مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
صفحه ۱۵۱-۱۳۹

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

همسانه سازی و بیان ژن سلوبیوهیدرولاز *cel6B* در مخمر *Pichia pastoris*

Cloning and Expression of *cel6B* Cellobiohydrolase gene in *Pichia pastoris*

فهیمه حیدری قره‌سو[۱]، نسرین مشتاقی*[۲]، براتعلی مشکانی[۳]، سعید ملک‌زاده شفارودی[۲]

Heydari-Gharehsoo Fahimeh[1], Moshtaghi Nasrin*[2], Meshkani Baratali[3], Malekzade-Shafarudi Saeid[2]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی
۲- گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

1. MSC of Agricultureal Biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Iran
2. Biotechnology and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. Medical Biochemistry Department, Faculty of Medical, Mashhad University of Medical Sciences, Iran

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: nasrinmoshtagi@yahoo.com

(تاریخ دریافت:۹۷/۷/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۷)

چکیده

آنزیم Cel6B از باکتری *Thermobifidia fusca*، یک CBHII متعلق به خانوادهٔ بی سلولازهاست که بسیار مقاوم به حرارت است. به علت میزان پایین تولید این آنزیم در میزبان اولیه نمی‌توان از این میزبان برای تولید آنزیم در مقیاس صنعتی استفاده نمود. به منظور بیان این آنزیم در مخمر، ژن سلوبیوهیدرولاز موجود در سازهٔ PSZ143 با PCR تکثیر و به درون ناقل مخمری pPICZαA، همسانه‌سازی شد. سازهٔ نوترکیب حاوی ژن *cel6B* به باکتری *E. coli* Jm109 منتقل شده و باکتری‌های نوترکیب بر روی محیط کشت LB حاوی ۰/۵ µg/ml بلئومایسین، انتخاب شد. سازهٔ نوترکیب خطی شده، با استفاده از الکتروپوریشن به مخمر *Pichia pastoris* سویه‌های GS115 و KM71H منتقل شد. در نهایت بهترین غلظت متانول و بهترین روز بیان آنزیم نیز با روش DNS تعیین شد. نتایج نشان داد، بیشترین میزان فعالیت سلوبیوهیدرولاز در سویه‌های GS115 و KM71H و بر روی PC (پنبهٔ اسید فسفریک شده) در دمای ۵۰°C و به مدت ۱۶ ساعت، به ترتیب ۱/۹۸ و ۰/۴۷۵ U(µmol/min)/ml است. نمونهٔ مربوط به کلنی پر محصول سویهٔ GS115 بر روی ژل SDS-PAGE بارگزاری و بیان آنزیم تأیید شد و سپس نتایج بهترین غلظت متانول و بهترین روز بیان آنزیم با همین سویه، در روز چهارم بعد از القاء با ۳ درصد متانول (V/V) به‌دست آمد. عدم بهینه‌سازی کدون های ژن همسانه شده به پلاسمید مخمری باعث کاهش بیان و کاهش فعالیت سلوبیوهیدرولازی آن شد. مخمر پیشیا میزبان مناسبی برای بیان این آنزیم است که با بهینه‌سازی کدونهای توالی کدکنندهٔ این ژن، می‌توان بازدهی بیان را بهبود داد.

واژه‌های کلیدی

مخمر،
سلوبیوهیدرولاز،
فرآوری زیستی تلفیقی،
ژن cel6B

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

مقدمه

بیوماس لیگنوسلولزی به عنوان فراوان‌ترین ترکیب آلی بر روی زمین، می‌تواند با کمک آنزیم‌های سلولاز به سوختهای مایع نظیر بیواتانول تبدیل شود (Bayer *et al.*, 2007). هزینه‌های پیش‌تیمار و تولید آنزیم‌های سلولاز از میکروارگانیسم‌های سلولوتیک و نیز محدودیت‌های موجودات اتانولوژن طبیعی در هیدرولیز کامل پلی‌ساکاریدهای لیگنوسلولز از جمله موانع اصلی در تولید اتانول هستند (Foust *et al.*, 2008; La Grange *et al.*, 2010). از طرفی گلوکز و سلوبیوز مهارکننده‌های قوی در هیدرولیز آنزیمی سلولز هستند و ترکیب مراحل هیدرولیز و تخمیر که به طور معمول در مخمرها صورت می‌گیرد، به عنوان راهبردی در هیدرولیز موثر سلولز است. هدف نهایی یک مرحله فرآوری زیستی تلفیقی (CBP) تبدیل لیگنوسلولز به بیواتانول، بر اساس استفاده از یک یا چند میکروارگانیسم اتانولوژن طبیعی ترشح‌کنندهٔ آنزیم‌های سلولاز مانند مخمرها، است (Linger and Darzins, 2013). مهندسی ژنتیک می‌تواند نقش مهمی در جهت ساخت یک موجود CBP ایفا کند. چندین مخمر نوترکیب جهت هیدرولیز و تخمیر مستقیم سلولز بررسی شده‌اند از جمله *Pichia stipitis* (Agbogbo and Coward-Kelly, 2008)، *Candida shehatae* (Prior *et al.*, 1989)، *Pachysolen tannophilis* (Slininger *et al.*, 1987) و *Saccharomyces cerevisiae* (Van Zyl *et al.*, 2007). این میکروارگانیسم‌ها به‌طور طبیعی قادر به تخمیر گلوکز و زایلوز به اتانول هستند و نیز هریک دارای برخی از آنزیم‌های سلولاز یا همی‌سلولاز هستند. با این حال، به طور کلی تولید اتانول در این میکروارگانیسم‌ها کمتر از میزان مطلوب است.

هیدرولیز آنزیمی سلولز به مخلوطی از آنزیم‌های هیدرولیتیکی شامل اندوگلوکانازها، سلوبیوهیدرولازها و β گلوکوزیدازها نیاز دارد. سلوبیوهیدرولازها بر اساس سازوکار به دو گروه تقسیم می‌شوند. سلوبیوهیدرولازهای نوع یک (CBHI) با سازوکار حفظ‌کننده و سلوبیوهیدرولازهای نوع دو (CBHII) با سازوکار معکوس‌کنندهٔ کانفیگوراسیون که به ترتیب به انتهای احیاکننده و غیراحیاکنندهٔ زنجیرهٔ سلولز حمله می‌کنند (Teeri *et al.* 1998; Zhang and Lynd 2004). بر اساس روش CBP فعالیت سلوبیوهیدرولاز بیان شده در مخمر باید تقریبا ۲۰ تا ۱۲۰ بار بهبود یابد (Den Haan *et al.* 2007). سطح بیان پروتئین در *Pichia pastoris* ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر از *Saccharomyces cerevisia* است و پروتئین هترولوگ بیشتر کل پروتئین‌ها را در محیط‌کشت تشکیل می‌دهد و به علاوه Pichia به‌عنوان یک یوکاریوت توانایی انجام تغییرات پس از ترجمه را دارد و نیز دستورزی آسان و استفاده از آن ارزانتر و سریعتر است و بر خلاف *S. cerevisia* مستعد به هیپرگلیکوزیلاسیون پروتئین‌های هترولوگ نیست (Cregg *et al.* 2000) بنابراین یک سیستم مفید برای بیان سلوبیوهیدرولازها است.

ژن‌های کدکنندهٔ آنزیم سلولاز گیاه فلفل به نام‌های *cCel1* و *cCel2*، با موفقیت در مخمر *P. pastoris* بیان شدند که آنزیم‌های خالص شده فعالیت بالایی از خود نشان دادند (Ferrarese *et al.* 1998). اندوگلوکانازهای خنثی در صنایع نساجی به علت خواص برتر در مراحل پایانی الیاف جین، از جمله کاهش مراحل قبل از رنگ‌آمیزی و واکنش‌پذیری کم بهتر هستند. ژن اندو بتا ۱و۴ گلوکاناز (*celE*) از *Orpinomyces PC-2* در داخل مخمر *P. pastoris GS115* بیان شد، این آنزیم نوترکیب بیشترین فعالیت را در pH:6 و دمای ۴۵°C نشان داد، بنابراین یک اندوگلوکاناز خنثی مزوفیلیک بود (Jin *et al.* 2011).

