مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱۳، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳
صفحه ۲۰۳-۱۹۰

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2025
Volume 13, Number 2, Pages: 190-203

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.13.2.6

بهینه‌سازی بیان، خالص‌سازی و بررسی فعالیت آنزیم نوترکیب *Tth* DNA polymerase در *E.coli* BL21

Expression optimization, purification and activity of recombinant Tth DNA polymerase in *E. coli* BL21

الهام سلیمانی، کاملیا کتالانی، بهزاد شاهین، قربانعلی نعمت زاده

Elham Soleimani, Camellia Katalani, Behzad Shahin-Kaleybar, Ghorbanali Nematzadeh

پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
Genetics & Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT) Sari Agricultural Sciences and Natural Resource University, Tehran, Iran

*Corresponding Author, Email: solimanielham@yahoo.com
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰- تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۵/۲۴)
Received: 2025/01/25 | Accepted: 2025/03/10 | Published: 2025/08/15

چکیده

Abstract

The discovery of thermostable DNA polymerase from thermophilic microorganisms has been a significant advancement genetic engineering. *Tth* DNA polymerase (*Tth* pol) from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* is extensively used in genetic engineering. *Tth* pol possesses reverse transcriptase and polymerase activity, tolerance to PCR inhibitors and a higher extension rate compared to *Taq* DNA polymerase, making it an attractive enzyme for researchers to use. In this study, the gene sequence of *Tth* pol was isolated and transformed into *E.coli* DH5α after ligation to pTZ57R/T. The recombinant plasmid sequencing confirmed the correct insertion. *Tth* pol was then amplified with specific primers and ligated to pET28a. The recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21. Expression induction was performed with 0.8 and 1 mM IPTG in LB and modified minimal medium at 25 °C and 30 °C. Samples were taken at 2-hour intervals for up to 10 hours after induction. SDS PAGE of the samples revealed that the optimum condition for *Tth* pol expression was 30 °C, with 1 mM IPTG in modified minimal medium and 10 hours after induction. Due to the presence of a histidine tag in the recombinant *Tth* pol enzyme, nickel resin was used for purification. The purified *Tth* pol activity was assessed in PCR, and its reverse transcription activity was evaluated in cDNA synthesis. The results revealed that this enzyme has both activities. The findings from this study recommend optimizing cultivation conditions on a large scale, such as in a fermentor, to achieve higher expression of *Tth* pol.

Keywords: *Tth* DNA polymerase, Recombinant protein expression, Purification, Culture medium

رفرانس دهی این مقاله Citation

Soleimani E, Katalani C, Shahin-Kaleybar B, Nematzadeh G. (2025). Isolation and recombinant *Tth* DNA polymerase expression in *E. coli* BL21, purification and enzyme activity investigation. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (2): 190-203. Doi: 10.61882/gebsj.13.2.6
URL: http://gebsj.ir/article-1-511-en.html

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 2, 2025

خلاصه

کشف DNA پلی‌مرازهای مقاوم به حرارت از میکروارگانیسم‌های گرمادوست جهش بزرگی در مهندسی ژنتیک ایجاد کرد. آنزیم *Tth* DNA polymerase (*Tth* pol) از باکتری *Thermus thermophiles* جزو آنزیم‌های پرکاربرد در مهندسی ژنتیک است. خاصیت دوگانه پلیمرازی و رونوشت برداری معکوس، مقاومت به بازدارنده‌های PCR موجود در نمونه‌های زیستی، تکثیر سریع‌تر DNA در مقایسه با *Taq* DNA polymerase توجه محققان را به خود جلب کرده است. در این پژوهش، ژن کدکننده آنزیم *Tth* pol از باکتری *T.thermophilus* جدا شد، و با وکتور pTZ57R/T به باکتری *E.coli* DH5α منتقل شد. نتایج توالی‌یابی پلاسمیدهای نوترکیب صحت جداسازی ژن *Tth* pol را تأیید نمود. این ژن به وکتور بیانی pET28a الحاق شده و به میزبان بیانی *E.coli* BL21 منتقل شد. القای بیان با IPTG در غلظت‌های ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار، در دو محیط کشت حداقل تغییریافته و LB، و دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. نمونه‌برداری تا ۱۰ ساعت پس از القا و در فواصل زمانی ۲ ساعته ادامه یافت. الکترفورز نمونه‌های پروتئینی بیشینه بیان را در دمای ۳۰ درجه، غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG، محیط کشت حداقل تغییریافته و ۱۰ ساعت پس از القا نشان داد. به دلیل وجود دنباله هیستیدینی در *Tth* pol نوترکیب از رزین نیکل برای خالص‌سازی استفاده شد. پس از خالص‌سازی فعالیت پلیمرازی *Tth* pol در PCR و فعالیت رونوشت برداری معکوس آن در سنتز cDNA بررسی شد. نتایج نشان داد این آنزیم دارای هر دو ویژگی می‌باشد. با توجه به نتایج، بهینه‌سازی شرایط کشت در مقیاس وسیع‌تر مانند فرمانتور به منظور بیان بیشتر *Tth* pol پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: *Tth* DNA polymerase، بیان پروتئین نوترکیب، خالص‌سازی، محیط کشت

Introduction

مقدمه

کشف DNA پلی‌مرازهای مقاوم به حرارت در دهه ۸۰ میلادی موجب جهش بزرگی در پژوهش‌های مولکولی شد. این آنزیم‌ها نقش بسیار کلیدی در زمینه‌های مختلف پزشکی، کشاورزی، غذایی و... دارند. تا به امروز تعداد زیادی از این آنزیم‌ها از جنس‌های مختلفی از باکتری‌های گرمادوست مانند *Thermococcus*، *Thermus* و *Pyrococcus* جداسازی و خصوصیات آن تعیین شده است (Haki *et al.* 2003; Hamilton *et al.* 2001; Ghasemi *et al.* 2011; Terpe *et al.* 2013; Vieille *et al.* 2001). آنزیم *Tth* DNA polymerase (*Tth* pol) یکی از انواع DNA پلی‌مرازهای مقاوم به حرارت است که از باکتری گرمادوست *Thermus thermophilus* جدا شده است (Cava *et al.* 2009). یکی از ویژگی‌های این آنزیم که آن را از سایر DNA پلی‌مرازها متمایز می‌کند فعالیت دوگانه پلیمرازی است. *Tth* pol درحضور یون منیزیم پلیمریزاسیون DNA را کاتالیز می‌کند و در حضور یون منگنز قادر به رونوشت برداری معکوس از روی RNA و سنتز cDNA است و به همین دلیل می‌تواند در RT-PCR مورد استفاده قرار بگیرد. بررسی بیان ژن با روش RT-PCR از روش‌های پرکاربرد مولکولی در زمینه تشخیص یا درمان بیماری، کشاورزی، غذایی و.. است. همچنین برخی آنزیم‌های رونوشت بردار معکوس مانند AMV reverse transcriptase در حضور ترکیباتی هپارین غیرفعال می‌شوند. جداسازی ترکیبات بازدارنده مانند هپارین از نمونه‌ها، علاوه بر پرهزینه بودن موجب کاهش کیفیت نمونه در حین فرایند خالص‌سازی خواهد شد. آنزیم *Tth* pol مقاومت بیشتری نسبت به سایر آنزیم‌های رونوشت بردار در برابر این ترکیبات بازدارنده داشته و بنابراین می‌تواند در نمونه‌های حاوی ترکیبات بازدارنده نیز فعالیت نماید (Cai *et al*. 2018; Aye. *et al*. 2018; Eilert *et al.* 2009). یکی از چالش‌های سنتز cDNA، تشکیل ساختارهای ثانویه در RNA است. دمای بهینه فعالیت آنزیم‌های رونوشت بردار معکوس بین ۳۷ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد است (Perbal *et al.* 2008)، در این دما ساختارهای ثانویه RNA به طور کامل باز نشده و وجود این

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

ساختارهای ثانویه به‌خصوص در نمونه‌های RNA غنی از GC فرایند سنتز cDNA را محدود می‌کند. دمای بهینه فعالیت *Tth* pol ۷۰ درجه سانتی‌گراد است، در این دما تمام ساختارهای ثانویه RNA به طور کامل باز شده و بازده سنتز cDNA توسط این آنزیم افزایش خواهد یافت. (Moreno. *et al.* 2005; Pantazaki *et al.* 2002; Rittie *et al.* 2008)

