفی و یا گرم مثبت قرار می‌گیرند. بر این اساس پروتئازهای مربوط به جنس‌های *Ligionella*، *Yersinia*، و *Escherichia* که همگی گرم منفی بودند در یک کلاس قرار گرفتند و تمامی پروتئازهای مربوط به جنس باسیلوس در کلاس جداگانه‌ای تقسیم‌بندی شدند. البته پروتئازهای مربوط به آرابیدوپسیس، انسان و مایکوباکتریوم نیز میان این دو کلاس طبقه‌بندی شدند. بررسی‌های فیلوژنتیکی نشان داد که ژن همسانه‌سازی شده *htrB* متعلق به کلاس یک می‌باشد که در آن پروتئازهای مربوط به باکتری‌های گرم مثبت قرار دارند. سارین و همکاران[1] نیز پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز *apr46* متعلق به *B. licheniformis* درخت فیلوژنتیکی مربوط به این ژن را رسم کرده‌اند. گرچه در درخت ترسیم شده توسط این محققان پروتئاز مربوط به *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 بیشترین قرابت را با پروتئاز مورد مطالعه نشان داده است ؛ اما پروتئازهای مربوط به سایر باسیلوس‌ها نیز در نزدیکی پروتئاز مربوط به ژن *apr* قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده قرابت میان پروتئازهای مختلف جنس باسیلوس است (Sareen et al. 2005). در تمامی توالی‌های ذکر شده در جدول شماره ۲، توالی QTDA (گلوتامین، ترئونین، آسپارتیک اسید و آلانین) موجود در دومین موتیف حفاظت شده است. هم‌چنین سرین در اکثر نمونه‌های مورد استفاده در ترسیم درخت فیلوژنتیک به‌صورت حفاظت شده می‌باشد. حفاظت شدگی در مورد هیستیدین و آسپارتیک اسید موجود در این جایگاه فعال کاملاً مشاهده می‌شود. هم‌چنین در بررسی صورت گرفته توسط پایگاه اینترنتی Meme مشخص شد که هر سه اسید آمینه موجود در جایگاه فعال دومین S01.B81 به صوت حفاظت شده در میان پروتئازهای باسیلوس مورد بررسی وجود دارند و اسید آمینه آسپارتیک اسید و هیستیدین در موتیف شماره یک مشخص شده توسط این پایگاه قرار گرفته‌اند.

بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی پروتئین رمز شده توسط ژن *htrB*

بررسی ساختار دوم پروتئین Q65F56 با استفاده از برنامه SOPMA نشان داد که این پروتئین دارای ۱۰۳ آلفا هلیکس (۲۲/۵۹ درصد)، ۴۴/۷۴ درصد مارپیچ اتفاقی (۲۰۴ عدد)، ۳۷ دور β (۸/۱۱ درصد) می‌باشد. بیشترین ساختار دوم برای این پروتئین در نرم‌افزار PHYRE2، صفحات بتا با ۳۰ درصد از کل ساختارهای دوم و پس از آن آلفا هلیکس با فراوانی ۱۷ درصد در نظر گرفته شده است. میزان آلفا هلیکس پیش‌بینی شده در ساختار ثانویه برای پروتئین Q65F56 توسط نرم‌افزارPHYRE2 با میزان آلفا هلیکس serine protease htrA متعلق به گونه *Mycobacterium tuberculosis* (PDBI 6IEO) یکسان بوده و به میزان آلفا هلیکس protease Do-like 9 موجود در *Arabidopsis thaliana* (PDBI 5IL9) بسیار نزدیک است.

[1] Sareen et al

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



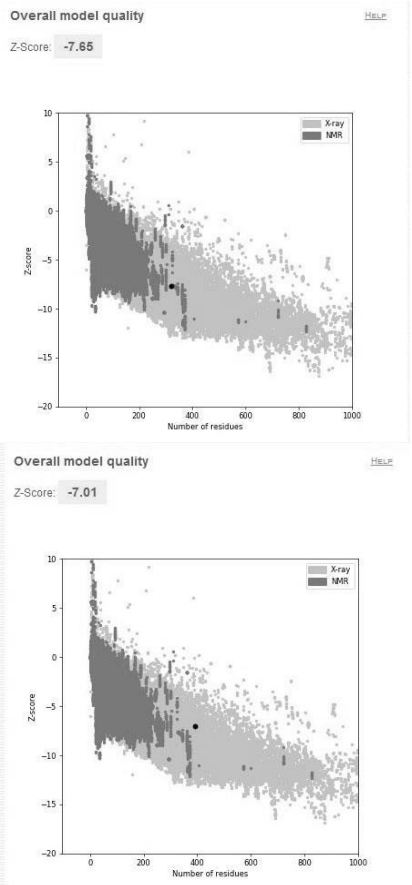
شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی رسم شده مربوط به پروتئازهای مختلف جنس باسیلوس و سایر موجودات با استفاده از نرم‌افزار MEGA5.2. نام اختصاصی ژن‌ها و پروتئین‌های موجود در این درخت فیلوژنتیکی در جدول ۲ آمده است و پروتئین کدشده توسط ژن *htrb* داخل کادر مشخص شده است