سلوبیوهیدرولاز Cel6B از اکتینومیست گرمادوست *Thermobifidia fusca*، یک CBHII با وزن ۵۹/۶ KDa متعلق به خانواده B سلولازهاست که فعالیت کاتالیتیکی آن مشابه CBHII از *Trichoderma reesei* ولی بسیار مقاوم به حرارت بوده و محدوده pH بهینه آن گسترده و معادل ۷ است (Saloheimo *et al.* 1988). به علاوه نسبت به نوع قارچی، جایگاه فعال محصورتر و طویل‌تری دارد (Wu *et al.* 2013). به علت میزان پایین تولید آنزیم *cel6B* در میزبان اولیه، ویژگی‌های با ارزش این آنزیم و جذابیت مخمر پیشیا در تولید پروتئین‌های نوترکیب هدف این پژوهش نیز بررسی امکان تولید سلوبیوهیدرولاز *cel6B* از اکتینومیست *Thermobifidia fusca* در *P. pastoris* به صورت خارج سلولی و بررسی برخی ویژگی‌ها از جمله امکان افزایش سطح بیان به منظور استفاده از این آنزیم در صنایع است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگرها و تکثیر ژن *cel6B* برای همسانه‌سازی: طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Geneious و PrimerPremier از روی پلاسمید pSZ143 (اهدایی دکتر بی‌ویلسون از دانشگاه کرنل) انجام شد. قابل ذکر است که طراحی آغازگرها همزمان با بررسی چارچوب خواندن ژن *cel6B* توسط سیستم رونویسی مخمری و با نرم‌افزار Geneious انجام شد. با توجه به سایت‌های برشی در وکتور pPICZαA ، در دو آغازگر سایت‌های برشی دو آنزیم *EcoRI* و *XbaI* اضافه شد (جدول ۱). قطعهٔ ژنی سلوبیوهیدرولاز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با مخلوطی از آنزیمهای DNA تک پلیمراز و *Pfu* پلیمراز به نسبت ۲:۱ تکثیر یافت. برای این منظور، واکنش PCR با سیکل دمایی شامل مراحل، واسرشته‌سازی اولیه در دمای ^{o}C ۹۴ به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه تکراری شامل واسرشته‌سازی در دمای ^{o}C ۹۴ به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای ^{o}C ۶۷ به مدت ۵۰ ثانیه و بسط در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۳ دقیقه و در نهایت بسط نهایی در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه، انجام شد.

کلونینگ ژن *cel6B* در ناقل pTG19-T: TA کلونینگ با استفاده از ناقل کلونینگ شرکت ویوانتیس با نام PTG19-T انجام شد. ترکیب واکنش اتصال شامل، وکتور pTG19-T (۵۰ ng/µL) به میزان یک میکرولیتر ، قطعهٔ ژنی تخلیص شده به میزان یک میکرولیتر (۸۹ ng/µL) ، بافر ویژه آنزیم T4 (10X) به میزان یک میکرولیتر، T4 Ligase (۵U/µL) به میزان ۰/۳ میکرولیتر، آب مقطر دیونیزهٔ استریل ۶/۷ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش به مدت یک شب در ^{o}C۱۶ در انکوباتور نگهداری شد. سپس محصول اتصال به روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E. coli* DH5α منتقل شد. پس از استخراج پلاسمید وجود ژن *cel6B* با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* در وکتور pTG19-T تأیید شد. در نهایت الکتروفورز محصولات هضم بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

ساب کلونینگ ژن *cel6B* به درون ناقل pPICZαA: به منظور انتقال ژن سلوبیوهیدرولاز *cel6B* به درون ناقل مخمری و بیان آن در مخمر *P. pastoris*، ابتدا دو پلاسمید pPICZαA و pTG19-T نوترکیب با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* هضم شدند و پس از الکتروفورز، با کیت استخراج از ژل شرکت ویوانتیس تخلیص شدند. واکنش اتصال قطعهٔ ژنی سلوبیوهیدرولاز و ناقل pPICZαA با ترکیب قطعهٔ ژنی ۱۷۰۰ bp (۱۷/۱ ng/µL) به میزان ۵/۹ میکرولیتر، وکتور pPICZαA (۱۰ ng/µL) به میزان ۷/۲ میکرولیتر، بافر آنزیم T4 (10X) به میزان ۱/۵ میکرولیتر و آنزیم T4 Ligase (۵U/µL) به میزان ۰/۳ میکرولیتر انجام شد.

به دلیل اینکه زئوسین به میزان نمک و pH محیط کشت LB حساسیت زیاد دارد، بنابراین آنتی‌بیوتیک بلئومایسین برای انتخاب کلنی‌های حاوی پلاسمید pPICZαA نوترکیب استفاده شد. حداقل غلظت کشندهٔ بلئومایسین برای باکتری *E. coli* سویهٔ Jm109 به منظور انتخاب کلنی‌های دارای پلاسمید حاوی ژن *Sh ble* تعیین شد. بدین منظور غلظت‌های صفر (به عنوان شاهد)، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از بلئومایسین به یک میلی‌لیتر از محیط کشت مایع LB اضافه و ۱۰ میکرولیتر از کشت شبانهٔ سویهٔ Jm109 به هریک اضافه شد، سپس در $^{\circ}$C۳۷ به مدت ۱۶ ساعت در شیکر انکوباتور rpm ۱۵۰ قرار گرفت. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

انتخاب کلنی‌های نوترکیب بر روی ظروف LB دارای ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بلئومایسین انجام شد. استخراج پلاسمید از این کلنی‌ها به صورت دستی انجام شد (Sambrook 1989). از آنجایی که روش دستی استخراج پلاسمید (لیز قلیایی) ناخالصی زیادی داشت بنابراین با استفاده از کیت NC شرکت دنازیست آسیا، مجددا استخراج پلاسمید صورت گرفت. جهت تأیید نوترکیبی از واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی α-factor و AOX- ´ 3 استفاده شد (جدول ۱).

تراریزش ناقل pPICZαA به درون مخمر با الکتروپوریشن: برای تراریزش به مخمر، ابتدا ناقل نوترکیب با آنزیم *Pme*I خطی شد. ترکیب واکنش هضم آنزیمی شامل، ناقل نوترکیب pPICZαA (۷۶۱ ng/µL) به میزان ۱۰ میکرولیتر، بافر Blue 10X به میزان ۳ میکرولیتر، آنزیم *Pme*I (۵U/µL) به میزان ۰/۵ میکرولیتر و آب مقطر دیونیزه استریل به میزان ۱۶/۵ میکرولیتر

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

بود. پس از کنترل خطی شدن کامل ناقل با الکتروفورز، غیرفعال کردن آنزیم در ^{o}C ۶۵ انجام شد. سپس با روش رسوب‌دهی با استات سدیم و اتانول تخلیص شد. در نهایت ۱۰ میکروگرم از ناقل خطی شده و تخلیص شده برای تراریزش به سلول‌های مستعد مخمر *P. pastoris* (سویه‌های GS115 و KM71H) استفاده شد. ترانسفورماسیون با استفاده از دستگاه Gene Electroporator Biorad PulserXcell و تنظیمات C=25µf, Resistance=200 Ohm, V=20kv, Time constant= 5 miliseconds انجام شد (Invitrogen 1997). سپس چند کلنی برای سنجش بیان سلوبیوهیدرولاز، با سوبسترای پنبهٔ اسید فسفریک شده (PC) (Vuong and Wilson 2009) و روش DNS (Ghose 1987) ، انتخاب شد.