گزارش‌های مختلف نشان داده است حضور ترکیباتی مانند لاکتوفرین در نمونه‌های انسانی از فعالیت DNA پلی‌مراز جلوگیری می‌کنند (Davalieva *et al*. 2010; Alsoud *et al*. 1998; Brandis *et al*. 2009). آنزیم *Tth* pol یکی از مقاوم‌ترین آنزیم‌ها در برابر بازدارندگی یون‌های سدیم و پتاسیم موجود در نمونه‌ها است (Podder *et al*. 1998; Pantazaki *et al.* 2002; Davalieva *et al.* 2010; Vielle *et al.* 2001). بررسی فعالیت ۱۱ آنزیم DNA پلیمراز مختلف نشان داد تنها *Tth* pol در برابر بازدارندگی یون‌های سدیم و پتاسیم موجود در نمونه‌های خون مقاوم بود (Alsould *et al.* 2000). سرعت پلیمریزاسیون DNA توسط *Tth* pol ۱۵۰۰ نوکلئوتید در هر دقیقه در دمای ۷٤ درجه سانتی‌گراد است (Aye *et al*. 2018; Maskun *et al.* 2022). قابلیت فعالیت دوگانه پلیمرازی، مقاومت بیشتر نسبت به سایر پلیمرازها در برابر بازدارنده‌های PCR و RT-PCR و سرعت بالاتر تکثیر نسبت به DNA پلیمرازهای مورد استفاده، *Tth* pol را کاندید مناسبی برای تولید و استفاده در آزمایشات مولکولی کرده است.

فناوری پروتئین نوترکیب، روش مناسبی برای تولید آنزیم در مقادیر زیاد است. در میان انواع سیستم‌های بیانی موجود برای تولید پروتئین نوترکیب، *Escherichia coli* یکی از جذاب‌ترین میزبان‌ها است. سرعت رشد بالا، ارزان بودن ترکیبات محیط کشت، بررسی ژنتیکی زیاد، در دسترس بودن تعداد زیادی ناقل بیانی و وجود انواع سویه‌های جهش یافته، این باکتری را گزینه مناسبی برای تولید پروتئین نوترکیب با سرعت و بازدهی بالا و صرفه اقتصادی کرده است. عوامل متعددی بر میزان و کیفیت بیان پروتئین نوترکیب در باکتری *E.coli* تأثیر می‌گذارند. دستیابی به بیان بالای پروتئین نوترکیب در *E.coli* به عوامل متعددی از قبیل سویه میزبان، نوع ناقل مورد استفاده، پروموتر، کدون‌های غالب، دما، شرایط کشت و ترکیبات محیط کشت بستگی دارد (Bouzas *et al.* 2006; Hartley *et al.* 2006; Rosano *et al.* 2014).

در میان ناقل‌های موجود در سیستم بیانی pET که توسط شرکت Novagen طراحی شده است یکی از قوی‌ترین سیستم‌ها جهت بیان پروتئین‌های نوترکیب است. در این ناقل‌ها ژن هدف توسط توالی‌های رونویسی و ترجمه باکتریوفاژ T7 کنترل می‌شود که قدرت آن ۸ مرتبه سریعتر از RNA پلی‌مراز *E.coli* است (Rezaei *et al.* 2020). به همین دلیل در این پژوهش از ناقل بیانی سری pET برای بیان ژن *Tth* pol استفاده شد.

ترکیب محیط کشت از دیگر عوامل تأثیرگذار بر میزان بیان پروتئین‌های نوترکیب است و بررسی‌های متعددی در مورد تأثیر هرکدام از این عوامل بر میزان تولید و حلالیت پروتئین‌های نوترکیب انجام شده است. نوع و ترکیب محیط کشت به طور مستقیم بر روی رشد سلول میزبان در حین سنتز پروتئین هدف تأثیر می‌گذارد. عواملی مانند منبع کربن و نیتروژن، یون‌ها و pH محیط می‌توانند رشد میزبان را کنترل نمایند (Cardos *et al.* 2020; Khalilvand et al. 2022). بنابراین استفاده از محیط کشت بهینه برای دستیابی به حداکثر مقدار پروتئین ضروری است. مطالعه حاضر باهدف جداسازی و بیان نوترکیب آنزیم *Tth* pol در *E.coli*، بررسی تأثیر ترکیب محیط کشت بر میزان بیان آنزیم، خالص‌سازی و در نهایت بررسی فعالیت پلیمرازی و رونوشت برداری معکوس آن انجام شده است.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

باکتری *T.thermophiles* به شماره ثبت PTCC 1593 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. یک تک کلونی از باکتری *T.thermophilus* به محیط کشت حاوی عصاره مخمر ۰/٤ درصد، نمک ۰/۲ درصد و proteose peptone ۰/۸ درصد منتقل شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۵۰ به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفت. از رسوب حاصل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

از رشد باکتری برای استخراج DNA ژنومی استفاده شد. استخراج DNA به روش Cheng و همکاران انجام شد (cheng. *et al.* 1993). برای جداسازی ژن *Tth* pol طراحی پرایمر بر اساس توالی ثبت شده در پایگاه NCBI، به شماره دسترسی D28878.1 و با استفاده از نرم‌افزار OLIGO انجام شد. اجزای واکنش PCR مورد استفاده برای تکثیر ژن *Tth* pol شامل ٤٠٠ نانوگرم DNA ژنومی، آغازگر رفت و برگشت با غلظت ۰/۵ میکرومولار (آغازگر رفت: Tth F:ATG CGG CCG CCT AAC CCT TGG CGG AAA GC، آغازگر برگشت: Tth R: AGG AAT TCA TGG AGG CGA TGC TTC CG)، dNTP با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، MgCl2 با غلظت ۲ میلی‌مولار و آنزیم *Taq* DNA polymerase به میزان ۱ واحد در نظر گرفته شد. برنامه PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل ٩٤ °C به مدت ۲دقیقه، دمای اتصال آغازگر ٥١ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۲/۵ دقیقه و یک دمای ۷۲ °C درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای ساخت نهایی قطعه هدف در نظر گرفته شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. برای خالص‌سازی محصول PCR از روی ژل آگارز از کیت خالص‌سازی DNA شرکت ترمو (K0691) استفاده شد. برای همسانه‌سازی محصول خالص شده از کیت کلونینگ T/A استفاده شد. همسانه‌سازی بر اساس دستورالعمل کیت شرکت ترمو (K1213) انجام شد. بر اساس دستورالعمل کیت، از پلاسمید pTZ57R/T برای ساخت سازه پلاسمیدی استفاده شد. این پلاسمید از سری پلاسمیدهایی است که دارای یک باز T چسبنده در دو انتهای توالی خود می‌باشند. استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase در PCR سبب اضافه شدن یک نوکلئوتید به انتهای ´۳ محصولات می‌شود که از همین نوکلئوتید اضافه شده می‌توان برای کلون کردن محصولات در پلاسمیدهای T/A استفاده نمود. پس از انجام واکنش اتصال بین قطعه خالص شده و پلاسمید pTZ57R/T، محصول واکنش به باکتری *E.coli* DH5α به روش شوک حرارتی منتقل شد. باکتری‌ها پس از ترانسفورماسیون در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۷۰ میلی‌گرم در لیتر کشت داده شدند. پس از تأیید ترانسفورماسیون با colony PCR، استخراج پلاسمید بر اساس دستورالعمل کیت K0503 از باکتری‌هایی که نتایج colony PCR مثبت داشتند انجام شد. پلاسمید حاوی ژن مورد نظر برای توالی یابی به شرکت فزاپژوه ارسال شد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit مورد بررسی قرار گرفت.

