

بیان سلولاز CMC3 تحت کنترل راه اندازهای متانل اکسیداز و الکل

اکسیداز در مخمر *Pichia pastoris*

The expression of cellulase CMC3 under control the alcohol oxidase 1 (AOX1) and methanol oxidase (MOX) promoters in the yeast *Pichia pastoris*

محسن ممینی^۱، ساره ارجمند^۲، سید امید رعنائی سیادت^۲، علیرضا عباسی^۱، هوشنگ علیزاده^{۱*}

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیاران، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی و منابع طبیعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۲- به ترتیب استادیار، دانشیار، مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی، پردیس عمومی، تهران

Mombeni M¹, Arjmand S², Ranaei Siyadat SO², Abbasi A¹, Alizadeh H^{*1}

1- PhD Student, Associate Professors, Department of Agricultural and Natural Resources Biotechnology, University of Tehran, Iran, Karaj

2- Assistant Professor, Associate Professor, Protein Research Center, University of Shahid Beheshti, GC, Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: halizade@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

راه اندازهای کوتاه و قدرتمند از اجزای کلیدی بیان موفق پروتئین نو ترکیب در میزبان های مختلف از جمله مخمر *Pichia pastoris* می باشند. در این مطالعه بیان خارج سلولی آنزیم سلولاز بتاندوگلوکاناز (CMC3) تحت کنترل راه انداز متانول اکسیداز (MOX) و الکل اکسیداز ۱ (AOX1) با تحت خوراک دهی متانول مورد بررسی قرار گرفت. به منظور حذف اثر تعداد کپی، کلون های نو ترکیب حاوی یک نسخه جای گیری در ژنوم با استفاده از روش Real-Time PCR شناسایی و مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم، زایموگرافی و SDS-PAGE بیان قدرتمند و قابل مقایسه سلولاز تحت کنترل هر دو راه انداز MOX و AOX1 در این مخمر را نشان دادند. نتایج بیان قوی CMC3 نشان داد که راه انداز کوتاه MOX می تواند با موفقیت برای تولید پروتئین نو ترکیب با بیان بالا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی

پروتئین نو ترکیب

سلولاز

راه انداز

Pichia pastoris

مقدمه

مخمرهای متیل دوستی^۱ مانند *Hansenula*, *Candida biodinii* و *Pichia methanolica polymorpha* برای تولید انواع پروتئین های نو ترکیب به کار برده شده اند (Gellissen 2000; Mattanovich et al. 2012). پرکاربردترین مخمر متیل دوست *P. pastoris* است و تاکنون بیش از صدها پروتئین در آن بیان شده اند (Vogl and Glieder 2013). یکی از مهم ترین خصوصیات این مخمر و سایر مخمرهای متیل دوست وجود راه اندازهای قدرتمندی است که به وسیله متانول القا می شوند که از ژن های درگیر در مسیر متابولیسم متانول^۲ (MUT) جداسازی شده اند (Gasser et al. 2015). مخمر *P. pastoris* دارای دو نسخه از ژن الکل اکسیداز- آنزیم کلیدی متابولیسم متانول- بنام *AOX1* و *AOX2* است که این دو نسخه از نظر قدرت راه اندازی متفاوت هستند (Cregg et al. 1989). قدرت راه اندازی بالا و تنظیم دقیق (القای شدید توسط متانول و مهار فعالیت راه اندازی با سایر منابع هیدروکربنی مانند گلوکز و گلیسرول) مهم ترین خصوصیت راه انداز *AOX1* است که باعث شده است این راه انداز پرکاربردترین راه انداز برای تولید پروتئین نو ترکیب در این مخمر باشد (Jahic et al. 2006). در مطالعات مختلف بیان پروتئین با مقدار بیش از ۲۲ گرم در لیتر به صورت درون سلولی و ۱۵ گرم در لیتر به صورت خارج سلولی تحت کنترل این راه انداز گزارش شده است (Hasslacher et al. 1997; Werten et al. 1999). علی رغم خصوصیات مثبت ذکر شده، طول بزرگ این راه انداز (۹۳۹ باز) باعث بروز برخی چالش ها در بیان پروتئین نو ترکیب می شود چرا که با افزایش طول راه انداز محل های بالقوه اتصال آنزیم های برشی افزایش می یابد. این موضوع منجر به ایجاد محدودیت هایی در همسان سازی ژن ها می شود. در کنار این مشکل، کار کردن با راه اندازهای بلند به خصوص در زیست شناسی صناعی^۳ باعث بروز محدودیت هایی در طراحی و نیز طول حامل^۴ می شود. با توجه به مشکلات ذکر شده یکی از محورهای بهبود مخمر *P. pastoris* جهت بیان پروتئین نو ترکیب و استفاده

در زیست شناسی صناعی توسعه سیستم های بیانی جدید مبتنی بر راه اندازهای کوچک و قدرتمند است (Redden and Alper 2015).

شباهت در مسیر متابولیسم متانول بین مخمر *P. pastoris* و سایر مخمرهای متیل دوست می تواند به عنوان یک منبع جدید برای شناسایی و به کارگیری راه اندازهای قدرتمند دارای اهمیت باشد. گزارش شده است که شباهت بالایی در مسیر متابولیسم متانول بین مخمرهای *P. pastoris* و *H. polymorpha* وجود دارد (Egli et al. 1987; Tschopp et al. 1982). مطالعه ترانسکریپتوم این مسیر متابولیسمی بیان بالای ژن های دخیل در این مسیر به خصوص ژن *MOX* را نشان داد (Ravin et al. 2013). *MOX* یک نسخه از آنزیم هم عرض الکل اکسیداز می باشد و گزارش شده است که این آنزیم در مخمر *H. polymorpha* تحت القا با متانول بیش از ۴۰ درصد محتوای پروتئینی سلول را در بر می گیرد (Gödecke et al. 1994).