انتخاب سویه مخمر پرمحصول *cel6B*: از آنجایی که وکتور بیانی فاقد ori مخمری است بنابراین ترانسفورمانت های مخمری مقاوم به زئوسین تنها در صورتی قابل جداسازی‌اند که نوترکیبی بین پلاسمید و ژنوم Pichia رخ دهد. ترانسفورمانت‌های Pichia بعد از ۳ روز رشد از روی ظروف حاوی محیط‌کشت YPDS (دارای ۲ درصد پپتون، ۱ درصد عصاره مخمر، ۲ درصد دکستروز، 1M سوربیتول و ۲ درصد آگار) دارای µ۱۰۰ g/ml زئوسین انتخاب شدند. پروتئین rcel6B بیان شده، به دلیل وجود α-factor در انتهای N انتظار می‌رود که به خارج سلول مخمر هدایت شود (Invitrogen 1997). بنابراین انتخاب کلنی پرمحصول با اندازه‌گیری فعالیت سلوبیوهیدرولاز با استفاده از سوبسترای PC در مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰°C ، در محیط‌کشت صورت گرفت. هر کلنی در 2ml از محیط‌کشت BMGY (دارای ۲ درصد پپتون، ۱ درصدعصاره مخمر، 100mM پتاسیم فسفات pH 6.0، ۱.۳۴ درصد YNB، ۰.۰۰۰۰۱ درصد بیوتین و ۱ درصد گلیسرول) تلقیح شد. رشد تا 2-6 OD_{600} ادامه یافت (تقریبا ۱۶–۱۸ ساعت). سلول‌ها با سانتریفوژ در 3000 x g به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق برداشت شدند. رسوب سلولی سپس در 10ml محیط‌کشت تولیدی BMMY دارای ۰ و ۱ درصد متانول حل شد و برای حفظ القای پروتئین هر ۲۴ ساعت متانول تا غلظت نهایی ۱ درصد (v/v) به محیط‌کشت اضافه شد. نمونه‌ها در فاصله‌های زمانی منظم جهت تعیین فعالیت آنزیمی برداشت شدند و در نهایت کلنی با بیشترین فعالیت سلوبیوهیدرولاز، انتخاب و برای مراحل بعدی استفاده شد.

بهینه‌سازی بیان پروتئین در Pichia: به منظور بهینه‌سازی بیان، متانول با غلظت‌های ۱، ۳ و ۶ درصد (v/v) و به مدت ۵ روز برای انتخاب کلونی پرمحصول القاء شد. نمونه‌گیری هر ۲۴ ساعت انجام شد و به طور همزمان برای حفظ القائ بیان، متانول تا غلظت‌های گفته شده اضافه می‌شد. مقدار فعالیت سلوبیوهیدرولاز در محیط‌کشت BMMY بر روی PC ۰.۲۵ درصد برای ۱۶ ساعت در ^{o}C ۵۰ در 50mM سدیم استات (pH5.5) (NaoAc) اندازه گیری شد. قندهای احیا کننده نمونه ها با استفاده از معرف DNS (Ghose1987) و یک منحنی استاندارد سلوبیوز تعیین شدند (Vuong and Wilson 2009).

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Table 1. Sequence of primers used in this research

توالی الیگونوکلئوتیدی و نمایش محل برش اندونوکلئازی	کاربرد	آغازگر
5′-TCCATACGAATTCGCCGGCTGCTCG-3′	تکثیر کامل ژن *cel6B*	آغازگر رفت
5′-TCACTCCGTCTAGAAGAGGCGGGTA-3′	تکثیر کامل ژن *cel6B*	آغازگر برگشت
TACTATTGCCAGCATTGCTGC	تأیید نوترکیبی در pPICZαA	آغازگر α-factor-F
GCAAATGGCATTCTGACATCC	تأیید نوترکیبی در pPICZαA	آغازگر ۳′AOX1-R

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

نتایج و بحث

تکثیر ژن سلوبیوهیدرولاز *Cel6B* و کلونینگ ژن *cel6B* در ناقل pTG19-T

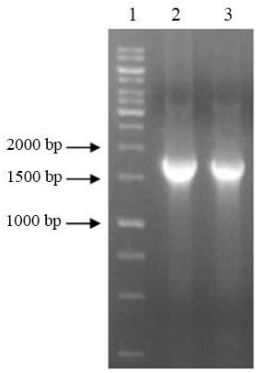
به منظور تکثیر ژن cel6B مخلوطی از DNA تک پلیمراز+ pfu پلیمراز استفاده شد. همان طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود، قطعهٔ تکثیر شده تقریبا اندازه‌ای معادل۱۶۸۰ جفت باز دارد که با اندازهٔ ژن cel6B سازگار است. سپس با استفاده از کیت آمبی‌کلین شرکت ویوانتیس، محصول PCR تخلیص شد.

محصول حاصل از مرحلهٔ اتصال قطعهٔ ژنی سلوبیوهیدرولاز با پلاسمید خطی pTG19-T، با استفاده از روش شوک حرارتی به داخل باکتری‌های مستعد شدهٔ DH5α ، تراریخته شد و سپس مخلوط حاصل بر روی ظروف LB آگار دارای آمپی‌سیلین کشت داده شد. پس از استخراج پلاسمید، با واکنش هضم، تأیید نوترکیبی قطعهٔ ژنی ۱۶۸۰ bp در پلاسمید pTG19-T با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* انجام شد (شکل ۱-ب).

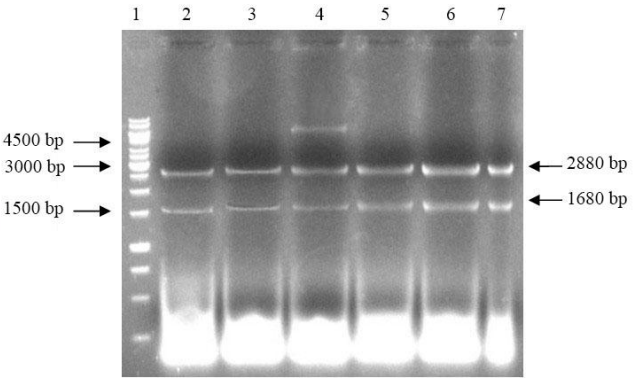
ساب کلونینگ ژن *cel6B* به درون ناقل pPICZαA

به منظور ساب‌کلون ژن cel6B به درون ناقل pPICZαA ، ابتدا واکنش‌های هضم دوگانهٔ همزمان دو پلاسمید pTG19-T حاوی قطعهٔ مورد نظر(چاهک ۲ شکل۲-الف) و پلاسمید pPICZαA حلقوی (چاهک ۴ شکل ۲-الف) با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* انجام و به ترتیب باندهای ۱۶۸۰ bp و ۳۵۳۰ bp از روی ژل جدا و تخلیص شد و واکنش اتصال آنها در حضور آنزیم T4 لیگاز به یکدیگر انجام شد. پس از تراریختگی باکتری‌های مستعد شدهٔ *E. coli* Jm109 با محصول واکنش اتصال (شکل ۲-ب)، تعدادی کلنی جهت استخراج پلاسمید از روی ظروف LB دارای ۰/۵μg/ml از آنتی‌بیوتیک بلئومایسین انتخاب شدند (حداقل غلظت کشندهٔ بلئومایسین در بخش بعد ذکر شده است). همان گونه که در شکل ۲- ج مشاهده می‌شود، کلنی‌های ۲و۵ فاقد پلاسمید هستند بنابراین به منظور تأیید نوترکیبی از بقیه کلنی‌هایی که دارای باند پلاسمیدی هستند، استفاده شد. وجود دو باند و باندهای RNA در تصویر ژل به ترتیب به دلیل کنفورماسیون DNA پلاسمید (بسته به کیفیت روش استخراج تا ۳ باند هم طبیعی است) و عدم استفاده از RNase در روش استخراج پلاسمید است (شکل ۲- ج).

الف (A)



ب (B)

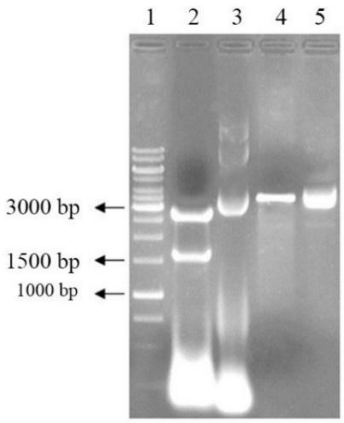


شکل ۱- الف: تکثیر ژن *cel6B* با آنزیم‌های پلیمراز. ۱: نشانگر اندازهٔ DNA. ۲: تکثیر ژن با آنزیم تک پلیمراز. ۳: تکثیر ژن با مخلوطی از DNA تک پلیمراز+ Pfu پلیمراز با نسبت ۲:۱. ب: واکنش هضم دوگانهٔ پلاسمیدهای کلنی‌های pTG19-T به منظور تأیید نوترکیبی. چاهک۱: نشانگر اندازهٔ DNA، چاهکهای ۲ تا ۷ به ترتیب محصولات هضم پلاسمیدی کلنی‌های ۱ تا ۶ با آنزیم‌های *Eco*RI و *Xba*I. چاهک ۴: واکنش هضم دوگانه که به‌طور کامل انجام نشده است.