پس از بررسی نتایج توالی‌یابی و اطمینان از صحت توالی، به منظور ساخت سازه بیانی، تکثیر ژن با آنزیم *pfu* DNA polymerase انجام شد. قطعه تکثیر شده و پلاسمید بیانی pET28a به طور جداگانه با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Not*I برش داده شدند و خالص‌سازی محصول هضم آنزیمی بر روی ژل الکتروفورز انجام شد. واکنش اتصال با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase انجام شد و مخلوط واکنش اتصال به روش شوک حرارتی به باکتری *E.coli* سویه DH5α منتقل شد. محصول ترانسفورماسیون بر روی محیط کشت LB-agar حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۷۰ میلی‌گرم در لیتر کشت داده شدند. استخراج پلاسمید از کلونی‌هایی که نتایج colony PCR آن‌ها مثبت بود انجام شد. هضم پلاسمید با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Not*I ورود قطعه مورد نظر به پلاسمید را تأیید کرد. پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به با کتری بیانی *E.coli* Bl21 DE3 منتقل شد. آزمون colony PCR بر روی تعدادی از کلنی‌هایی که بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین با غلظت ۷۰ میلی‌گرم در لیتر رشد کرده بودند انجام شد. از کلون مثبت برای القای بیان استفاده شد. القای بیان در ۲ محیط کشت LB و حداقل انجام شد.

کشت شبانه از یک کلنی حاوی ژن مورد نظر در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انجام شد، و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه و دور rpm ۱۸۰ قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از کشت شبانه به ٤ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه LB منتقل شد و دمای ۳۷ درجه و دور ۱۸۰ درجه قرار گرفت. پس از رسیدن به کدورت باکتری به OD=0.6-0.8 ، ۱ میلی‌لیتر از کشت به عنوان شاهد قبل از القا جهت بررسی‌های بعدی برداشته شد. بیان *Tth* pol با افزودن IPTG با غلظت نهایی ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار القا شد(Radmard *et al.* 2024). هرکدام از نمونه‌هایی که ۲ غلظت مختلف القاگر به آن‌ها افزوده شد، پس از القا در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌برداری از هر ٤ ارلن در فواصل زمانی ۲ ساعته و تا ۱۲ ساعت ادامه یافت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

برای بیان *Tth* pol در محیط کشت حداقل تغییریافته (Sivashanmugam *et al.* 2009; Studier *et al*. 2005)، ۲۰۰ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری در محیط کشت LB در ٤ فالکون ۵۰ میلی‌لیتری رسوب داده شد، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب باکتری در ٤ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حداقل حل شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ قرار داده شد. رشد باکتری تا ۱ واحد افزایش میزان کدورت ادامه یافت، سپس القای بیان *Tth* pol با افزوردن IPTG با غلظت نهایی ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار انجام شد. ۲ ارلن حاوی IPTG، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۰ درجه و ۲ ارلن حاوی IPTG، ۰/۸ و ۱ میلی‌مولار در دمای ۲۵ درجه قرار داده شدند. نمونه‌برداری از هر ٤ ارلن در فواصل زمانی ۲ ساعته و تا ۱۲ ساعت ادامه یافت.

برای بررسی میزان بیان آنزیم، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه و دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل میلی‌لیتر بافر لیز کننده (Tris-HCl 10 mM pH:8, EDTA 0.1 mM, Tween 20 0.5%, NP40 0.5%, KCl 50 mM, PMSF 1 mM) افزوده شد. سلول‌ها بر روی یخ و طی فرایند سونیکاسیون تخریب شدند (٦ بار هر بار تکانه ۳۰ ثانیه و با استراحت ۳۰ ثانیه‌ایی، ۰/۷ cycle٪،amplitude۱۰۰). از آنجاییکه آنزیم *Tth* pol از باکتری گرمادوست *T.thermophiles* جداسازی شده است، به دماهای بالا مقاوم بوده و فعالیت خود را حفظ می‌کند. از این ویژگی در فرایند خالص‌سازی آنزیم استفاده شد. پس از سونیکاسیون، محلول به مدت ۱ ساعت در دمای ۷۰ درجه در بن ماری قرار داده شد. این مرحله باعث دناتوره شدن سایر پروتئین‌ها و تسهیل مراحل خالص‌سازی شد (Engeke *et al*. 1990; Yang *et al.* 2008). سپس ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و مایع رویی جمع‌آوری شد. بررسی بیان پروتئین با استفاده از الکتروفورز در ژل پلی‌آکریلامید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS- PAGE) به روش لاملی (۱۹۷۰) و با استفاده از سیستم بایورد (Biorad-mini protein Tetra Gel) انجام شد. با توجه به‌اندازه مورد انتظار پروتئین نوترکیب که ۹٤ کیلو دالتون است، از ژل جداکننده ۱۲ درصد (pH ۸/۸) و ژل متراکم کننده ٤ درصد (pH ٦/۸) استفاده شد.

خالص‌سازی *Tth* pol

پس از بررسی میزان بیان پروتئین با استفاده از SDS PAGE، خالص‌سازی نمونه‌هایی که بیان بیشتری داشتند انجام شد. به واسطه وجود دنباله هیستیدینی در *Tth* pol ، تخلیص پروتئین با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی (رزین NiNTA) انجام شد.

به دلیل وجود ترکیبات ناسازگار با رزین NiNTA در بافر لیزکننده‌ای که برای استخراج پروتئین استفاده شد، تعویض بافر با استفاده از اولترافیلتراسیون Amicon® Ultra centrifugal filters(C134281) انجام شد.پس از تعویض بافر، محلول حاصل به رزین اضافه و ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (می‌توان فالکون را در بین دو ژل یخی ساندویچ کرد و بر روی شیکر قرار داد) با دور ۷۰–۸۰ rpm قرار گرفت (Katalani *et al.* 2025).

پس از سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱ الی ۲ دقیقه، مقداری از مایع رویی به‌عنوان نمونه‌ی قبل از شستشو برای بررسی بر روی ژل آکریل جدا شد و بقیه محلول (تحت عنوان flow-throught) تا مشخص شدن نتایج الکتروفورز ژل، و اطمینان از اینکه تمام پروتئین محلول نوترکیب به رزین متصل شده‌اند، در ۲۰ °C– نگهداری شد. رزین حاصل از مرحله قبل که حالا متصل به پروتئین است به ترتیب با بافر شستشو (Na2HPO4 80 mM, NaCl 1 M, imidazole 20 mM, Tween 20 0.05%) شستشو داده شد. در مرحله آخر به‌منظور جدا کردن پروتئین‌های متصل به رزین نیکل، حدود ۲۵۰۰–۵۰۰ میکرو لیتر بافر الوشن اضافه کرده و نمونه‌ها به مدت حدود ٤۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار گرفت. و پس از سانتریفیوژ ، مایع رویی که حاوی آنزیم *Tth* pol خالص‌شده است بمنظور بررسی‌های بعدی جمع‌آوری شد (Katalani *et al.* 2025).

تعویض بافر: به منظور نگهداری طولانی مدت آنزیم و جلوگیری از تخریب آن توسط پروتئازها، پس از خالص‌سازی، محلول حاوی آنزیم به روش دیالیز تعویض شد. دیالیز آنزیم *Tth* pol به مدت ۱۲ ساعت در بافر نگهداری (Kcl 300 mM, DTT 1%, EDTA 0.1%, BSA 10

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

(mg/ml, Tris 10 mM, Glycerol 50%) با استفاده از کیسه دیالیز (Sigma) با کات آف ١٤ کیلو دالتون در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تعویض بافر ۲ بار تکرار شد. آنزیم محلول جهت بررسی‌های بعدی در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Katalani *et al.* 2025).

بررسی فعالیت *Tth* pol

برای بررسی فعالیت پلیمرازی *Tth* pol آزمون PCR بر روی DNA ژنومی گیاه توتون و با آغازگرهای اختصاصی ژن پرولین در این گیاه انجام شد. اجزای واکنش PCR مورد استفاده برای تکثیر بخشی از ژن پرولین، شامل ٤۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، آغازگر رفت و برگشت با غلظت ۰/۵ میکرومولار، dNTP با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، MgCl2 با غلظت ۲ میلی‌مولار و ۰/۵ میکرولیتر از آنزیم *Tth* pol خالص شده در نظر گرفته شد. برنامه PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل شامل ٩٤ °C به مدت ۲دقیقه، دمای اتصال آغازگر ٥٤ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و یک دمای ۷۲ °C درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای ساخت نهایی قطعه هدف در نظر گرفته شد.