سلولازها یکی از مهم ترین آنزیم های صنعتی هستند (Sukumaran et al. 2005) که انواع مختلف آن به طور موفقیت آمیزی در میزبان های مختلف از جمله مخمر *P. pastoris* بیان شده اند (Chen et al. 2011; Mellitzer et al. 2012). با توجه به نحوه سنجش فعالیت نسبتاً ساده، این آنزیم ها در بعضی مطالعات به عنوان ژن های گزارشگر استفاده شده اند (Boonvitthya et al. 2013; Wongwisansri et al. 2013).

در این تحقیق ناحیه راه اندازی ژن *MOX* مخمر *H. polymorpha* جهت بررسی کاربرد در بیان پروتئین نو ترکیب و مقایسه با راه انداز رایج *AOX1* در مخمر *P. pastoris* مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور ژن سلولاز بتا اندوگلوکاناز *CMC3* مشتق از قارچ *Hemicola insolens* به عنوان ژن گزارشگر مورد استفاده قرار گرفت و تحت کنترل دو راه انداز *MOX* و *AOX1* در مخمر *P. pastoris* بیان شد.

مواد و روش ها

در این تحقیق سیستم بیانی pPINK-HCTM سویه ۱ (ade2) مخمر *P. pastoris* برای بیان ژن گزارشگر *CMC3* و باکتری *E. coli DH5α* جهت تکثیر سازه نو ترکیب مورد استفاده قرار گرفت.

¹ Methylo trophic

² Methanol-Utilization Pathway

³ Synthetic biology

⁴ Vector

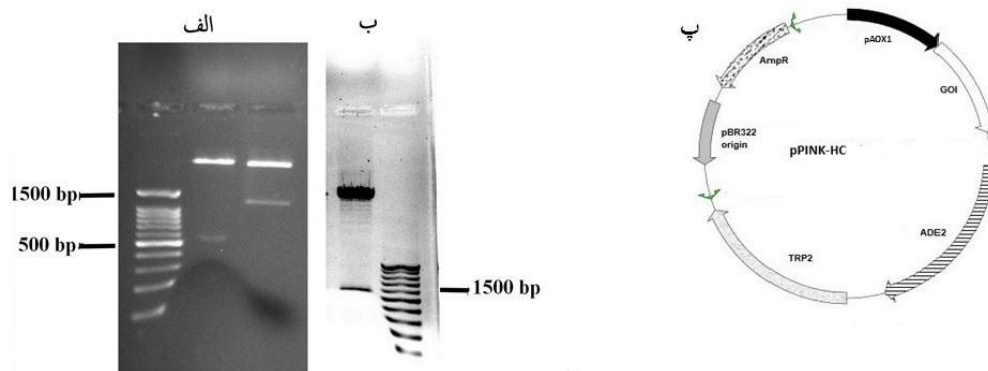
تهیه شده بود. ژن سنتز شده و سازه pPINK-HC-MOX با دو آنزیم برشی فوق هضم دوگانه شدند و واکنش الحاق در حضور آنزیم DNA لیگاز صورت پذیرفت. برای طراحی سازه دوم ناقل pPINK-HC حاوی راه انداز AOX1، ژن CMC3 و سازه با استفاده از آنزیمهای برشی *EcoRI* / *KpnI* هضم دوگانه شدند و واکنش الحاق CMC3 به درون سازه در حضور آنزیم DNA لیگاز صورت پذیرفت. مخلوطهای واکنش الحاق به روش شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه) به درون سلولهای مستعد از پیش تهیه شده *E. coli DH5α* انتقال یافت. کلنیهای مثبت بر اساس رشد بر روی محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک آمپیسیلین (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) و PCR ژن سلولاز و راه انداز MOX شناسایی شدند. نیمرخهای حرارتی واکنشهای PCR برای دو ژن شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۰ چرخه با شرایط ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد برای اتصال آغازگرهای CMC3 و MOX و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد برای تکثیر ژن CMC3 و ۴۵ ثانیه برای تکثیر ژن MOX و در پایان ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی بود. کلونهای به دست آمده با استفاده از PCR با آغازگرهای اختصاصی راه انداز و ژن CMC3 و همچنین با توالی یابی محصولات PCR تایید شدند.

کلیه مواد شیمیایی از شرکت Merck (آلمان) و Sigma-Aldrich (آمریکا) خریداری شدند. آنزیمهای تغییردهنده DNA از شرکت های Thermo Fisher Scientific, Inc. (آمریکا) و Takara Bio, Inc. (ژاپن) خریداری شدند. تمام مواد کاربردی در واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، کیت های بازیابی قطعات تکثیری از روی ژل آگارز و کیت های استخراج پلاسمید از شرکت Bioneer (کره جنوبی) تامین شدند.

بر اساس توالی ناحیه راه اندازی MOX با کد MG976719.1 از پایگاه داده NCBI، یک جفت آغازگر جهت تکثیر این ناحیه از روی ژنوم مخمر *H. polymorpha* به همراه نواحی برشی *BglIII* و *EcoRI* در دو انتهای ۵' و ۳' توالی راه انداز طراحی شدند. آغازگرها (جدول ۱) با استفاده از نرم افزار primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) طراحی شدند. محصول PCR و حامل pPINK-HC (شکل ۱) با استفاده از دو آنزیم برشی *EcoRI* / *BglIII* هضم دوگانه شدند. در نتیجه راه انداز AOX1 از حامل خارج و محصول PCR با واکنش الحاق در حضور DNA لیگاز جایگزین شد و نهایتاً سازه pPINK-HC-MOX طراحی شد. ژن سلولاز اندوگلوکاناز CMC3 (۳۸۸ اسید آمینه) به همراه سیگنال پپتید طبیعی خود و همچنین محل اتصال آنزیمهای برشی *EcoRI* / *KpnI* در دو انتهای ۵' و ۳' بر اساس ترجیح کدونی مخمر *P. pastoris* در حامل pPINK-HC بیشتر از سوی آزمایشگاه مهندسی زیستی دانشگاه شهید بهشتی