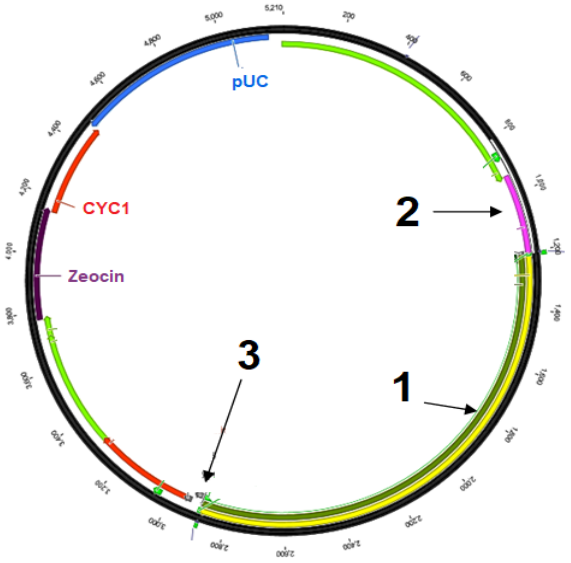
Figure 1. A: The amplification of *cel6B* gene with polymerase enzymes. Lane 1: DNA marker 1kb. Lane 2: The amplification of gene with *Taq* DNA polymerase. Lane 3: The amplification of gene with mixture of Taq+PFu polymerases. B: Recombinant confirmation by double digest reaction of pTG19-T colony. Lane 1: DNA marker 1kb. Lane 2-7 Digest products of plasmid from colonies 1-6 with *Eco*RI and *Xba*I. Lane 4: Double digest reaction that has not been fully performed.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

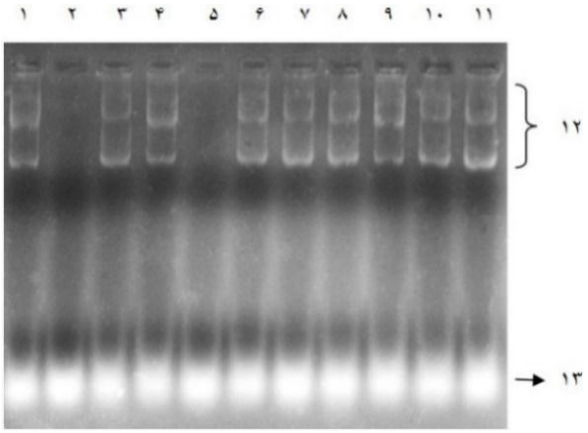
الف (A)



ب (B)



ج (C)



شکل ۲- الف: هضم پلاسمید با آنزیمهای *Eco*RI و *Xba*I . ۱: نشانگر 1kb، چاهک‌های ۲ و ۳ به ترتیب پلاسمیدهای هضم شده و هضم نشده نوترکیب pTG19-T، چاهکهای ۴ و ۵ به ترتیب پلاسمیدهای هضم شده و هضم نشده pPICZαA. ب: نقشه پلاسمید نوترکیب pPICZαA دارای ژن سلوبیوهیدرولاز. ژن *cel6B* (۱) پایین دست α-factor (۲) و بالا دست مناطق کدکنندهٔ C-myc و 6XHis tag (۳) همسانه شده است. ج: استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی از کلنی‌های *E. coli* Jm109 حاصل مرحلهٔ اتصال قطعهٔ ژنی *cel6B* به pPICZαA. چاهک‌های ۱ تا ۱۱ نمونه‌های استخراج شده، ۱۲: باندهای DNA ی پلاسمیدی، ۱۳: باندهای RNA.

Figure 2. A: Plasmid digestion by *Eco*RI and *Xba*I enzymes. Lane1: DNA marker 1kb. Lanes 2 and 3 digest and undigest of recombinant plasmids, respectively. Lanes 4 and 5 digest and undigest of pPICZαA plasmids, respectively. B: map of pPICZαA recombinant plasmid contains cellobiohydrolase gene. *cel6B* gene (1) was cloned in the downstream of α-factor (2) and upstream of coding regions of the C-myc and 6XHis tag (3). C: Plasmid extraction by Alkaline lysis method from Jm109 colonies resulted from ligation of the *cel6B* gene to pPICZαA. Lanes 1-11 samples of plasmid extraction. 12: Bands of plasmid DNA, 13: Bands of RNA.

تعیین غلظت کشندهٔ بلئومایسین برای باکتری *E. coli* Jm109

نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت ۰/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر تاثیر معنی‌داری در رشد باکتری در سطح معنی‌داری ۵ درصد نشان می‌دهد که این نتیجه با نتایج گاتیگنول و همکاران (۱۹۸۷) سازگار است که نشان دادند، حداقل غلظت کشندهٔ بلئومایسین در محیط‌کشت LB برای باکتری *E. coli* سویهٔ HB101، ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر است (Gatignol *et al.* 1987).

تأیید نوترکیبی ناقل pPICZαA

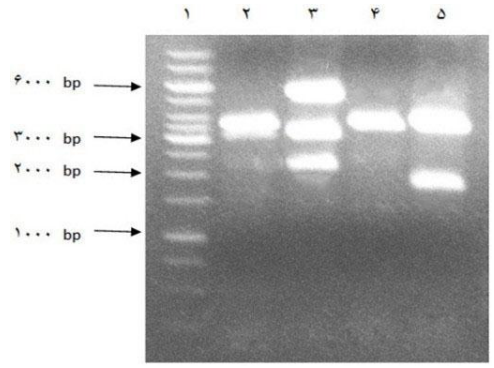
به منظور تأیید نوترکیبی، واکنش PCR با آغازگرهای α-factor و AOX- ´3 انجام شد. سپس، واکنش هضم دوگانه، با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* و نیز هضم با آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI* انجام شد (شکل ۳- الف). پلاسمید نوترکیب pPICZαA پس از هضم با *BamHI* و *EcoRI* باندهای ۳۱۲۴ و ۲۰۸۸ جفت باز را نشان داد و بخشی از آن فقط در یک سایت آنزیمی هضم شد و بنابراین باند با اندازهٔ ۵۲۱۰ جفت باز، معادل پلاسمید نوترکیب خطی شده است (چاهک ۳ شکل ۳- الف). در هضم دوگانهٔ پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* نیز دو باند با اندازه‌های ۳۵۳۰ و ۱۶۸۰ جفت باز مشاهده شد (چاهک ۵ شکل۳- الف). در نهایت توالی همسانه شده، با توالی‌یابی تأیید شد.

تراریزش مخمر با ناقل pPICZαA نوترکیب

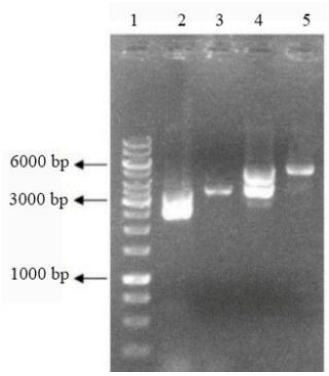
از آنجایی که الحاق با نوترکیبی همولوگوس تنها در لوکوس AOX1 اتفاق می‌افتد، بنابراین پلاسمیدی که در داخل ناحیه

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

الف (A)



ب (B)



شکل ۳- الف : واکنش‌های هضم دوگانهٔ پلاسمیدهای pPICZαA نوترکیب و غیر نوترکیب استخراج شده با کیت NC شرکت دنازیست آسیا. ۱: نشانگر اندازهٔ DNA ، ۲و۳: به ترتیب واکنش هضم دوگانه با آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI* پلاسمیدهای غیرنوترکیب و نوترکیب. ۴و۵: به ترتیب واکنش هضم دوگانه با آنزیم‌های *EcoRI* و *XbaI* پلاسمیدهای غیر نوترکیب و نوترکیب.
ب: هضم پلاسمیدهای نوترکیب و غیر نوترکیب pPICZαA با *PmeI*. ۱: نشانگر اندازهٔ DNA ، ۲ و ۳ : به ترتیب پلاسمید غیر نوترکیب هضم نشده و هضم شده، ۴و۵ : به ترتیب پلاسمید نوترکیب هضم نشده و هضم شده.

Figure 3. A: Double digest reactions of recombinant and non-recombinant pPICZαA plasmids was extracted by NC kit from Dena Zist Asia company. Lane1: DNA marker 1kb. 2 and 3: Double digest reaction with *BamHI* and *EcoRI* enzymes in non-recombinant and recombinant plasmids, respectively. 4 and 5: Double digest reaction with *EcoRI XbaI* enzymes in non-recombinant and recombinant plasmids, respectively. B: Digest of recombinant and non-recombinant of pPICZαA plasmid by *Pme*I. Lane1: DNA marker 1kb. 2 and 3 undigest and digest of non-recombinant plasmid, respectively. 4 and 5 undigest and digest of recombinant plasmid, respectively.