برای بررسی فعالیت رونوشت برداری معکوس *Tth* pol، سنتز cDNA از روی RNA استخراج شده از گیاه توتون انجام شد. برنامه سنتز cDNA شامل ۱ میکروگرم RNA، یون منگنز ۱ میلی‌مولار، dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، آغازگر برگشت با غلظت ۲ میکرومولار، آنزیم *Tth* pol ۱ میکرولیتر در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. پس از اتمام سنتز cDNA، برنامه PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر در مخلوط واکنش ادامه یافت. از آنجایی که آنزیم *Tth* pol در حضور یون منگنز دارای فعالیت رونوشت برداری معکوس است، برای توقف فعالیت رونوشت برداری و شروع فعالیت پلیمرازی، با افزودن بافر کلاته کننده یون منگنز غیرفعال شد، و آزمون PCR با اضافه شدن آغازگر رفت و dNTP آغاز شد.

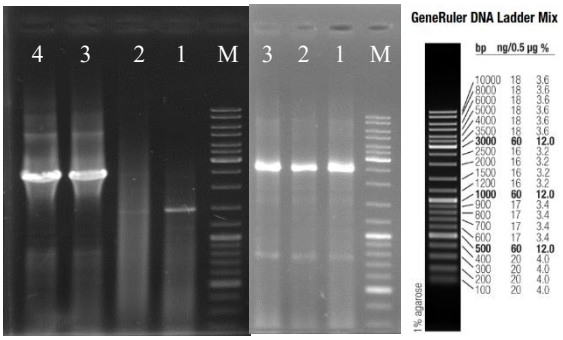
نتایج و بحث
Results and Discussion

جداسازی ژن *Tth* pol و ساخت سازه بیانی نوترکیب

مطالعه حاضر با هدف جداسازی و بیان نوترکیب ژن *Tth* pol در میزبان بیانی *E.coli* Bl21 DE3 انجام شد. همچنین سطوح مختلف دما، غلظت القاگر و ترکیب محیط کشت برای دستیابی به بالاترین میزان تولید پروتئین نوترکیب و در نهایت خالص‌سازی و بررسی عملکرد آنزیم نیز انجام شد. در مرحله جداسازی ژن، نتایج PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن هدف، منجر به تکثیر یک قطعه به طول ۲۵۰۲ نوکلئوتید شد (شکل ۱ الف).

پس از تراریختی باکتری با پلاسمید نوترکیب، کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب با colony PCR شناسایی و استخراج پلاسمید از آن‌ها انجام شد (شکل ۱ ب). پس از تعیین توالی پلاسمیدهای pTZ57/RT حاوی ژن *Tth* pol، مقایسه نتایج توالی‌یابی قطعه مورد نظر با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI توسط برنامه BLAST صحت ترادف مورد نظر را تأیید نمود (شکل ۲).

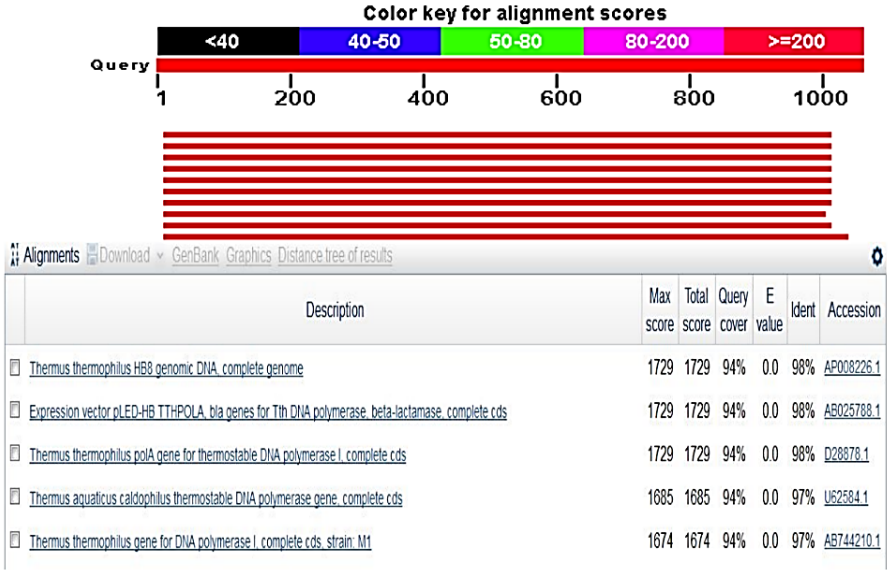
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]



ب الف

شکل ۱- الف) نتایج تکثیر ژن *Tth* pol از DNA ژنومی باکتری *T.thermophilus*، ۱، ۲ و ۳) محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *Tth* pol با آغازگرهای اختصاصی، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333). ب) ۱ و ۲) کنترل مثبت، ۳و ٤) محصول colony PCR باکتری *E.coli* DH5α با آغازگرهای اختصاصی، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333).

Fig 1. A) *Tth* pol gene amplification from *T.thermophilus* genomic DNA. 1, 2 & 3) PCR product with specific gene primers, M) Molecular weight marker (SM0333). B) 1 & 2)positive control, 3 & 4) colony PCR product after transformation to *E.coli* DH5α with gene specific primers, M) Molecular weight marker (SM0333).

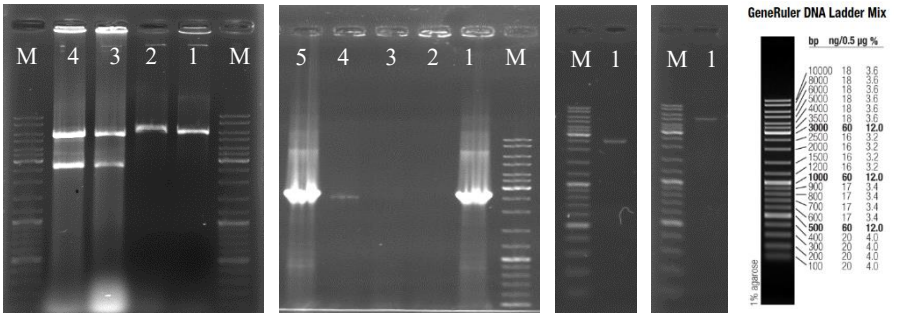


شکل ۲- نتایج حاصل از همترازی پلاسمید نوترکیب توالی‌یابی شده با استفاده از برنامه BLAST در پایگاه NCBI

Fig 2. The results were obtained by alignment of the sequence recombinant plasmid using BLAST program in the NCBI database.

به منظور ساخت سازه بیانی، از پلاسمید pET28a استفاده شد (شکل ۳ الف). تکثیر ژن *Tth* pol با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن و دارای جایگاه شناسایی آنزیم برشی *Eco*RI و *Not*I توسط آنزیم *pfu* DNA polymerase انجام شد (شکل ۳ ب). پس از ایجاد انتهای چسبنده با هضم آنزیمی در پلاسمید و محصول PCR، واکنش الحاق با استفاده از T4 DNA ligase صورت گرفت. مخلوط واکنش اتصال به روش شوک حرارتی به *E.coli* DH5α منتقل شد. پس از شناسایی کلون‌های نوترکیب با colony PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن، استخراج پلاسمید از این کلون‌ها انجام شد و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I صحت ورود ژن به پلاسمید بیانی را تأیید کرد (شکل ۳ ج و د). پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به میزبان بیانی *E.coli* BL21 DE3 منتقل شد. پس از شناسایی کلون‌های دریافت کننده پلاسمید نوترکیب با colony PCR توسط آغازگرهای اختصاصی ژن، این کلون‌ها برای القای بیان انتخاب شدند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]



شکل ۳- الف) نتیجه خالص‌سازی پلاسمید خطی pET28a از روی ژل آگارز پس از هضم با آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333). ب) ۱) نتیجه خالص‌سازی محصول PCR ژن *Tth* pol از روی ژل آگارز پس از هضم با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Not*I (با هدف ایجاد انتهاهای چسبنده در دو انتهای ژن)، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333). ج) ۱ و ۵) نتایج مثبت colony PCR پس از انتقال مخلوط واکنش اتصال به باکتری *E.coli* DH5α، ۲ و ۳) کنترل منفی، ٤) کنترل مثبت، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333). د) تأیید صحت ساختار پلاسمید نوترکیب pET28a/ *Tth* pol، ۱ و ۲) پلاسمید نوترکیب pET28a/ *Tth* pol قبل از هضم آنزیمی، ۳ و ٤) پلاسمید نوترکیب pET28a/ *Tth* pol پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I، باند بالا نشان‌دهنده پلاسمید خطی شده و باند پایین ژن *Tth* pol خارج شده از پلاسمید در اثر هضم آنزیمی است. M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333).