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر توالی های راه انداز MOX، ژن CMC3 و تشخیص تعداد کپی ژن به روش Real-Time PCR

طول قطعه تکثیری	توالی	نام آغازگر	آغازگر
۵۴۵	AATTAGATCTCCGGAGGCTGGGCTTTC	F-MOX	تکثیر راه انداز MOX
	CGGCCCGAATTCTTTGTTTTTGTATTTAG	R-MOX	
۱۲۴۳	TAGAAGCTTCAAGGTGGTGCTTGG	F-cmc3	تکثیر ژن CMC3
	TTCCGATCCCTACTATGGAACGTATTC	R-cmc3	
۸۹	TTTAAAGGTTCCGGTAGAAATTGTCTCTC	F-mox	تشخیص تعداد نسخه ژن بر اساس توالی های MOX و CMC3
	GAAACAGCTATGACCATGATTACGC	R-mox	
۱۰۲	TGACGGCTTCAACATGTTCC	F-cmc3	
	CTCAGTCAGGTTTCGGAGGT	R-cmc3	
۱۰۱	CTGAGACAAAGTTCACGGGTATC	F-ARG4	
	GATGCTGCTGGAGACGATTC	R-ARG4	



شکل ۱- سازه بیانی طراحی شده

الف- تایید سازه بیانی pPINK-HC-MOX-CMC3 به روش هضم آنزیمی. چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست شامل نشانگر DNA، هضم ناقل و برش راه انداز MOX با طول ۵۳۳ باز و هضم ناقل و برش ژن CMC3 با طول ۱۲۳۲ باز می‌باشند.

ب- تایید سازه بیانی PINK-HC-AOX1-CMC3 به روش هضم آنزیمی. چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست شامل هضم ناقل و برش ژن CMC3 و نشانگر DNA می‌باشند.

پ- شکل شماتیک ناقل pPINK-HC طراحی شده.

در نهایت کلنی‌های حاوی سازه pPINK-HC-MOX-CMC3 و pPINK-HC-AOX1-CMC3 برای مراحل بعدی تحقیق در این باکتری تکثیر شدند. انتقال ناقل به سلول‌های مستعد مخمر (از پیش تهیه شده) بر اساس روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه Electroporator manipulator (ECM630, BTX Harvard apparatus) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام پذیرفت. قبل از انتقال سازه‌های بیانی جهت الحاق به ناحیه لوکوس TRP2 سویه ۱ با استفاده از آنزیم برشی *SpeI* خطی شدند. کلنی‌های مثبت بر اساس رشد بر روی محیط انتخابی ^۱PAD (Invetrogen) انتخاب و با استفاده از واکنش PCR بر اساس آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) راه انداز MOX و ژن CMC3 تایید شدند.

محتوای DNA ژنومی مخمرهای *H. polymorpha* و *P. pastoris* بر اساس روش Haaning et al. (1997) با برخی تغییرات استخراج شد (Haaning et al. 1997). سلول‌های حاصل از کشت شبانه کلنی‌های مثبت در پنج میلی‌لیتر محیط YPD (عصاره مخمر ۱٪، پپتون ۱٪ و گلوکز ۲٪) با OD₆₀₀=۲-۴ با استفاده از سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۵ دقیقه) از روشناور جداسازی شدند. سلول‌ها در ۷۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ mM Tris-CL، ۱۰ mM EDTA، PH=۸) حل شدند و پس از چند ثانیه همزنی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه نگه‌داری شدند و سپس دوباره هم‌زنی شدند. این فرایند سه بار تکرار شد. نهایتاً سوسپانسیون سانتریفیوژ شد و روشناور به یک میکروتیوب تمیز انتقال داده شد. جهت حذف RNA، روشناور با آنزیم ریبونوکلاز در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند. جهت حذف آلودگی‌های پروتئینی، روشناور با محلول کلروفورم/ ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲۴ به مدت پنج دقیقه تیمار شد. سپس محلول سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰g، ۱۰ دقیقه) و فاز رویی محتوی DNA به میکروتیوب جدید منتقل شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده و نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتری بالاتر از ۱/۸ داشتند جهت بررسی‌های بعدی انتخاب شدند.

به منظور اجتناب از اثر دز ژن بر مقایسه سطح بیان آنزیم سلولاز تحت کنترل دو راه انداز AOX1 و MOX، در کلنی‌های غربال شده از روش Real-Time PCR جهت تشخیص کلنی‌های حاوی یک یا بیش از یک‌کپی (چندکپی) استفاده شد (Abad et al. 2010). ابتدا بر اساس ناحیه راه انداز MOX، ژن CMC3 و ژن داخلی ARG4^۲ مخمر سه جفت آغازگر طراحی شد (جدول ۱).