5′AOX خطی شده است، می‌تواند در منطقه 5′AOX میزبان، درج شود. بدین منظور مطابق با توصیه شرکت اینویتروژن از آنزیم *PmeI* که فاقد سایت برش در داخل قطعهٔ ژنی سلوبیوهیدرولاز است، استفاده شد. بنابراین پس از تأیید چارچوب بیانی ژن *cel6B*، به منظور انتقال به مخمر، ابتدا پلاسمید نوترکیب حلقوی pPICZαA با آنزیم *PmeI* خطی شد و با روش رسوبدهی با سدیم استات و اتانول تخلیص شد. سپس به منظور تأیید خطی شدن کامل پلاسمید، الکتروفورز شد (شکل ۳- ب). همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، پس از واکنش هضم یگانه، پلاسمید غیر نوترکیب (چاهک ۳ شکل ۳- ب) با اندازهٔ ۳۵۹۳bp کوچکتر از پلاسمید نوترکیب (چاهک ۵ شکل۳- ب) با اندازهٔ ۵۲۰۰ bp است.

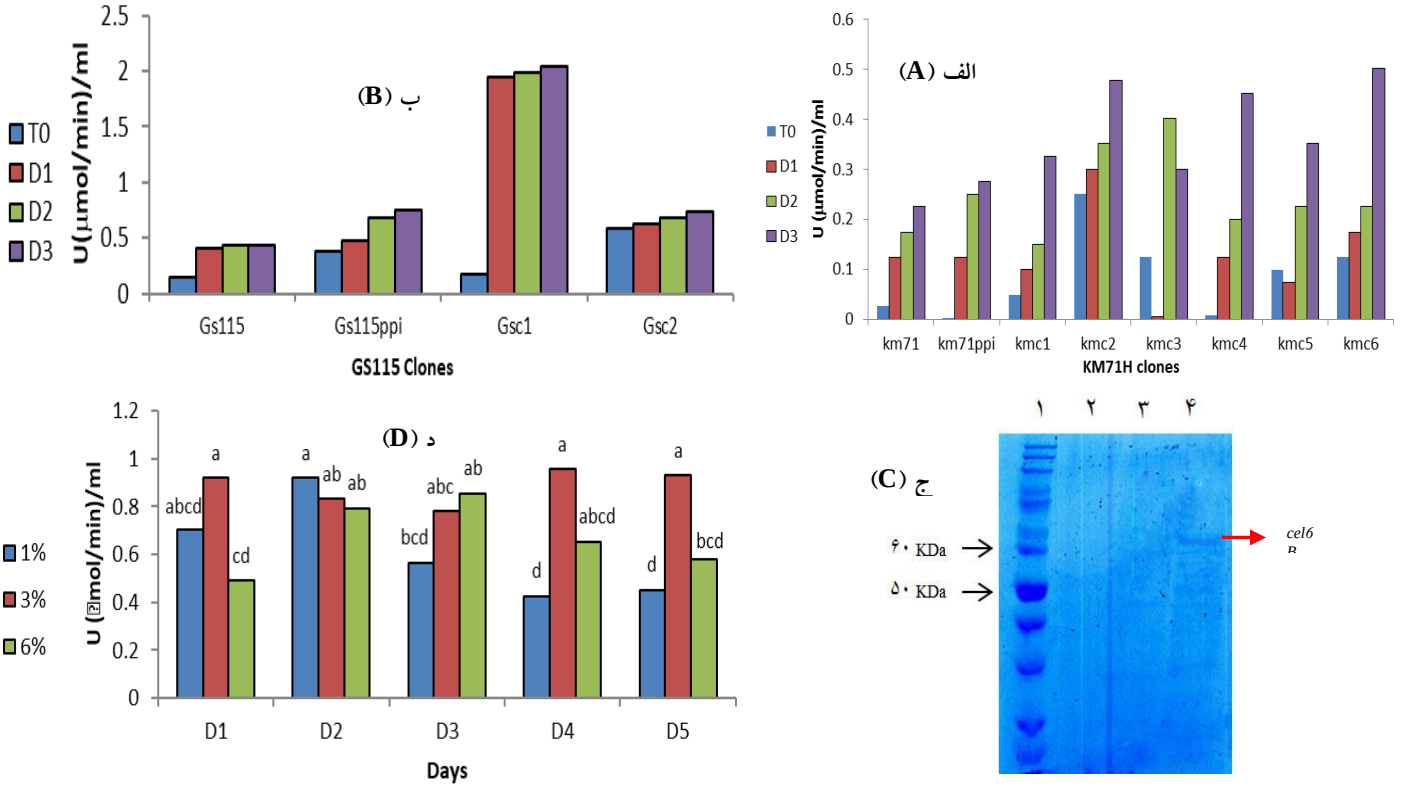
انتخاب کلنی پرمحصول

از آنجایی که منشأ همانندسازی مخمری در هیچ یک از پلاسمیدهای بیانی pPICZαA و pPICZ وجود ندارد بنابراین مخمرهای تراریختهٔ مقاوم به زئوسین، تنها در صورتی قابل جداسازی اند که نوترکیبی بین پلاسمید و ژنوم مخمر *Pichia* رخ دهد. ۶ و ۲ کلنی به ترتیب از سویه‌های KM71H و GS115 انتخاب شد. شکل‌های ۴- الف و ب به ترتیب فعالیتهای آنزیمی اندازه‌گیری شده از کلنی‌های سویهٔ KM71H و GS115 را نشان می‌دهند. باتوجه به حجم زیاد کار ناشی از انتخاب چند کلنی (نمونه‌گیری از دو نوع سویه همراه با کنترل ها و محدودیت شیکر انکوباتور) انجام تکرار وقت زیادی را می‌گرفت که خود باعث بروز خطای حین کار می‌شد، بنابراین فقط با یک کلنی بقیه مراحل بررسی شد. کلنی پر محصولی که انتخاب شد، مربوط به کلنی شمارهٔ یک سویهٔ GS115 بود، که بیشترین مقدار فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده بر حسب مقدار سلوبیوز تولید شده از این سویه، ۱/۹۸ (µmol/min)ml واحد است، در حالی که این میزان برای سویهٔ KM71H تنها مقدار ۰/۴۷۵(µmol/min)/ml واحد است. فعالیت آنزیم نوترکیب مربوط به کلنی‌های مورد بررسی بسیار کم بودند که به احتمال زیاد به علت میزان بیان کم این آنزیم در مخمر است، بنابراین تنها نمونهٔ مربوط به کلنی پر محصول (سویهٔ شمارهٔ یک GS115) بر روی ژل SDS-PAGE بارگزاری شد. به علاوه چون c-myc epitope و 6xHis tag تقریبا ۲/۵ کیلو دالتون به اندازهٔ پروتئین سلوبیوهیدرولاز نوترکیب اضافه می‌کند، بنابراین اندازهٔ آن تقریباً ۶۰ کیلو دالتون است (شکل ۴- ج). در چاهک ۴ در شکل ۴- ج پروتئینی با وزن تقریبا ۶۰ کیلودالتون به صورت باند کمرنگی دیده می‌شود که در

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

چاهک‌های دیگر که نمونه‌های کنترل هستند، چنین باندی مشاهده نمی‌شود.

تعیین بهترین غلظت متانول و بهترین روز برای القای بیان سلوبیوهیدرولاز در مخمر: با توجه به نوترکیب بودن سویه‌های مخمر پیچیا غلظت‌های ۱، ۳ و ۶ درصد متانول (v/v) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که غلظت ۳ درصد متانول برای بیان سلوبیوهیدرولاز، معنی‌دار است و نیز بیشترین میزان تولید آنزیم در روز چهارم مشاهده می‌شود (شکل ۴-د).