Fig 3. A) Purified pET28a plasmid digested with *Eco*RI & *Not*I. M) Molecular weight marker (SM0333). B) *Tth* PCR product digested with *Eco*RI & *Not*I, M) Molecular weight marker (SM0333). B) 1. Double digested PCR product after purification from gel agarose in order to generate sticky ends, M)) Molecular weight marker (SM0333). C) 1 & 5) Colony PCR product after transformation ligation product to *E.coli* DH5α, 2 & 3) Negative control, 4) Positive control M) Molecular weight marker (SM0333). D) confirmation Tth insertion to pET28a, 1&2) undigested recombinant plasmid, 3&4) reconbinnat plasmid after digestion with *Eco*RI & *Not*I, upper bond is plasmid backbone and lower bond in insert, M) Molecular weight marker (SM0333).

بیان آنزیم *Tth* pol

در این پژوهش، میزان بیان *Tth* pol در دو نوع محیط کشت حداقل تغییریافته و LB با ۲ غلظت IPTG به عنوان القاگر، در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در فواصل زمانی ۲ ساعته پس از القا تا ۱۰ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج الکتروفورز نمونه‌های برداشت شده از تیمارهای مختلف بررسی شد. بر اساس بررسی شدت باند پروتئینی مربوط به آنزیم Tth حاصل از نتایج الکتروفورز نمونه‌های پروتئینی و مقایسه با نمونه استاندارد BSA با استفاده از نرم‌افزار Image J، بیشترین میزان بیان پروتئین ٤٥٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که مربوط به تیمار ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد، با غلظت ۱ میلی‌مولار IPTG و ۱۰ ساعت پس از القا بود. (شکل ٤ و ۵) از همین تیمار برای استخراج آنزیم، خالص‌سازی و بررسی فعالیت آن استفاده شد.

بیان *Tth* pol در محیط کشت حداقل تغییریافته به طور محسوسی بیشتر از محیط کشت LB بود. ارتباط میزان بیان پروتئین نوترکیب و ترکیبات محیط کشت در مطالعات متعددی بررسی شده است. این مطالعات تفاوت سطح تجمع و فعالیت پروتئین نوترکیب را در محیط کشت‌های مختلف به‌خوبی نشان داده‌اند. همیشه بالاتر بودن تولید بیومس به معنی تولید بالاتر پروتئین نیست. به همین دلیل بهینه‌سازی شرایط کشت یکی از عوامل موردتوجه پژوهشگران برای دستیابی به بالاترین میزان بیان پروتئین بوده است. استفاده از ارلن و انکوباتور شیکردار روشی ساده و متداول برای بهینه‌سازی شرایط کشت می‌باشد. این روش به تجهیزات ویژه نیاز نداشته و به دلیل مقرون به صرفه بودن برای بررسی اولیه بیان پروتئین نوترکیب مورد توجه می‌باشد (Pouresmaile & Azizi-Dargahlou. 2023).

بررسی بیان نوترکیب اینترفرون بتای انسانی توسط Pal و همکاران (۲۰۲۱) در میزبان *E.coli* در دو نوع محیط کشت حداقل و LB انجام شد. میزبان *E.coli* در محیط کشت حداقل رشد بهتری داشت و میزان بیان اینترفرون بتای نوترکیب نیز در محیط کشت حداقل بیشتر از LB بود. باوجود سابقه طولانی استفاده از محیط کشت LB برای رشد *E.coli*، لزوماً این محیط بهترین گزینه برای تولید پروتئین نوترکیب است. یکی

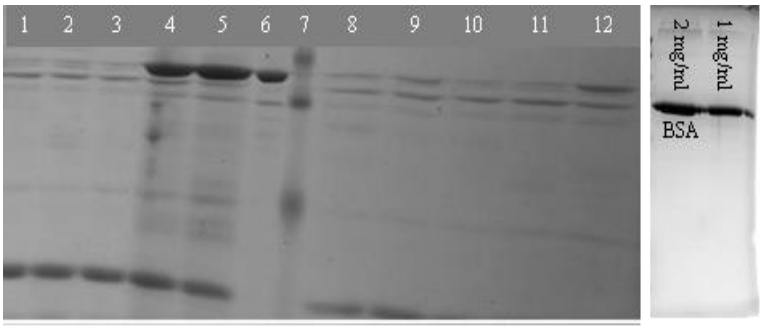
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

از دلایل می‌تواند فقدان سیستم بافری در محیط LB باشد (Broedel *et al.* 2001). به طور معمول و در محیط کشت‌های غنی مانند LB، القای بیان در محدوده تراکم نوری OD= 0.6-0.8 انجام می‌شود. با رشد باکتری و بالاتر رفتن تراکم pH محیط اسیدی می‌شود. این امر منجر به ناپایداری و ازدست‌رفتن پلاسمید و در نتیجه کاهش بیان می‌شود، به همین دلیل امکان القای بیان در تراکم بالا در این محیط وجود ندارد. در محیط کشت حداقل، با افزایش تراکم سلولی، pH محیط حفظ شده و در نتیجه پلاسمید پایدار می‌ماند. به دلیل حفظ pH محیط، امکان بیان پروتئین در تراکم بالا نیز وجود دارد. در صورت استفاده از محیط کشت حداقل، می‌توان تراکم به طور نسبی بالایی از توده سلولی را قبل از القای بیان داشت و کاهش دما پس از القا که به طور معمول به‌منظور افزایش فرم محلول پروتئین انجام می‌شود، تأثیر منفی بر میزان توده سلولی نخواهد داشت؛ زیرا قبل از القا سلول‌ها به میزان کافی سلول تکثیر شده‌اند (Sivashanmugam *et al.* 2009). تأثیر pH بر میزان بیان ۳ پروتئین نوترکیب در میزبان *E.coli* BL21 توسط Azatain و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش شده است. در این بررسی مشخص شد افزایش قدرت بافری محیط و ثبات pH منجر به افزایش ۲ برابری پروتئین نوترکیب می‌شود. این موضوع باعث کاهش قابل‌توجه هزینه‌های تولید پروتئین نوترکیب خواهد شد (Azatian *et al.* 2019). علاوه بر حفظ pH و تأثیر آن بر پایداری پلاسمید، اثر ترکیب محیط کشت بر تاخوردگی پروتئین نوترکیب نیز گزارش شده است. این موضوع ممکن است از طریق تأثیر بر تنظیم بیان پروتئین‌های چپرونی باشد (Broedel *et al.* 2001). افزودن ترکیباتی مانند اتانول موجب بیان پروتئین‌های شوک حرارتی در میزبان شده و منجر به افزایش تشکیل پیوند دی سولفیدی در پروتئین هدف می‌شود (Jiseph *et al.* 2015). مشخص کردن ترکیبات محیط کشت یکی از عوامل مهم تولید بهینه پروتئین نوترکیب است. ترکیب اسیدهای آمینه، عصاره مخمر و نمک‌ها می‌تواند باعث افزایش بازده تولید پروتئین شود. یک محیط کشت حداقل حاوی یک منبع کربن مانند گلوکز (که نقش مهمی در تأمین منبع کربن و انرژی دارد) و نمک‌ها که نیتروژن، فسفر و عناصر کمیاب را فراهم می‌کنند، محیط مناسبی برای تکثیر *E.coli* است (Maksum *et al.* 2023).