^۲ Arginissuccinate lyase

^۱ Pichia Adenine Dropout

(BMY+ متانول ۵۰٪) با $OD_{600}=1$ حل شدند و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت شیک ۲۵۰ دور بر دقیقه (۲۰۰g) انکوبه شدند. خوراک دهی روزانه با متانول یک درصد جهت حفظ رشد و همچنین القا بیان انجام پذیرفت. هر ۲۴ ساعت مقدار یک میلی لیتر روشنآور جهت بررسی بیان آنزیم ها و زیست توده برداشت شد. نهایتاً پس از ۹۶ ساعت، سلول ها به وسیله سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۵ دقیقه) جمع آوری و روشنآور جهت بررسی های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه SDS-PAGE بر اساس روش (laemmli et al. 1970) و با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز افقی Bio-Rad انجام پذیرفت (Laemmli et al. 1970). به این منظور ژل پلی اکریل آمید حاوی دو بخش، تفکیک کننده ۱۲٪ و فشرده کننده ۸٪، با ضخامت ۱/۵ میلی متر مورد استفاده قرار گرفت. روشنآور حاصل از کشت در ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه حل شد و سپس به مدت پنج دقیقه در آب جوشانده شد. پس از خنک شدن نمونه ها، در حدود ۲۰-۱۰ میکرولیتر از هر نمونه (مساوی بین همه نمونه ها) به درون چاهک ها بارگذاری شد. ژل ها تحت ولتاژ ۱۰۰ ولت و ۴۰۰ میلی آمپر به مدت یک ساعت بارگذاری شدند. پس از پایان مرحله بارگذاری، ژل ها با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی شدند (Wray et al. 1981). آزمون زایموگرافی بر اساس روش (2014) Gastelum-Arellanez et al. انجام پذیرفت (Gastelum-Arellanez et al. 2014). به طور خلاصه، سوسبسترای فعالیت آنزیم CMC3 (کربوکسی متیل سلولز ۱٪/۰/۱) به درون بافر تفکیک کننده اضافه شد. پس از پایان مرحله بارگذاری، ژل ها توسط بافر شستشو (بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار، Triton-X-100 ۱٪/۰/۱، $PH=7.8$) به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. پس از شستشو، ژل ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در همین بافر ولی بدون حضور Triton-X-100 بدون شیک به مدت یک ساعت نگهداری شدند. رنگ آمیزی با محلول رنگی کونگو رد^۱ ۰/۲٪ انجام شد و پس از ظهور نواحی روشن متناظر فعالیت سلولاز بتا اندوگلوکاناز، رنگ زدایی توسط محلول دو مولار سدیم کلراید انجام شد.

طول قطعه تکثیری به ترتیب ۸۹، ۱۰۱ و ۱۰۵ باز برای راه انداز MOX، CMC3 و ژن ARG4 به عنوان ژن مرجع داخلی بود. جهت فرایند Real-Time PCR از کیت FIREpol EvaGreen شرکت Solis BioDyne استفاده شد. نیمرخ حرارتی واکنش های PCR شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۴۰ سیکل ۳۰ ثانیه ای در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد برای اتصال آغازگرها و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای تکثیر قطعات اسید نوکلئیک بود. منحنی های استاندارد جهت تعیین کمی تعداد نسخه الحاقی ترسیم شدند. برای این منظور یک نانوگرم از DNA ژنومی استخراج شده در حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتری مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت تعداد کپی نرمال شده بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{تعداد کپی نرمال نشده} = \frac{\text{تعداد کپی ژن هدف}}{\text{تعداد کپی ژن کالیبره کننده داخلی (ARG4)}}$$

با توجه به اینکه راه انداز MOX قبلاً در مخمر *P. pastoris* مورد استفاده قرار نگرفته بود و اطلاعاتی درباره نحوه خوراک دهی مناسب با متانول جهت القای این راه انداز وجود نداشت، ابتدا سه روش خوراک دهی با متانول بر اساس مقدار متانول افزوده شده به محیط (مطابق جدول ۲) طراحی شد. بدین منظور تعدادی از کلون های مثبت تک کپی در ۱۰ میلی لیتر محیط YPD (YP+ گلوز ۲٪) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و پس از رسیدن به رشد مناسب ($OD_{600}=2-4$) جمع آوری شده و سلول ها رسوب داده شدند (سانتریفیوژ ۵۰۰۰g، ۱۰ دقیقه). سلول ها دوباره در ۱۰ میلی لیتر محیط BMMY (BMY+ متانول) با $OD_{600}=1$ حل شدند و به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت شیک ۲۵۰ دور بر دقیقه (۲۰۰g) گرماگذاری شدند. در پایان سلول ها رسوب داده شده و میزان تولید آنزیم به روش سنجش فعالیت آنزیم بررسی شد.

پس از تعیین بهترین روش خوراک دهی با متانول (روش الف جدول ۲)، کلنی های تک کپی حاوی سازه های pPINK-HC- MOX- CMC3 و pPINK-HC-AOX1- CMC3 غربال شده در ۱۰۰ میلی لیتر محیط YPD (YP+ گلوز ۲٪) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و پس از رسیدن به رشد مناسب ($OD_{600}=2-4$) جمع آوری شده و سلول ها رسوب داده شدند (سانتریفیوژ ۵۰۰۰g، ۱۰ دقیقه). سلول ها دوباره در ۱۰۰ میلی لیتر محیط BMMY