شکل ۴-الف: فعالیت آنزیمی کلنی‌های سویهٔ KM71H در طی ۳ روز (D1 ، D2 و D3) القاء با متانول یک درصد (v/v). KM71: بیانگر سویهٔ KM71H بدون پلاسمید، KM71ppi : بیانگر سویهٔ KM71H دارای پلاسمید غیرنوترکیب pPICZαA و کلنی‌های نوترکیب آن شامل Kmc1، Kmc2، Kmc3، Kmc4، Kmc5 و Kmc6. T0 : نمونه در زمان صفر (بدون متانول). آزمایش بدون تکرار انجام شد. ب: فعالیت آنزیمی کلنی‌های سویهٔ GS115 در طی ۳ روز (D1 ، D2 و D3) القاء با متانول یک درصد (v/v). Gs115: بیانگر سویه GS115 بدون پلاسمید، Gs115ppi : سویهٔ GS115 دارای پلاسمید غیر نوترکیب pPICZαA و کلنیهای نوترکیب آن شامل Gsc1 و Gsc2 است. T0: نمونه در زمان صفر (بدون متانول) را نشان می‌دهد. آزمایش بدون تکرار انجام شد. ج: بیان سلوبیوهیدرولاز *cel6B* به وسیلهٔ القاء با یک درصد متانول (v/v) به صورت خارج سلولی در *P. pastoris*. چاهک۱ : نشانگر اندازهٔ پروتئین، ۲: سویهٔ GS115 فاقد پلاسمید، ۳: سویهٔ GS115 دارای پلاسمید غیرنوترکیب pPICZαA ، ۴: سویهٔ GS115 دارای پلاسمید نوترکیب pPICZαA. **د:** میانگین فعالیت آنزیمی کلنی شمارهٔ یک سویهٔ GS115 در مدت ۵ روز القاء با غلظت‌های ۱، ۳ و ۶ درصد متانول (v/v). در سطح معنی‌داری ۵ درصد، غلظت ۳ درصد متانول در روز چهارم معنی‌دار است (تعداد تکرار آزمایش:۳ و انحراف معیار: ۰/۰۲۵).

Figure 4. A: Enzymatic activity of KM71H strain colonies within 3 days that induced by methanol 1percent (v/v). KM71: KM71H stain without plasmid, KM71ppi: KM71H strain contains non-recombinant plasmid of pPICZαA and recombinant colonies are Kmc1, Kmc2, Kmc3, Kmc4, Kmc5 and Kmc6. T0: sample in zero time (without methanol). The experiment was conducted without repetition. B: Enzymatic activity of GS115 strain colonies (induced by methanol 1percent) within 3 days. Gs115: Gs115 strain without plasmid, Gs115ppi: Gs115 strain contains non-recombinant plasmid of pPICZαA and recombinant colonies are Gsc1 and Gsc2. T0: sample in zero time (without methanol). The experiment was conducted without repetition. C: The activity average of colony number one of GS115 strain during 5 days (induced by 1, 3 and 6 percent methanol concentration) in signification level of 5 percent. The concentration of 3 percent of methanol is significant in the fourth day. D: Extracellular expression of Cel6B cellobiohydrolase (induction by methanol 1percent) in *P. pastoris*. Lane1: Protein marker, 2: GS115 strain without plasmid, 3: GS115 strain contains non-recombinant plasmid of pPICZαA**.** 4: GS115 strain contains recombinant plasmid of pPICZαA (Repeat number of test: 3 and Standard deviation: 0.025).

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

در مطالعه‌ای غلظت‌های ۰/۳، ۱ و ۳ درصد متانول بر روی تولید یک قطعه آنتی‌بادی تک زنجیره‌ای مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که افزایش غلظت متانول موجب القای کامل تولید پروتئین نوترکیب شد همچنین از تجمع یک قطعه فرآورده احتمالی که در طول کروماتوگرافی نمی‌تواند حذف شود، جلوگیری می‌شود (Khatri and Hoffmann 2006).

بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش فعالیت، فعالیت سلوبیوهیدرولازی که به شکل نوترکیب در مخمر ترشح شد، بر روی سوبسترای PC به طور نسبی کم بوده که به دلیل میزان بیان کم آن است. از آنجایی که ژن همسانه شده به پلاسمید مخمری از نظر کدونی بهینه نشده بود، این احتمال وجود داشت که بیان آن کم باشد.

فعالیت برخی از سلوبیوهیدرولازهایی که به‌طور موفقیت‌آمیز توسط *P. pastoris* بر روی انواع سوبستراها، از مولکول‌های کوچک مصنوعی تا اشکال آمورفوس و کریستالهٔ سلولز، تولید و ترشح شدند، شامل ژن‌های *T. reesei* CBH1 (GH7)، *Chaetomium thermophilum* CBH3 و *T. reesei* CBH2 (GH6) است (Den Haan *et al.* 2013). یک ویژگی کلی در میان بسیاری از گزارشات بیان هترولوگ CBHها در مخمر، تیترهای کم از CBHهای ترشح شده، است. با این حال مقادیر زیاد آن از ۰/۰۰۲ تا بیش از یک درصد کل پروتئین سلولی گزارش شده است (Van Zyl *et al.* 2007; Ilmén *et al.* 2011). این ویژگی همراه با فعالیت ویژه پایین CBHها بر روی سوبستراهای پلیمری است که باعث می‌شود بیان CBH یک فاکتور محدودکننده برای CBP با مخمر باشد (Lynd *et al.*, 2005). در طی یک پژوهش مقدار CBH1 مورد نیاز برای رشد فعال بر روی سلولز کریستالین محاسبه شد و مشخص شد که این مقدار با اصطلاحات پروتئین سلولی کل (Tcp) در *S. cerevisiae* ، ۱۰-۱ درصد از Tcp است (Den Haan *et al.* 2007). به تازگی بیان زیاد CBHها در *S. cerevisiae* برای نخستین بار گزارش شد (McBride et al. 2009; Ilmén et al. 2011). سطوح بیانی CBH که در این مطالعات حاصل شد بیش از ۴ درصد Tcp بود که این میزان برای رشد بر روی سلولز، در سرعت‌های مورد نیاز برای یک فرآیند صنعتی، کافی است (Olson *et al.* 2012). میزان بالا و متغیری از گلیکوزیلاسیون به‌طور پیوسته با CBHهای تولید شده در *S. cerevisiae* مشاهده شد. CBH1 از *Thermoascus aurantiacus*، *Talaromyces emersoni* ، *Neosatorya fischeri* و *T. reesei* و نیز CBH2 از *Chrysosporium lucknowense* ، *Acromonium cellulolyticus* و *T. reesei* ، همگی سطوح قابل توجهی از هیپرگلیکوزیلاسیون را نشان دادند (Hong *et al.* 2003؛ Den Haan *et al.* 2007؛ Ilmén *et al.* 2011). هر چند میزان متغیری از این CBHها تولید شد اما خصوصیات اصلی این آنزیم‌ها، از جمله فعالیت بر روی سوبستراهای سلولز کریستالین و به عنوان مثال مقاومت به حرارت آنزیم *T. aurantiacus* حفظ شد. همچنین نشان داده شد که در CBHهایی که به صورت هترولوگ در *P. pastoris* تولید می‌شوند، هیپرگلیکوزیلاسیون به میزان کمتری از *S. cerevisiae* رخ می‌دهد (Boer *et al.* 2000).

به تازگی یانگ و همکاران از سویهٔ مهندسی شدهٔ مخمر *S. cerevisiae* با قابلیت بیان ۳ ژن سلولاز که از سبوس گندم به عنوان منبع کربن تحت شرایط غوطه‌وری استفاده شده بود، جهت تولید اتانول استفاده کردند. به طوری که غلظت اتانول ۵۷/۸۶ برابر بیشتر از میزان تولید شده در سویهٔ وحشی (۰/۱۴ g/l) بود (Yang et. al. 2016). در پژوهشی دیگر ژن *CBH1* از *Trichoderma koningii* به طور موفقیت‌آمیزی همسانه و در *P. pastoris* بیان شد. به طوریکه فعالیت CMCase و آویسلاز سلولاز نوترکیب در سوپرناتانت به ترتیب ۱/۱۷۹۸ U/ml و U/ml ۰/۱۲۷۶ و دما و pH بهینه سلولاز بیان شده نیز به ترتیب ^{o}C ۵۰-۴۵ و ۵-۴/۵ بود (Lu et. al. 2018).