شکل ۴- همردیف‌سازی چندگانه ژن *htrB* با توالی‌های پروتئینی پروتئازهای مربوط به باسیلوس‌های دیگر با استفاده از نرم‌افزار clustalw. موتیف‌های ترسیم شده توسط سرور آنلاین MEME به‌ترتیب از شماره یک تا سه با کادر مشخص شده‌اند. شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی مورد استفاده در تهیه همردیف‌سازی چندگانه در جدول شماره ۲ آمده است.

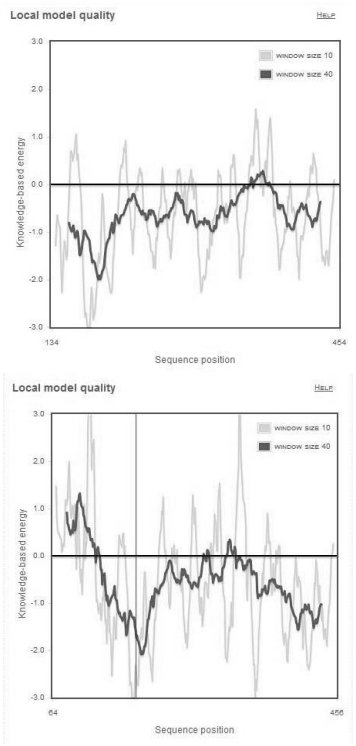
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

در مورد صفحات بتا نیز شباهت میان مقدار برآورد شده در پروتئین مورد مطالعه با ساختارهای ثانویه حاصل از کریستالوگرافی پروتئین‌های protease Do-like 9 موجود در *Arabidopsis thaliana* (PDBI 5IL9) و DegQ متعلق به *Legionella fallonii* (PDBI 3P) که دارای فعالیت سرین پروتئازی است، مشاهده شد. از میان مدل‌های پیشنهادی توسط نرم‌افزار I-TASSER، اولین ساختار پیشنهادی با C-score برابر با ۲/۷۲- و TM-score و RMSD مورد انتظار انتخاب شد (به‌ترتیب ۰/۱۴ ± ۰/۴۰ و ۸/۱۳ ± ۹/۳ Ä). پس از پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین مذکور با استفاده از نرم‌افزاهای PHYRE2، I-TASSER ،PyMOL، Modeller و RAPTORX این مدل‌ها با استفاده از نمودار راماچاندران مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مدل ارائه شده توسط RAPTORX ۸۲/۹ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب قرار گرفتند و این در حالی است که در مدل پیش‌بینی شده به‌وسیله PyMOL تنها ۵۱/۳ درصد از اسیدهای آمینه در این ناحیه قرار گرفته‌اند. از میان پنج مدل پیشنهادی توسط نرم‌افزار I-TASSER نیز بیشترین درصد اسیدهای آمینه مطلوب برابر با ۶۳/۲ درصد برای مدل شماره یک مشاهده شد. میزان اسیدهای آمینه‌های موجود در ناحیه مطلوب در تمودار راماچاندران مربوط به مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار PHYRE2 ۷۸/۸ درصد بود. لذا طبق برآورد نمودار راماچاندران، مدل ترسیمی به وسیله نرم‌افزار RAPTORX مدل مطلوب‌تری می‌باشد و مدل ارائه شده توسط PHYRE2 در مرتبه دوم قرار می‌گیرد. پس از ترسیم ساختار سه بعدی پروتئین رمز شده توسط *htrB* به‌وسیله نرم‌افزار Modeller 9V16 و با استفاده از ساختار کریستالی شش الگو موجود در پایگاه rcsb، نمودار راماچاندران مربوط به آن نیز ترسیم شد. در نمودار راماچاندران ترسیم شده برای این مدل ۷۸/۴ درصد از ریشه‌های اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب و ۱۷/۵ درصد نیز در ناحیه اضافی مجاز قرار گرفتند. پس از ارزیابی شاخص Q-mean مربوط به مدل‌های ترسیم شده، مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار PHYRE2 با احتساب Q- mean برابر با ۰/۶۷۵ با کیفیت‌ترین مدل برای پروتئین مذکور تشخیص داده شد که با بررسی Z-score مربوط به این مدل در مقایسه با سایر مدل‌ها نیز این نتیجه مورد تأیید قرار گرفت. مدل پیشنهادی توسط ابزار آنلاین RAPTORX نیز با داشتن Q-mean برابر با ۰/۶۰۶ مدلی قابل قبول محسوب می‌شود. ساختارهای پیش‌گویی شده خروجی نرم‌افزارهای PHYRE2 و RAPTORX توسط نرم‌افزار Prosa به‌عنوان بهترین مدل‌ها انتخاب شدند. میزان Z-score برای این دو مدل به‌ترتیب با ۷/۶۵- و ۷/۰۱- محاسبه شد که در بازه امتیازاتی است که به‌طور معمول برای پروتئین‌هایی با اندازه‌های مشابه یافت می‌شود (شکل ۵). لذا می‌توان نتیجه گرفت دو مدل ترسیم شده توسط RAPTORX و PHYRE2 مدل‌های قابل اعتنایی بوده و ساختارهای ترسیم شده به ساختارهای تجربی نزدیک است. از سویی دیگر در این دو مدل باقی‌مانده‌های اسیدهای آمینه نیز مطابق آن چه در شکل ۶ مشاهده می‌شود اکثراً از سطح انرژی منفی برخوردار هستند.