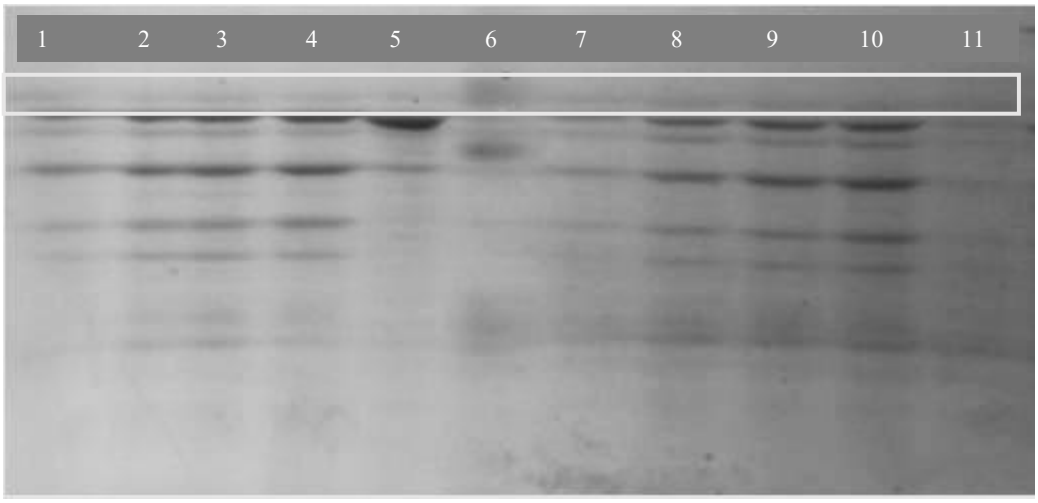
علاوه محیط کشت، دما نیز از عوامل مؤثر بر میزان بیان پروتئین نوترکیب است که در این پژوهش به آن پرداخته شد. نتایج بررسی بیان مشخص نمود میزان بیان در دمای ۳۰ درجه در محیط کشت حداقل تغییریافته بیشتر از دمای ۲۵ درجه بود. این موضوع می‌تواند به دلیل سرعت بالاتر رشد باکتری در دمای بالاتر و در نتیجه میزان تولید بالاتر پروتئین نوترکیب باشد. دما یکی از عوامل تأثیرگذار در میزان و نحوه بیان پروتئین‌های نوترکیب است. به طور معمول با کاهش دمای کشت پس از القا، می‌توان از تشکیل اجسام انکلوزیونی جلوگیری نمود. افزایش دما سرعت رشد را بالا می‌برد، اما ممکن است تجمع پروتئین‌ها در دمای بالا و افزایش تعاملات غیرطبیعی پروتئین‌ها منجر به تشکیل اجسام انکلوزیونی شود. همچنین افزایش دما ممکن است منجر به از دست رفتن پلاسمید می‌شود (Hanapiah *et al.* 2019). دمای بهینه تولید هر پروتئین نوترکیب متفاوت بوده و به ویژگی‌های پروتئین بستگی دارد. به عنوان مثال دمای بهینه تولید پروتئین نوترکیب هورمون رشد ماهی کفشک ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد تعیین شد (Choi *et al.* 2018). بیشترین میزان پروتئین نوترکیب سوماتومدین C به عنوان یک فاکتور رشد انسانی در دمای ۲۵ درجه و ۲۲ ساعت پس از القا به دست آمد ()، در حالیکه دمای بهینه بیان پروتئین نوترکیب HSPA6، ۳۷ درجه سانتی‌گراد گزارش شد. این نتایج بیانگر این موضوع هست که دمای مناسب برای بیشینه بیان هر پروتئین متفاوت بوده و باید تعیین شود (Maksum *et al.* 2023). کاهش دمای بیش از حد نیز باعث کاهش بازده تولید پروتئین نوترکیب خواهد شد. کاهش دما باعث کاهش رشد سلول، تغییر در فیزیولوژی سلول، کاهش سیالیت غشا و کاهش پایداری ساختار ثانویه اسیدهای نوکلئیک می‌شود که در نهایت منجر به کاهش کارایی ترجمه و رونویسی و تجزیه RNA می‌شود (Phadtare *et al.* 2004). پژوهش‌ها نشان داده است که بازه دمایی کمتر از دمای بهینه رشد باکتری *E.coli* و بالاتر از دمای اتاق برای دستیابی به دمای بهینه بیان هر پروتئین مناسب است (Niiranen *et al.* 2007).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]



الف



ب

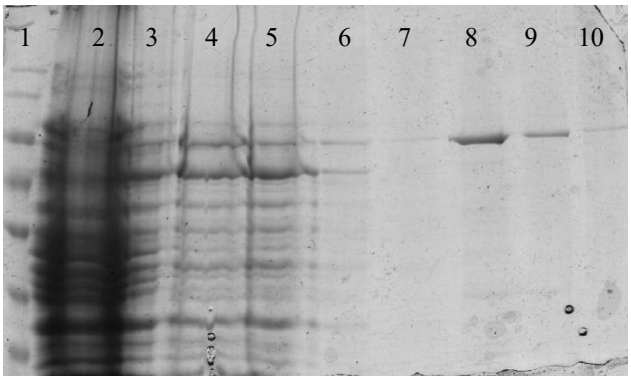
شکل ٤- الف) نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌های برداشت شده در زمان‌های مختلف از محیط کشت حداقل در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه. ردیف ۱ تا ۵) به ترتیب نمونه‌های برداشت شده پس از القا با IPTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۰ درجه و زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ ساعت پس از القا، ردیف ٦) نمونه تجاری آنزیم *Taq* pol، ردیف ۷) مارکر وزنی پروتئین (BSM0024, biobasic)، ردیف ۸ تا ۱۲) به ترتیب نمونه‌های برداشت شده پس از القا با IPTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ ساعت پس از القا. سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد در دو غلظت mg/ml ۱ و ۲. ب) نتایج حاصل از الکتروفورز نمونه‌های برداشت شده در زمان‌های مختلف از محیط کشت LB در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه. ردیف ۱ تا ۵) به ترتیب نمونه‌های برداشت شده پس از القا با IPTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۳۰ درجه و زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ ساعت پس از القا، ردیف ٦) مارکر وزنی پروتئین، ردیف ۷ تا ۱۱) به ترتیب نمونه‌های برداشت شده پس از القا با IPTG ۱ میلی‌مولار در دمای ۲۵ درجه و زمان‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ ساعت پس از القا

Fig 4. A) The results obtained from the electrophoresis of samples collected at different times from the minimal medium were compared at temperature at 25 and 30 degrees. Rows 1 to 5) samples collected after induction with 1 mM IPTG at 30 °C for 2,4,6,8 & 10 after induction. Row 6) commercial Taq pol, row 7) protein size marker, row 8 to 12) samples collected after induction with 1 mM IPTG at 25 °C for 2, 4, 6, 8,& 10 after induction. Bovine Serum Albumin (BSA) was used as a standard at two concentrations 1 & 2 mg/ml. B) The results obtained from the electrophoresis of samples collected at different times from the LB medium were compared at temperature at 25 and 30 degrees. Rows 1 to 5) samples collected after induction with 1 mM IPTG at 30 °C for 2,4,6 & 8 after induction, row 6) protein size marker, row 7 to 12) samples collected after induction with 1 mM IPTG at 25 °C for 2,4,6,8,& 10 after induction.

خالص‌سازی آنزیم *Tth* pol

پس از تیمار حرارتی عصاره سلولی لیز شده، سوپرناتانت حاوی *Tth* pol از رزین حاوی نیکل عبور داده شد. آنزیم نوترکیب *Tth* pol حـاوی یک سر 6Xhis است که تمایل به اتصال به یون‌های نیکل موجود در رزین را دارد و بقیه پروتئین‌های فاقد این دنباله هیستیدینی از رزین عبور می‌کنند (شکل ۵). بررسی فعالیت محلول حاوی *Tth* pol پس از تعویض بافر با استفاده از دیالیز انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

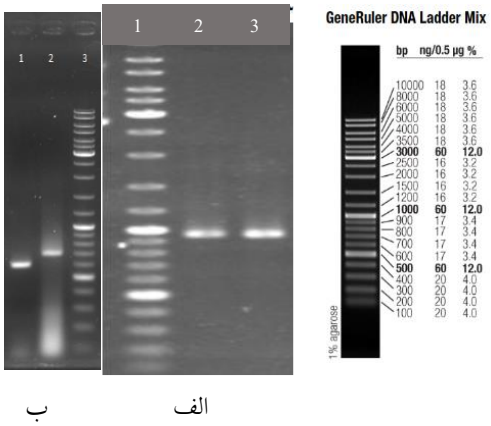


شکل ۵- خالص‌سازی *Tth* pol نوترکیب با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی. لیز سلولی با استفاده از روش جوشاندن و سپس تعویض بافر با استفاده از فیلتراسیون بر مبنای سانتریفیوژ. چاهک ۱: مارکر وزنی پروتئین، چاهک ۲: محتوای پروتئین کل سلول قبل از القای بیان، چاهک ۳: محتوای پروتئین کل قبل از تیمار حرارتی، چاهک ٤: سوپرناتانت پس از تیمار حرارتی محتوای پروتئین کل، چاهک ۵: محتوای پروتئینی پس از عبور از رزین، چاهک ٦: بافر شستشو (۱) پس از عبور از ستون، چاهک ۷: بافر شستشو (۲) پس از عبور از ستون، چاهک ۸، ۹ و ۱۰: بافر الوشن (۱)، (۲) و (۳) جهت خروج پروتئین هدف از ستون.