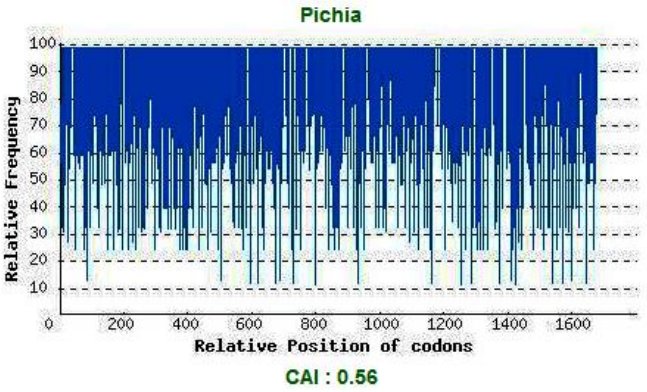
بیوماس لیگنوسلولزی فراوانترین ترکیب آلی بر روی زمین بوده و با توجه به چشم‌انداز اتمام سوختهای فسیلی و بازار متغیر انرژی، به منظور تامین سوخت مایع حمل و نقل بسیار مورد توجه است. از آنجایی که فرآورده های گلوکز و سلوبیوز مهارکننده‌های قوی در هیدرولیز آنزیمی سلولز هستند، ترکیب مراحل ساکاریفیکاسیون و تخمیر که معمولا در مخمرها صورت می‌گیرد، می‌تواند به عنوان راهبردی در هیدرولیز موثر سلولز و تبدیل آن

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]

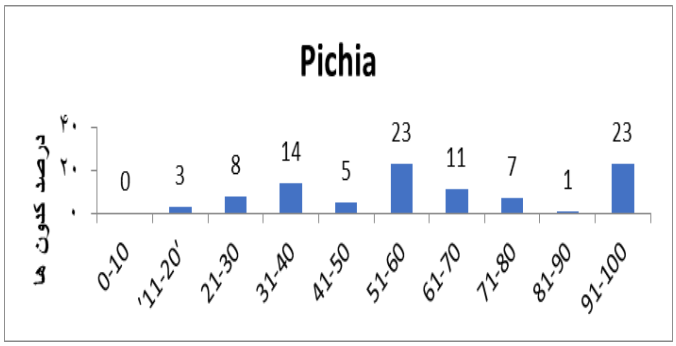
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

به اتانول باشد Bayer *et al.* 2007(). در مدت ۲۵ سال گذشته، پژوهشگران مختلفی بیان بسیاری از ژن‌های کدکنندهٔ سلولاز را در سویه‌های مخمری گزارش کردند. مطالعه حاضر هم در همین راستا انجام شد و جهت تولید سلوبیوهیدرولاز نوع دو مقاوم به حرارت از اکتینومیست *Thermobifidia fusca* با نام *cel6B* در *Pichia pastoris* به صورت خارج سلولی استفاده شد. به منظور بیان در مخمر، ژن سلوبیوهیدرولاز *cel6B* به درون ناقل مخصوص مخمری pPICZαA همسانه‌سازی شد. سازهٔ نوترکیب پس از خطی شدن، با استفاده از الکتروپوریشن به سویه‌های GS115 و KM71H مخمر *P. pastoris* منتقل شد. نتایج نشان داد، بیشترین میزان فعالیت سلوبیوهیدرولاز نوترکیب در محیط‌کشت، بر حسب مقدار سلوبیوز تولید شده در سویه‌های GS115 و KM71H ، بر روی PC در دمای $50\ ^{\circ}C$ و به مدت ۱۶ ساعت، به ترتیب ۱/۹۸ و ۰/۴۷۵ U (µmol/min)/ml است. در نهایت بهترین غلظت متانول و بهترین روز بیان آنزیم با همین سویه، در روز چهارم بعد از القاء با ۳ درصد متانول (V/V) به دست آمد. نتایج نشان داد که عدم بهینه‌سازی ژن همسانه شده به پلاسمید مخمری باعث کاهش بیان و کاهش فعالیت سلوبیوهیدرولازی آن شد. از آن جایی که توالی ژن *cel6B* برای بیان در یوکاریوت بهینه نشده بود، ممکن است توالی همسانه شده در وکتور مخمری حاوی کدون‌هایی باشد که به ندرت در *P. pastoris* استفاده می‌شود. به منظور بررسی کدون‌های نادر، توالی نوکلئوتیدی این ژن در سایت GenScript بررسی شد. شاخص انطباق کدونی (CAI: Codon Adaptation Index) احتمال بیان بالا را در موجود میزبان بیانی نشان می‌دهد و به نوعی همبستگی که بین ترجیح کدونی یک ژن و سطح بیان آن مشاهده می‌شود با این شاخص تعریف می‌شود. این مقیاس مصرف کدون، ناشی از یک مجموعهٔ 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 است، CAI=1 خواهد شد و مقادیر بیشتر از ۰/۸ برای بیان در میکروارگانیسم مورد نظر، خوب توصیف شده است. همان طور که در شکل۵ (الف) مشاهده می‌شود، ژن *cel6B* در *P. pastoris* دارای CAI=۰/۵۶ است و بنابراین انتظار می‌رود که ژن بهینه نشده، بیان کمی در این مخمر داشته باشد. شکل ۵ (ب) فراوانی مصرف کدون‌های ژن *cel6B* را در این مخمر نشان می‌دهد. مطابق پیشنهاد این سایت، مقدار ۱۰۰ برای کدون با بیشترین فراوانی مصرف برای آمینواسید در موجود بیانی است و کدون‌ها با مقادیر کمتر از ۳۰ احتمالا کارایی بیان را کاهش می‌دهند. بدین ترتیب ۱۱ درصد کدونها در *P. pastoris* فراوانی کمتری دارند و تنها ۲۳ درصد آنها بیشترین فراوانی را دارند.

(A) الف



(B) ب



شکل۵- الف: وضعیت شاخص انطباق کدونی (CAI) و ب: درصد فراوانی کدونها در قطعه کدکننده ژن *cel6B* بر حسب فراوانی کدونها در مخمر *Pichia pastoris* با استفاده از سایت Genscript . ۱۱ درصد کدونها در *P. pastoris* فراوانی کمتری دارند و تنها ۲۳ درصد آنها بیشترین فراوانی را دارند. محور افقی دسته بندی کدونها را بر حسب فراوانی در مخمر *P. pastoris* و محور عمودی فراوانی هر دسته از این کدونها را در قطعه کد کننده ژن *cel6B* نشان می‌دهد.

Figure 5. A: Codon Adaptation Index (CAI) and B**:** Frequency of codons in the *cel6B* gene encoding component based on the frequency of codons in the *Pichia pastoris* yeast using the Genscript site. 11 percent of codons in this *P. pastoris* are less frequent, and 23 percent are the most frequent. The horizontal axis shows that the codon classification according to the frequency of P. pastoris yeast and the vertical axis shows the

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

frequency of each of these codons in the segment of coding for the cel6B gene.

بر طبق شواهد بیان شده، مخمر پیشیا میزبان مناسبی برای بیان این آنزیم است که با بهینه‌سازی کدونهای توالی کدکنندهٔ ژن *cel6B* می‌توان بازدهی بیان را بهبود داد.

مقایسه تاثیرات بهینه‌سازی ژن و نوع پیشبر در بیان سلوبیوهیدرولاز II از *T. reesei* در *P. pastoris* نشان داد که تغییرات شناسایی شده در فعالیت، عمدتا بازتاب تغییرات واقعی در سطح بیان است که اهمیت بهینه‌سازی ژنی را نشان می‌دهد، چون طراحی اصولی ژن به ترجمه و تاخوردگی پروتئین‌های چند دومینی کمک می‌کند (Mellitzer *et al.* 2012). همچنین سطح بیان ممکن است تحت تاثیر تعداد کپی‌های ژن تلفیق شده و نیز لوکوس تلفیق شده، که بر سطح رونویسی ژن تلفیق شده اثر می‌گذارد، نیز باشد (Vassileva *et al.* 2001). در پژوهشی دیگر، ژنهای سنتزی کدکنندهٔ ۱۴ سلوبیوهیدرولاز I و ۱۰ سلوبیوهیدرولاز II با منشاء قارچی، که از نظر کدونی برای بیان در *S. cerevisiae* بهینه شده بودند، بیان شدند (Ilmén *et al.* 2011). تنوعات قابل توجهی در سطوح پروتئین‌های ترشح شده و فعالیت در سویه‌های نوترکیب مختلف مشاهده شد. به عنوان مثال، فعالیت‌های سویه‌های بیان کننده CBHI بر روی ۴-متیلومبلیفریل-β-D-لاکتوزید در بیش از دو تا سه گروه قرار گرفت. در پژوهشی دیگر، ژن‌های CBHI از *Trichoderma reesei*، *T. emersonii*، *Aspergillus sthermophilum*، *Chaetomium thermophilum* و *T. aurantiacus* بیان شد و یک سیستم رتبه بندی بر اساس شباهت فعالیت پیشنهاد شد (Heinzelman *et al.* 2010). سطوح ترشحی آنزیم، در این گزارش کم بود که احتمالا به علت تفاوتها در بهینه‌سازی کدون، سویه مورد استفاده، اثرات مختص سازه یا یک تفاوت در توالی‌های آمینواسیدی که در ابتدا انتخاب شدند، است. با توجه به اینکه شباهت توالی پروتئین‌های GH7 و GH6 تولید شده بیش از ۶۰ درصد بود و اینکه ژنها تحت کنترل پیشبرهای یکسانی و در پلاسمیدهای اپیزومی یکسان بیان شده بودند، سطح تنوع در فعالیت‌ها بین سویه‌ها تا حدودی تعجب آور بود.