شکل ۵- نقشه Z-score وبسایت Prosa. Z-score کیفیت کلی مدل را نشان می‌دهد و به‌وسیله کریستالوگرافی اشعه X (روشن) یا اسپکتروسکوپی NMR (تیره) با توجه به‌طول زنجیره‌های پروتئینی موجود در پایگاه PDB تعیین می‌شود. Z-score پروتئین Q65F56 به‌صورت یک نقطه بزرگ مشخص شده است.

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



شکل ۶- نمودار انرژی استخراج شده از سایت Prosa web مربوط به پروتئین Q65F56 مدل‌سازی شده توسط PHYRE2 و RAPTORX.

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی، تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *htrB* استخراج شده از *Bacillus licheniformis* انجام گرفت. به‌منظور بهبود عملکرد آنزیم‌ها در صنعت، شناخت توالی و خصوصیات مربوط به آنزیم‌های میکروبی جدید با استفاده از همسانه‌سازی و تکنولوژی DNA نوترکیب لازم می‌باشد. تاکنون پژوهشی به منظور توالی‌یابی، تعیین خصوصیات و بیان ژن سرین پروتئاز *htrB* صورت نگرفته است. طبق نتایج به‌دست آمده، سرین پروتئاز مورد مطالعه متعلق به سرین پروتئازهایی می‌باشد که شبیه به تریپسین عمل می‌کنند. ساختار این پروتئاز در مقایسه با ساختار سایر پروتئازهای صنعتی دارای ویژگی غیر معمول است. این پروتئازها در ساختار خود حداقل یک دومین PDZ دارند که در اتصال به انتهای کربوکسیل پروتئین‌های دیگر نقش دارد و آمینواسیدهای فعال در آن‌ها آسپارتیک اسید، هیستیدین و سرین هستند (Kim et al. 2003; Jiao et al. 2010). دومین PDZ به‌عنوان یک سایت آلوستریک آنزیم عمل می‌کند و پروتئاز را قادر می‌سازد تا پروتئین‌هایی با تاخوردگی اشتباه را تشخیص دهد (Sohn et al. 2009) و این امکان را فراهم سازد که از آن در صنعت و در شرایط نامطلوب استفاده شود. از سویی دیگر همان‌طور که مطالعات بیوانفورماتیکی نشان داد، آنزیم سرین پروتئاز مورد مطالعه علاوه بر این که در دسته آنزیم‌های پایدار قرار می‌گیرد؛ به‌صورت محلول در میزبان بیان خواهد شد و به‌صورت اجسام اینکلوژن تجمع پیدا نخواهد کرد که این مزایا موجب می‌شود که آنزیم مذکور به‌عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنعت در نظر گرفته شود.

منابع

Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. Bioinformatics 18:298–305.

Benkert P, Künzli M, Schwede T (2009). QMEAN server for protein model quality estimation. Nucleic Acids Research gkp322.

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic acid Research 7:1513-1525.

Briesemeister S, Rahnenführer J, Kohlbacher O (2010) Going from where to why-interpretable prediction of protein subcellular localization. Bioinformatics 26:1232-8.

Çalık P, Çalık G, Özdamar TH (2001) Bioprocess development for serine alkaline protease production: a review. Reviews in Chemical Engineering 17:1-62.

Chu WH (2007) Optimization of extracellular alkaline protease production from *Bacillus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34:241-245.