Fig 5. Purification of *Tth* pol using affinity chromatography. Cell lysis was performed using a boiling method, followed by buffer exchange through centrifuge-based filtration. 1) protein size marker, 2) cell lysate before induction, 3) cell lysate before boiling, 4) supernatant after boiling, 5) proteins after passing through the coloum 6) Wash buffer 1 after passing through the column, 7) Wash buffer 2 after passing through the column, 8, 9 &10) elution of target protein.

بررسی فعالیت آنزیم *Tth* pol

پس از تخلیص *Tth* pol فعالیت پلیمرازی و رونوشت برداری معکوس آن مورد بررسی قرار گرفت. آزمون PCR با استفاده *Tth* pol منجر به تکثیر قطعه حدود ۱۰۰۰ نوکلئوتیدی شد و که نشان‌دهنده صحت فعالیت پلیمرازی آنزیم است (شکل ٦ الف). به‌منظور بررسی فعالیت رونوشت برداری معکوس، سنتز cDNA از نمونه RNA گیاه توتون با استفاده از *Tth* pol انجام شد و در ادامه با کلاته کردن یون منگنز توسط EGTA (ethylene glycol-bis(ß-aminoethyl ether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid)، و افزودن یون منیزیم و ۲ جفت آغازگر رفت‌وبرگشت ژن پرولین، تکثیر قطعات موردنظر انجام شد (شکل ٦ ب). نتایج نشان داد آنزیم نوترکیب خالص شده به طور کامل فعال بوده و دارای عملکرد دوگانه پلیمرازی و رونوشت برداری معکوس است.



ب الف

شکل ٦- الف) بررسی فعالیت پلیمرازی *Tth* pol، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333)، ۱ و ۲) قطعات تکثیر شده توسط *Tth* pol، ب) بررسی فعالیت رونوشت برداری معکوس *Tth* pol، ۱ و ۲) قطعات تکثیر شده از روی cDNA ساخته شده توسط *Tth* pol، M) مارکر وزنی فرمنتاز (SM0333).

Fig 6. A) polymerase activity of *Tth* pol, M) Molecular weight marker (SM0333), 1&2) PCR products amplified by *Tth* pol, B) reverse transcriptase activity of *Tth* pol, 1&2) PCR products amplified from cDNA synthesized by *Tth* pol, M) Molecular weight marker (SM0333).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

نتیجه‌گیری: باتوجه‌به مثبت‌بودن عملکرد دوگانه *Tth* pol نوترکیب، امکان استفاده از این آنزیم در سطح گسترده‌تر وجود دارد. سرعت بالاتر نسبت به *Taq* pol، عملکرد دوگانه، مقاومت بالاتر نسبت به بازدارنده‌های PCR در نمونه‌های زیستی این آنزیم را کاندیدای مناسبی برای جایگزینی سایر DNA پلیمرازها در آزمایش‌های مولکولی کرده است. حذف بازدارنده‌های PCR از نمونه‌های زیستی مستلزم صرف زمان و هزینه است و به طور معمول کیفیت نمونه‌ها را نیز – به‌ویژه زمانی که هدف بررسی بیان ژن باشد– کاهش می‌دهد. استفاده از *Tth* pol این مشکل را برطرف کرده و پژوهشگران را از انجام مراحل حذف بازدارنده‌ها بی‌نیاز می‌سازد. این موضوع به‌خصوص در مورد کاربردهای درمانی و تشخیصی حائز اهمیت است.

تولید بهینه و حداکثری شکل فعال آنزیم *Tth* pol موضوع مهمی است که می‌تواند در ادامه مورد بررسی قرار گیرد. بهینه‌سازی بیان در فرمانتور باهدف دستیابی به مقادیر بالاتری از آنزیم از جمله مواردی است که می‌تواند در آینده بررسی شود. باتوجه‌به پایش لحظه‌ای و دقیق‌تر عوامل محیطی مانند: pH، دما، سرعت هم زدن و اکسیژن محلول امکان کنترل شرایط و دستیابی به شرایط بهینه تولید حداکثری محصول در مقایسه با بیان پروتئین در ارلن وجود دارد.

مقاومت به دمای بالا از جمله ویژگی‌های مثبت آنزیم *Tth* pol است که موجب تسهیل فرایند خالص‌سازی آن پس از بیان به‌صورت نوترکیب شد. به دلیل حساسیت سایر پروتئین‌های موجود در عصاره سلولی، از تیمار حرارتی برای حذف برخی پروتئین‌های موجود در عصاره سلولی استفاده شد. این روش منجر به حذف سریع‌تر سایر پروتئین‌ها با روشی ساده و کاهش هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی پروتئین شد.

با وجود پیشرفت‌های متعدد در حوزه تولید پروتئین‌های نوترکیب در *E.coli*، دستیابی به شرایط بهینه تولید پروتئین محلول با تاخوردگی صحیح و عملکرد مناسب هنوز با چالش‌هایی روبرو است. میزبان، پلاسمید و شرایط کشت از جمله عوامل حیاتی و تعیین کننده بیان موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب در *E.coli* هستند (Gheibi Hayat *et al.* 2018). هر عاملی تأثیر متفاوتی بر روی بازده تولید پروتئین دارد. بنابراین بهینه‌سازی بیان پروتئین و تعیین شرایط بیشینه تولید، مستلزم بررسی تمام این عوامل است. هیچ سیستم بیانی وجود ندارد که برای تولید بهینه تمام پروتئین‌های نوترکیب مناسب باشد، بلکه باید برای تولید هر پروتئین متناسب با ویژگی‌های آن سیستم بیانی و شرایط بیشینه تولید را بررسی کرد (Maksum *et al.* 2023).

منابع

References

Abu Al-Soud, W., & Rådström, P. (1998). Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Applied and environmental microbiology, 64(10), 3748-3753. doi.org/10.1128/aem.64.10.3748-3753.1998

Al-Soud, W. A., Jönsson, L. J., & Rådström, P. (2000). Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. Journal of clinical microbiology, 38(1), 345-350. doi.org/10.1128/jcm.38.1.345-350.2000

Aye, S. L., Fujiwara, K., Ueki, A., & Doi, N. (2018). Engineering of DNA polymerase I from Thermus thermophilus using compartmentalized self-replication. Biochemical and biophysical research communications, 499(2), 170-176. doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.098

Azatian, S. B., Kaur, N., & Latham, M. P. (2019). Increasing the buffering capacity of minimal media leads to higher protein yield. Journal of biomolecular NMR, 73, 11-17. doi.org/10.1007/s10858-018-00222-4

Broedel, S. E., Papciak, S. M., & Jones, W. R. (2001). The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in E. coli. Athena Enzyme Systems Technical Bulletin, 2 .(۱)

Brandis, J. W., & Johnson, K. A. (2009). High-cell density shake-flask expression and rapid purification of the large fragment of Thermus aquaticus DNA polymerase I using a new chemically and temperature inducible expression plasmid in Escherichia coli. Protein expression and purification, 63(2), 120-127. doi.org/10.1016/j.pep.2008.09.018

Cai, D., Behrmann, O., Hufert, F., Dame, G., & Urban, G. (2018). Capacity of r Tth polymerase to detect RNA in the presence of various inhibitors. PLoS One, 13(1), e0190041. doi.org/10.1371/journal.pone.0190041