منابع

Agbogbo, F.K. and Coward-Kelly, G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 30: 1515-1524.

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

Boer, H., Teeri, T.T. and Koivula, A. (2000). Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotechnology and Bioengineering*, 69: 486-494.

Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. and Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16: 23-52.

Den Haan, R., Kroukamp, H., van Zyl, J.-H.D. and van Zyl, W.H. (2013). Cellobiohydrolase secretion by yeast: current state and prospects for improvement. *Process Biochemistry*, 48: 1-12.

Den Haan, R., Mcbride, J.E., La Grange, D.C., Lynd, L.R. and Van Zyl, W.H. (2007). Functional expression of cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* towards one-step conversion of cellulose to ethanol. *Enzyme and microbial technology*, 40: 1291-1299.

Ferrarese, L., Trainotti, L., Gattolin, S., & Casadoro, G. (1998). Secretion, purification and activity of two recombinant pepper endo-β-1, 4-glucanases expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *FEBS letters*, *422*(1): 23-26.

Foust, T.D., Ibsen, K.N., Dayton, D.C., Hess, J.R. and Kenney, K.E. (2008). The biorefinery. In: Himmel, M.E.(Ed) Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy: Wiley-Blackwell, UK :7-37.

Gatignol, A., Baron, M. and Tiraby, G. (1987). Phleomycin resistance encoded by the ble gene from transposon Tn 5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 207: 342-348.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, *59*(2), 257-268.

Gusek, T.W. and Kinsella, J.E. (1987). Purification and characterization of the heat-stable serine proteinase from *Thermomonospora fusca YX*. *Biochemical journal*, 246: 511-517.

Heinzelman, P., Komor, R., Kanaan, A., Romero, P., Yu, X., Mohler, Snow, C. & Arnold, F. (2010). Efficient screening of fungal cellobiohydrolase class I enzymes for thermostabilizing sequence blocks by SCHEMA structure-guided recombination. *Protein Engineering, Design & Selection*, *23*(11): 871-880.

Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K. and Kumagai, H. (2003). Cloning of a gene encoding a thermo-stable endo-β-1, 4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Biotechnology Letters*, 25: 657-661.

Ilmén, M., Den Haan, R., Brevnova, E., McBride, J., Wiswall, E., Froehlich, A., Koivula, A., Voutilainen, S.P., Siika-Aho, M. and la Grange, D.C. (2011) .High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1): 30.

Invitrogen, I. M. (1997). Pichia Expression Kit, catalog no. *K1710-01*.

Jin, X., Meng, N., & Xia, L. M. (2011). Expression of an endo-β-1, 4-glucanase gene from *OrpinomycesPC-2* in *Pichia pastoris*. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(5): 3366-3380.

Khatri, N. K., & Hoffmann, F. (2006). Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen- limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, *93*(5): 871-879.

La Grange, D.C., Den Haan, R. and Van Zyl, W.H. (2010). Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 87: 1195-1208.

Linger, J.G. and Darzins, A. (2013) Consolidated bioprocessing in *Advanced Biofuels and Bioproducts* pp. 267-280, Springer.

Lu, M., Chang, J., Wang, P., Yin, Q., Dang, X., Gao, T., Lu, F. (2018). Study on Cellulase Gene Expressed in *Pichis pastoris* and Analyses of Its Biochemical Characters. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 6(7),43-52.

Lynd, L.R., Van Zyl, W.H., McBride, J.E. and Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 577-583.

McBride, J., Brevnova, E., Mellon, M., Froehlich, A., Deleault, K., Rajgarhia, V., & Voutilainen, S. (2009).Yeast expressing cellulases for simultaneous saccharification and fermentation using cellulose.*U.S. Patent Application 13/130,549*.

Mellitzer, A., Weis, R., Glieder, A., & Flicker, K. (2012). Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact*, *11*(61), 1-11.

Olson, D.G., McBride, J.E., Shaw, A.J. and Lynd, L.R. (2012). Recent progress in consolidated bioprocessing. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 396-405.

Prior, B., Kilian, S. and Du Preez, J. (1989). Fermentation of smallcap˜ D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry*, 24: 21-32.

Saloheimo, M.A., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeyssens, M., Tomme, P. and 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*: a Laboratory Manual. Cold Spring harbor laboratory press, 16-23.

Slininger, P., Bolen, P. and Kurtzman, C. (1987). *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 5-15.

Teeri, T. T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., & Jones, T. A. (1998). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?. *Biochemical Society Transactions*, *26*(2): 173-178.

Van Zyl, W.H., Lynd, L.R., den Haan, R. and McBride, J.E. (2007) Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* in *Biofuels* pp. 205-235, Springer.

Vassileva, A., Arora Chugh, D., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2001). Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, *21*(1):71-80.

Vuong, T. V., & Wilson, D. B. (2009). The absence of an identifiable single catalytic base residue in *Thermobifida fusca* exocellulase Cel6B. *FEBS Journal*, *276*(14): 3837-3845.

Wu, M., Bu, L., Vuong, T.V., Wilson, D.B., Crowley, M.F., Sandgren, M., Ståhlberg, J., Beckham, G.T. and 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*: jbc. M113. 502765.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]

Yang, P., Zhang, H., & Jiang, S. (2016). Construction of recombinant sestc *Saccharomyces cerevisiae* for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol production by in situ fermentation. 3 Biotech, 6(2), 192.

Zhang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, *88*(7): 797-824.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

Cloning and Expression of cel6B Cellobiohydrolase gene in *Pichia pastoris*

Heydari-Gharehsoo Fahimeh[1], Moshtaghi Nasrin[*2], Meshkani Baratali[3], Malekzade-Shafarudi Saeid[2]

1. MSC of Agricultureal Biotechnology, Ferdowsi university of Mashhad, Iran
2. Biotechnology and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. Medical Biochemistry Department, Faculty of Medical, Mashhad University of Medical Sciences, Iran

*Corresponding Author Email: nasrinmoshtagi@yahoo.com

Abstract

The Cel6B enzyme from *Thermobifidia fusca*, a CBHII, belongs to the family of cellulase B, which is highly resistant to heat. Due to the low level of production of this enzyme in this host, it cannot be used at industrial scale. For expression of cellobihydrolase in yeast, *cel6B* gene in pSZ143 plasmid was amplified by PCR and then was cloned in to pPICZαA vector. Recombinant construct contains *cel6B* gene transformed to *E. coli* Jm109 and recombinant were bacteria selected on LB medium with 0.5µg/ml Belleomycin. Recombinant plasmid was linearized and then transformed in Gs115 and KM71H yeast strains by electroporation method. Finally, the best concentration of methanol and the best day of expression of enzyme were determined by DNS method. The results in yeast indicated, the most CBH activity in GS115 and KM71H strains and on PC substrate in 50°C for 16h was 1.98 and 0.475 U (µmol/min)/ml, respectively. Only sample from high yield colony of GS115 strain for CBH expression was confirmed in SDS-PAGE and then the best methanol concentration and day for enzyme expression with same strain was obtained in 4th days after induction with three percent methanol. In this study, we did not optimize the codons of *cel6B* gene for expression in *P. pastoris*. Thus, its decreased expression level and cellobiohydrolase activity may be due to codon usage in Pichia.

Key words: Cellobihydrolase gene, *cel6B*, Consolidated Bioprocessing, yeast.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.2.3.4]