Ciaccio NA and Laurence JS (2009) Effects of disulfide bond formation and protein helicity on the aggregation of activating transcription factor 5. Molecular pharmaceutics 6:1205-1215.

Cozzolino M, Amori I, Pesaresi MG, Ferri A, Nencini M, Carrì MT (2008) Cysteine 111 affects aggregation and cytotoxicity of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Journal of Biological Chemistry 283:866-874.

Doddapaneni KK, Tatineni R, Rachcha S, Anabrolu N, Mangamoori LN (2009) Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*. Microbiological Research 164:383-390.

Elyasi Far B, Yari Khosroushahi A, Dilmaghani A (2020) In Silico Study of Alkaline Serine Protease and Production Optimization in Bacillus sp. Khoz1 Closed Bacillus safensis Isolated from Honey. Vol.:(0123456789)1 3International Journal of Peptide Research and Therapeutics 1-11.

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

Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. Nature Protein 2:953-971.
Felsenstein J (1985) Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-91.
Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.
Geourjon C, Deleage G (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Bioinformatics 11:681–4.
Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK (2016) Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. International Journal of Food Microbiology 232:134-143.
Gupta R, Beg QK, Khan S, Chahuan B (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Applied Microbiology and Biotechnology 60:381-95.
Hadjidj R, Badis A, Mechri S, Kamel E, Khelouia L, Annane R, Hattab ME, Jaouad B (2018) Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* K7A. International Journal of Biological Macromolecules 114:1033-1048.
Huang Q, Peng Y, Li X, Wang H, Zhang Y (2003) Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. Current microbiology 46:69-173.
Hyyryläinen HL, Bolhuis A, Darmon E, Muukkonen L, Koski P, Vitikainen M, Sarvas M, Pragai Z, Bron S, van Dijl JM, Kontinen VP (2001) A novel two-component regulatory system in *Bacillus subtilis* for the survival of severe secretion stress. Molecular Microbiology 41:1159-1172.
Ikai A (1980). Thermostability and aliphatic index of globular proteins. Journal of Biochemistry 88:1895–1898
Jacobs M, Elkiasson M, Uhlen M, Flock JI (1985) Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg *from Bacillus licheniformis*. Nucleic Acids Research 13:8913-27.
Jiao XD, Zhang M, Cheng S, Sun L (2010) Analysis of Edwardsiella tarda DegP, a serine protease and a protective immunogen. Fish and Shellfish Immunology 28:672-677.
Kaur I, Kocher GS, Gupta VK (2012) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Genefor an Alkaline Protease from *Bacillus circulans* MTCC 7906. Indian Journal of microbiology 52:630-637.
Kim DY, Kim DR, Ha SC, Lokanath NK, Lee CJ, Hwang HY, Kim KK (2003) Crystal structure of the protease domain of a heat-shock protein *HtrA* from Thermotoga maritima. Journal of Biological Chemistry 278:6543-6551.
Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157:105-32.
Lin X, Kelemen D, Miller ES, Shih JCH (1995) Nucleotide sequence and *Bacillus licheniformis* PWD-1. Applied and Environmental Microbiology 61:1469-74.
Lin S, Zhang M, Liu J, Jones GS (2015) Construction and application of recombinanat strain for the production of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. Journal of Bioscience and Bioengineering 119:284-288.
Nascimento WCAD, Martins MLL (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology 35:91-96.
Olajuyigbe FM, Ehiosun KI (2013) Production of thermostable and organic solvent tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. African Journal of Biotechnology 12:3341-3350.
Pastor MD, Lorda GS, Balatti A (2001) Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. Brazilian Journal of Microbiology 32:6-9.
Rani K, Rana R, Datt S (2012) Review on latest overview of proteases International Journal of Current Life Science S. 2:12-8.
Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ (2008) MEROPS: The peptidase database. Nucleic acids Research 36:320-325.
Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, Lopez de Leon A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, Olsen PB, Rasmussen MD, Andersen JT, Jørgensen PL, Larsen TS, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich SD, Berka RM (2004) Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. Genome Biology 5:1-12.
Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. Journal molecular of biology 234:779-815.
Sareen R, Bornscheuer UT, Mishra P (2005) Cloning, functional expression and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters 27:1901-1907.
Sohn J, Grant RA, Sauer RT (2009) OMP peptides activate the DegS stress-sensor protease by a relief of inhibition mechanism. Structure 17:1411-1421.
Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar, S (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
Ward OP, Fogarty WM (1983) Microbial enzymesand biotechnology. Applied Science 251-317.
Wells JA, Ferrari E, Henner DJ, Estell DA, Chen EY (1983) Cloning, sequencing and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Research 11:7911-29.

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