¹ Congo red

می‌کنند. در مطالعات قبلی صورت گرفته در آزمایشگاه مهندسی زیستی دانشگاه شهید بهشتی مشخص شد که مخمر *P. pastoris* توانایی مناسبی در بیان این پروتئین‌های نوترکیب تحت کنترل راه انداز AOX1 دارد. روش‌های مختلفی برای سنجش فعالیت سلولاز وجود دارد که اکثر آن‌ها سریع، ساده و کمی هستند (Shuangqi et al. 2011). این خصوصیات باعث شده‌است که این دسته از آنزیم‌ها برای کاربرد به‌عنوان ژن گزارشگر در مخمر *P. pastoris* مناسب باشند. ژن *MOX* مخمر *H. polymorpha* به شدت در سطح رونویسی القا می‌شود و راه‌اندازه این ژن از ایده‌آل‌ترین راه‌اندازها برای بیان پروتئین نوترکیب در این مخمر است (Avgerinos et al. 2001; Gellissen 2000). در این تحقیق راه‌انداز *MOX* با طول ۵۳۳ باز برای کاربرد هترولوگ جهت بیان سلولاز نوترکیب CMC3 در مخمر *P. pastoris* مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تایید الحاق توالی‌های *MOX* و *CMC3* به درون حامل‌های pPINK-HC به روش هضم دوگانه حامل (شکل ۱)، انتقال ناقل نهایی به درون لوکوس *TRP2* ژنوم مخمر *P. pastoris* به روش الکتروپوریشن انجام شد. کلنی‌های مثبت حاوی سازه pPINK-HC-MOX-CMC3 و pPINK-HC-AOX1-CMC3 به روش PCR و بر اساس تکثیر توالی‌های *CMC3* و *MOX* (شکل ۲) و همچنین رشد بر روی محیط انتخابی PAD انتخاب شدند. پس از غربالگری کلنی‌های مثبت حاوی ناقل‌ها، کلون‌های حاوی یک کپی از ناقل‌های الحاقی به روش Real-Time PCR غربالگری شدند. روش Real-Time PCR برخلاف روش‌های سنتی تشخیص تعداد نسخه ژن که هزینه و زمان زیادی را لازم دارند و از طرفی بشدت مستعد خطای کاربر هستند سریع، کارآمد و کم هزینه است (D'haene et al. 2010) از این‌رو این روش بطور گسترده برای تشخیص تعداد کپی ژن در میزبان‌هایی مانند گیاهان و انسان استفاده می‌شود (Shepherd et al. 2009). تاکنون اطلاعات زیادی در خصوص بهینه‌سازی این روش برای تشخیص تعداد کپی درج شده در ژنوم مخمرها به‌خصوص مخمر *P. pastoris* وجود نداشته است. (Abad et al. 2010) نخستین بار از این روش برای تعیین تعداد نسخه درج شده در ژنوم مخمر *P. pastoris* استفاده کردند. با توجه به اینکه در هنگام ارائه آن

فعالیت سلولازی بتاندوگلوکاناز CMC3 به روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف دی‌نیتروبنزوئیک سالیسیلیک اسید (DNS) انجام شد (Miller 1959). مخلوط واکنش شامل ۵۰-۲۵ میکرولیتر روشناور (مساوی بین همه نمونه‌ها) کشت سلولی به‌علاوه ۵۰۰ میکرولیتر بافر واکنش (شامل کربوکسی‌متیل سلولز ۱٪ محلول در بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، pH= ۶/۵) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. جهت خاتمه واکنش ۱۰۰ میکرولیتر محلول سود شش مولار به مخلوط واکنش اضافه و ورتکس شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر محلول DNS به تیوب واکنش اضافه شد و پس از چند ثانیه ورتکس ملایم، مخلوط واکنش به مدت پنج دقیقه جوشانده شد. پس از سرد شدن به سرعت جذب واکنش در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. پس از رسم منحنی استاندارد، یک واحد فعالیت آنزیم به‌صورت مقدار آنزیم لازم جهت رهاسازی یک میکروگرم گلوکز احیاشده در دقیقه بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$u/ml = \frac{(ml) \times \text{حجم واکنش} \times \text{قند احیا شده}}{(ml) \times \text{حجم سوپرناتانت} \times \text{زمان}}$$

نتایج و بحث

بر اساس مطالعات انجام شده بیان موفق پروتئین نوترکیب در میزبان به‌طور مستقیم به خصوصیات سیستم بیانی مانند سویه و به‌خصوص راه‌انداز بستگی دارد (Redden and Alper 2015). مخمر *P. pastoris* توانایی بالایی در بیان پروتئین نوترکیب تحت راه‌انداز AOX1 دارد (Boonvitthya et al. 2013). همگام با اهمیت در فن‌آوری پروتئین نوترکیب، وجود راه‌اندازهای قوی، کوتاه و با کنترل دقیق از اجزای کلیدی توسعه زیست‌شناسی صناعی است (Redden and Alper 2015). تاکنون جستجو برای راه‌اندازهای کوتاه و قدرتمند به ندرت باعث شناسایی انواع قوی‌تری از راه‌انداز AOX1 شده‌است (Gasser et al. 2015). مخمرهای متیل‌دوست دارای شباهت‌هایی در مسیر متابولیسم متانول هستند. این شباهت به‌وسیله کاربرد هترولوگ راه‌اندازهایی مانند AOX1 در سایر مخمرهای متیل‌دوست اثبات شده‌است (Raschke et al. 1996). سلولازها دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که پلیمر سلولز را به گلوکز و سایر قندهای کوچک‌تر هیدرولیز

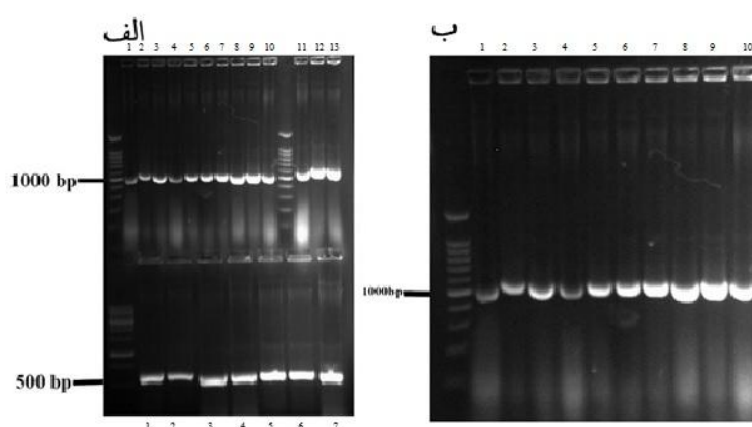
Real-Time PCR شناسایی و در ادامه تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

با توجه به اینکه نخستین بار است که از راه انداز MOX برای بیان پروتئین نوترکیب به وسیله خوراک دهی با متانول در مخمر *P. pastoris* استفاده می شود و به همین دلیل اطلاعات کافی در خصوص نحوه فعالیت راه انداز MOX تحت این خوراک در این مخمر وجود ندارد، اثر سه روش مختلف متانول دهی بر اساس مقادیر افزوده شده به محیط بر حسب حجمی - حجمی بر بیان کلنی های تک کپی مثبت حاوی ناقل های pPINK-HC-MOX- CMC3 در محیط BMMY بررسی شد (جدول ۲).