Cardoso, V. M., Campani, G., Santos, M. P., Silva, G. G., Pires, M. C., Gonçalves, V. M., ... & Zangirolami, T. C. (2020). Cost analysis based on bioreactor cultivation conditions: Production of a soluble recombinant protein using Escherichia coli BL21 (DE3). Biotechnology Reports, 26, e00441. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00441

Cava, F., Hidalgo, A., & Berenguer, J. (2009). Thermus thermophilus as biological model. Extremophiles, 13, 213-231. doi.org/10.1007/s00792-009-0226-6

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

Chen, W. P., & Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic acids research, 21(9), 2260. doi.org/10.1093/nar/21.9.2260

Choi, T. J., & Geletu, T. T. (2018). High level expression and purification of recombinant flounder growth hormone in E. coli. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(2), 347-355. doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.006

Davalieva, K., & Efremov, G. D. (2010). Influence of salts and pcr inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 29(1), 57-62. doi.org/10.20450/mjcce.2010.173

de Miguel Bouzas, T., Barros-Velázquez, J., & Gonzalez Villa, T. (2006). Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. Protein and peptide letters, 13(7), 645-651. doi.org/10.2174/092986606777790548

Eilert, K. D., & Foran, D. R. (2009). Polymerase resistance to polymerase chain reaction inhibitors in bone. Journal of forensic sciences, 54(5), 1001-1007. doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01116.x

Engelke, D. R., Krikos, A., Bruck, M. E., & Ginsburg, D. (1990). Purification of Thermus aquaticus DNA polymerase expressed in Escherichia coli. Analytical biochemistry, 191(2), 396-400.

Ghasemi, A., Salmanian, A. H., Sadeghifard, N., Salarian, A. A., & Gholi, M. K. (2011). Cloning, expression and purification of Pwo polymerase from Pyrococcus woesei. Iranian journal of microbiology, 3(3), 118 .

Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant protein expression in Escherichia coli (E. coli): what we need to know. Current pharmaceutical design, 24(6), 718-725. doi.org/10.2174/1381612824666180131121940

Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource technology, 89(1), 17-34. doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6

Hamilton, S. C., Farchaus, J. W., & Davis, M. C. (2001). DNA polymerases as engines for biotechnology. Biotechniques, 31(2), 370-383. doi.org/10.2144/01312rv01

Hanapiah, R. M. A., Samah, R. A., Rodzri, N. A. M., Zahari, M. A. K. M., & Zain, W. S. W. M. (2019). Effects of Culture Conditions on Growth and Production of Xylonic Acid using Recombinant E. coli BL21 (DE3). Materials Today: Proceedings, 19, 1467-1472. doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.170

Hartley, J. L. (2006). Cloning technologies for protein expression and purification. Current Opinion in Biotechnology, 17(4), 359-366. doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.011

Hassanpor N, Ahmadabadi M, & Pazhang M. (2018). Molecular cloning and expression of Somatomedin C in bacterial system. Genetic engineering and biosafety journal, 6 (2) :237-244. dor.isc.ac/dor/20.1001.1.25885073.1396.6.2.5.9

Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M., & Manjunath, S. R. (2015). An overview of the parameters for recombinant protein expression in Escherichia coli. J Cell Sci Ther, 6(5), 221. doi.org/10.4172/2157-7013.1000221

Katalani, K., Soleimani, E., & Nematzadeh, G.H. (2025). Optimizing purification and refolding conditions for recombinant EcoRI restriction endonuclease protein in E.coli. Agricultural biotechnology journal, 17(2), 107-132.(in persian) doi.org/10.22103/jab.2025.24329.1626.

Khalilvand, A. B., Aminzadeh, S., Sanati, M. H., & Mahboudi, F. (2022). Media optimization for SHuffle T7 Escherichia coli expressing SUMO-Lispro proinsulin by response surface methodology. BMC biotechnology, 22, 1-13. doi.org/10.1186/s12896-021-00732-4

Maksum, I. P., Latifah, F. P. U., Nabiel, A., Sriwidodo, S., Lestari, N. F., Azizah, M. I., & Utami, D. F. (2023). An overview of culture conditions for recombinant protein expression in Escherichia coli. Journal of Applied Biotechnology Reports, 10(1), 864-875. doi.org/10.30491/JABR.2022.349844.1547

Maksum, I. P., Utami, D. F., Nurhakim, E. A., Yusuf, M., Fadhlillah, M., & Haryanto, R. A. (2022). Overexpression of soluble recombinant Thermus thermophilus (Tth) DNA polymerase in Escherichia coli BL21 (DE3) using an MBP fusion tag as a solubility enhancer. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 12(9), 017-024. doi.org/10.7324/JAPS.2022.120903

Moreno, R., Haro, A., Castellanos, A., & Berenguer, J. (2005). High-level overproduction of His-tagged Tth DNA polymerase in Thermus thermophilus. Applied and environmental microbiology, 71(1), 591-593. doi.org/10.1128/aem.71.1.591-593.2005

Niiranen, L., Espelid, S., Karlsen, C. R., Mustonen, M., Paulsen, S. M., Heikinheimo, P., & Willassen, N. P. (2007). Comparative expression study to increase the solubility of cold adapted Vibrio proteins in Escherichia coli. Protein expression and purification, 52(1), 210-218. doi.org/10.1016/j.pep.2006.09.005

Pal, D., Patel, G., Dobariya, P., Nile, S. H., Pande, A. H., & Banerjee, U. C. (2021). Optimization of medium composition to increase the expression of recombinant human interferon-β using the Plackett‐Burman and central composite design in E. coli SE1. 3 Biotech, 11(5), 226. doi.org/10.1007/s13205-021-02772-1

Pantazaki, A., Pritsa, A., & Kyriakidis, D. (2002). Biotechnologically relevant enzymes from Thermus thermophilus. Applied microbiology and biotechnology, 58, 1-12. doi.org/10.1007/s00253-001-0843-1

Papaneophytou, C. P., & Kontopidis, G. (2014). Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. Protein expression and purification, 94, 22-32. doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.016

Perbal, B. (2008). Avian myeoloblastosis virus (AMV): only one side of the coin. Retrovirology, 5, 1-5. doi.org/10.1186/1742-4690-5-49

Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. Current issues in molecular biology, 6(2), 125-136. doi.org/10.21775/cimb.006.125

Poddar, S. K., Sawyer, M. H., & Connor, J. D. (1998). Effect of inhibitors in clinical specimens on Taq and Tth DNA polymerase-based PCR amplification of influenza A virus. Journal of medical microbiology, 47(12), 1131-1135. doi.org/10.1099/00222615-47-12-1131

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]

Radmard, M., & Hashemi, A. (2024). Response surface methodology approach to optimize the expression of Thioredoxin-MOG fusion protein. Pharmaceutical Sciences, 30(2), 252-261. doi.org/10.34172/PS.2024.1

Rezaei, S., & Talebi, A. F. (2020). Progress in Escherichia coli production of recombinant proteins. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal, 10(38), 9-28.(in persian) dor.isc.ac/dor/20.1001.1.22285458.1399.10.38.5.0

Rittié, L., & Perbal, B. (2008). Enzymes used in molecular biology: a useful guide. Journal of cell communication and signaling, 2, 25-45. doi.org/10.1007/s12079-008-0026-2

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. Frontiers in microbiology, 5, 172. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172

Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using Escherichia coli. Protein science, 18(5), 936-948. doi.org/10.1002/pro.102

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein expression and purification, 41(1), 207-234. doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016

Terpe, K. (2013). Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied microbiology and biotechnology, 97(24), 10243-10254. doi.org/10.1007/s00253-013-5290-2

Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and molecular biology reviews, 65(1), 1-43. doi.org/10.1128/mmbr.65.1.1-43.2001

Yang, Z., Ding, Y., Zhang, Y., & Liu, F. (2008). Rapid purification of truncated Taq DNA polymerase Stoffel fragment by boiling lysis of bacterial expression cultures. Biotechnology and applied biochemistry, 50(2), 71-75. doi.org/10.1042/BA20070114

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOI: 10.61882/gebsj.13.2.6]