تحقیق هنوز ژنوم این مخمر به طور کامل توالی یابی نشده بود اطلاعات حاصل از آن مستعد خطا بود. اما با انتشار نخستین توالی یابی دقیق ژنوم این مخمر (Ravin et al. 2013) استفاده از این روش هرچه بیشتر مورد توجه است. در این تحقیق با بهینه سازی این روش از نتایج آن جهت تشخیص و تفکیک کلنی های حاوی یک و بیش از یک کپی از ژن درج شده CMC3 تحت کنترل راه انداز MOX استفاده شد (نتایج نشان داده نشده است). به منظور اجتناب از اثر در ژنی بر بیان پروتئین نوترکیب CMC3، کلنی های حاوی یک نسخه از ژن درج شده به روش

جدول ۲- مقایسه روش های مختلف خوراک دهی با متانول بر بیان سلولاز CMC3 تحت کنترل راه انداز MOX.

خوراک دهی با متانول	روش خوراک دهی	میانگین بیان CMC3 تحت راه انداز MOX
الف	افزایش نیم درصد حجمی / حجمی متانول در روز اول کشت و سپس افزایش یک درصد حجمی / حجمی به صورت روزانه به مدت سه روز	۵۷۶
ب	افزایش نیم درصد حجمی / حجمی متانول در روز اول کشت و سپس افزایش هشت درصد حجمی / حجمی به صورت روزانه به مدت سه روز	۴۸۷
پ	افزایش یک درصد حجمی / حجمی متانول حجمی / حجمی به مدت چهار روز	۵۲۳

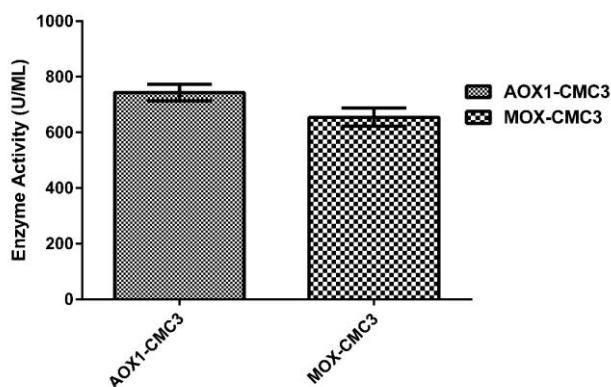


شکل ۲- غربالگری کلنی های ترنسفرم مخمر پیکیا پاستوریس بر اساس الکتروفورز محصولات PCR ژن CMC3 و راه انداز MOX. در تمامی تصاویر چاهک اول از چپ نشانگر DNA است.

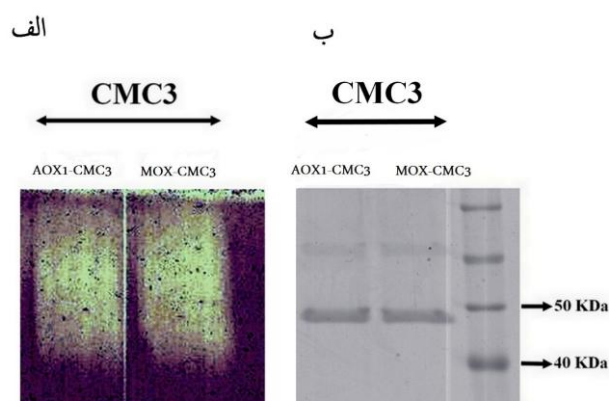
الف- غربالگری کلنی های حاوی سازه pPINK-HC-MOX-CMC3 بر اساس تکثیر توالی های MOX (چاهک های پایین شکل- شماره ۱ تا ۷) و CMC3 (چاهک های بالای شکل- شماره ۱ تا ۱۳).

ب- غربالگری کلنی های حاوی سازه pPINK-HC-AOX1-CMC3 بر اساس تکثیر توالی CMC3 (چاهک های ۱ تا ۱۰).

تجزیه زایموگرافی پروتئین‌های نوترکیب تولید شده نشان دهنده هاله‌ای شفاف و روشن بر روی ژل بود که نشان‌دهنده فعالیت کربوکسی‌متیل سلولازی بالای آنزیم‌های تولید شده بود (شکل ۴ الف).



شکل ۳- بیان سلولاز CMC3 تحت کنترل دو راه‌انداز AOX1 و MOX پس از ۴۸ ساعت خوراک‌دهی با متانول

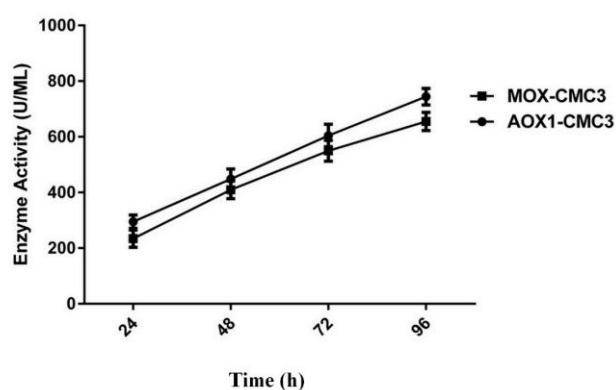


شکل ۴- تجزیه زایموگرافی (الف) و SDS-PAGE (ب) پروتئین نوترکیب CMC3 تولید شده تحت کنترل راه‌اندازهای AOX1 و MOX پس از ۴۸ ساعت خوراک‌دهی با متانول.

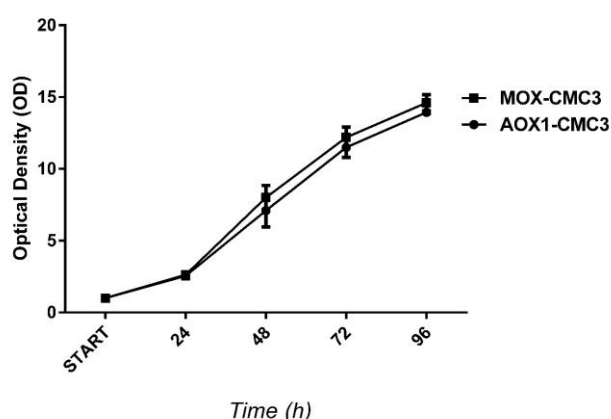
فعالیت کربوکسی‌متیل سلولازی بالا و همچنین بیان بالای سلولاز CMC3 تحت دو راه‌انداز مختلف در مخمر *P. pastoris* نشان دهنده توانایی مناسب این مخمر در بیان آنزیم‌های سلولازی است. پروتئین‌های نوترکیب تولید شده دارای وزن مولکولی نزدیک به ۵۰ کیلوالتون بودند که نشان‌دهنده افزایش وزن مولکولی پروتئین نوترکیب بیان شده تحت کنترل هر دو راه‌انداز نسبت به وزن مولکولی طبیعی سلولاز CMC3 با ۴۲ کیلوالتون

نتایج اولیه نشان داد که هر سه روش خوراک‌دهی موجب بیان مناسب پروتئین CMC3 در میزبان می‌شوند (جدول ۲). مقایسه روش‌های مختلف خوراک‌دهی نشان داد که بین روش‌های مختلف خوراک‌دهی روش الف (افزودن مقادیر ۰.۵، ۱، ۱ و ۱ درصد حجمی / حجمی متانول در طی روزهای القا بیان آنزیم) با تولید ۵۷۶ واحد آنزیم نسبت به روش ب با ۴۸۷ و روش پ با ۵۲۳ واحد آنزیم با اختلاف دارای بیشترین بیان آنزیم سلولاز بود (جدول ۲) و در ادامه این روش خوراک‌دهی برای راه‌انداز MOX مورد استفاده قرار گرفت. مطابق نتایج به‌دست آمده در مطالعات قبلی در این آزمایشگاه (آزمایشگاه مهندسی زیستی دانشگاه شهید بهشتی) بهترین روش خوراک‌دهی برای راه‌انداز AOX1 به صورت افزایش روزانه ۰.۵، ۱، ۱ و ۱ درصد حجمی / حجمی است که در این تحقیق نیز همین روش استفاده شد. بیان اولیه به‌دست آمده نشان داد که علی‌رغم تفاوت گسترده توالی بین راه‌انداز سنتی AOX1 با طول ۹۳۹ باز و راه‌انداز MOX با طول ۵۳۳ باز، ماشین رونویسی این مخمر با موفقیت توانست نقطه صحیح شروع رونویسی را تشخیص و پروتئینی با فعالیت صحیح متابولیکی تولید کند. استفاده از راه‌اندازهای مخمرهای متیل‌دوست به‌صورت هترولوگ گزارش شده‌است. بیشتر از راه‌انداز AOX1 مخمر *P. pastoris* برای بیان پروتئین در مخمر *H. polymorpha* استفاده شده‌است (Raschke et al. 1996). استفاده از راه‌انداز مخمر *H. polymorpha* به‌صورت هترولوگ در *P. pastoris* گزارش نشده‌است و این نخستین گزارش در مورد استفاده از یک راه‌انداز هترولوگ قدرتمند برای بیان پروتئین نوترکیب در مخمر *P. pastoris* است. گزارشات مختلفی در خصوص شباهت ژنتیکی مسیر متابولیسم متانول در مخمرهای متیل‌دوست وجود دارد (Egli et al. 1980; Tschopp et al. 1987) نتایج مطابق با گزارشات پیشین شباهت تنظیم مسیر متابولیسم متانول را نشان می‌دهد چرا که تنظیم موفق راه‌انداز هترولوگ MOX در میزبانی غیر از میزبان طبیعی آن نشان می‌دهد سیستم تنظیمی ژن‌های مسیر متابولیسم متانول، بالاخص ژن الکل اکسیداز، در میان مخمرهای متیل‌دوست شباهت بالایی دارد. پس از ۴۸ ساعت خوراک‌دهی با متانول نتایج تولید قدرتمند آنزیم CMC3 تحت کنترل راه‌اندازهای AOX1 و MOX را نشان داد (شکل ۳).

گرفت. نتایج نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنادار در میزان رشد بین مخمرها بود (شکل ۶). با توجه به الگوی خوراک دهی یکسان و عدم وجود اختلاف معنادار در الگوی رشدی کلون های حاوی سازه های MOX- CMC3 و AOX1- CMC3 می توان این چنین استدلال کرد که بر اثر القا شدید راه انداز MOX تحت خوراک دهی با متانول (همچون راه انداز قدرتمند AOX1) نخستین گام در حفظ ایمنی سلول در مقابله با اثرات سمی متانول یعنی تغییر شکل آن به مولکولی با سمیت کمتر به خوبی انجام گرفته است که اثر مثبت خود را بر حفظ رشد مناسب همچون کلون دارای راه انداز AOX1 نشان داده است.



شکل ۵- بررسی بیان پروتئین های نو ترکیب CMC3 تحت کنترل راه انداز MOX و AOX1 پس از ۹۶ ساعت رشد و خوراک دهی با متانول.



شکل ۶- بررسی رشد مخمرهای بیان کننده پروتئین های نو ترکیب CMC3 تحت کنترل راه اندازهای MOX و AOX1 پس از ۹۶ ساعت رشد و خوراک دهی با متانول.

بود (شکل ۴ ب). افزایش وزن مولکولی پروتئین نو ترکیب در مخمر *P. pastoris* به دلیل گلیکوزیلاسیون بالا در تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است (Boer et al. 2000). آنزیم CMC3 دارای دو جایگاه ان- گلیکوزیلاسیون و چندین جایگاه بالقوه ا- گلیکوزیلاسیون است که بیش- گلیکوزیلاسیون می تواند عامل این اختلاف وزن مولکولی بین پروتئین نو ترکیب و غیرنو ترکیب باشد. بیان پروتئین نو ترکیب CMC3 و نحوه رشد مخمر *P. pastoris* تحت دو راه انداز مختلف طی یک دوره ۹۶ ساعته خوراک دهی با متانول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج افزایش معنادار و پیوسته بیان آنزیم سلولاز CMC3 تحت کنترل دو راه انداز MOX و AOX1 با افزایش زمان خوراک دهی با متانول را تا ۹۶ ساعت نشان دادند (شکل ۵). این نتایج بیان بالاتر آنزیم CMC3 تحت کنترل راه انداز AOX1 در مقایسه با راه انداز MOX را نشان دادند. پس از ۹۶ ساعت به صورت میانگین بیش از ۷۲۷ و ۶۳۰ واحد آنزیم CMC3 به ترتیب تحت کنترل راه انداز AOX1 و MOX تولید شد که نشان دهنده تقریباً ۱۳ درصد بیان بیشتر تحت راه انداز AOX1 بود. راه انداز AOX1 بیش از دو دهه است که مورد دست ورزی های مختلف قرار گرفته است که این موضوع بر قدرت این راه انداز به شدت افزوده است (Portela et al. 2017). با توجه به محدود بودن تعداد راه اندازهای قدرتمند در مخمر *P. pastoris*، مهندسی راه انداز به شدت مورد توجه بوده است و به عنوان یکی از راهکارهای مؤثر برای بهبود تولید پروتئین نو ترکیب در این مخمر مورد بحث قرار گرفته است (Weinhandl et al. 2014). از روش های گوناگونی مانند ¹ PCR- Ep و یا جهش زایی هدفمند برای مهندسی راه انداز استفاده می شود که با توجه به عدم شناخت کافی از نحوه تنظیم دقیق راه اندازهای مخمری به شدت به طول راه انداز وابسته است و از این روی کاربرد راه انداز کوتاه بسیار مورد توجه است (Redden and Alper 2015).

طول کوتاه تر راه انداز MOX امکان مهندسی آن را نسبت به راه انداز AOX1 آسان تر می کند که می تواند برای محققین این حوزه بسیار جذاب باشد. وضعیت رشد مخمرهای حامل ناقل های بیانی طی ۹۶ ساعت خوراک دهی با متانول مورد بررسی قرار

¹ Error pron- PCR

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه راه انداز کوتاه MOX از مخمر *Hansenula polymorpha* برای کاربرد هترولوگ در بیان پروتئین نو ترکیب تحت خوراک دهی با متانول در مخمر *Pichia pastoris* مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بیان موفق و قابل مقایسه آنزیم CMC3 تحت کنترل این راه انداز با راه انداز متداول AOX1 را نشان دادند. این مطالعه گزارشی در خصوص کاربرد موفق یک راه انداز از سایر مخمرها به صورت هترولوگوگ جهت تولید پروتئین نو ترکیب در مخمر *P. pastoris* است.

در این تحقیق از توالی راهنمای طبیعی آنزیم سلولاز CMC3 به طول ۱۶ اسید آمینه با توالی MKHSVLAGLFATG جهت ترشح پروتئین نو ترکیب به محیط کشت استفاده شد که بر اساس نتایج توانسته است پروتئین تولیدی را با موفقیت به محیط کشت ترشح کند و می تواند به عنوان توالی ترشحی جدیدی جهت ترشح پروتئین نو ترکیب به محیط بیرون سلول مخمر *P. pastoris* مورد بررسی های بیشتری قرار گیرد.

منابع

- Abad S, Kerstin K, Astrid H, Ulrike S, Franz SH, Anton G (2010) Real-Time PCR-Based Determination of Gene Copy Numbers in *Pichia Pastoris*. *Biotechnology Journal* 5:413-20.
- Avgerinos GC, Turner BG, Gorelick KJ, Papendieck A, Weydemann U, Gellissen G (2001) Production and Clinical Development of a *Hansenula Polymorpha*-Derived PEGylated Hirudin. In: *Thrombosis and Hemostasis Congress* 27:357-71.
- Boonvitthya N, Sophie B, Vorakan B, Michael JO, Warawut C (2013) Comparison of the Heterologous Expression of *Trichoderma Reesei* Endoglucanase II and Cellobiohydrolase II in the Yeasts *Pichia Pastoris* and *Yarrowia Lipolytica*. *Molecular Biotechnology* 54:158-69.
- Chen P, Fu TB, Ye XY (2011) Expression of a Secretory Beta-Glucosidase from *Trichoderma Reesei* in *Pichia Pastoris* and Its Characterization. *Biotechnol Letters* 33:2475-79.
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA (1989) Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia Pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* 9:1316-23.
- D'haene B, Vandesompele JO, Hellemans J (2010) Accurate and Objective Copy Number Profiling Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods* 50: 262-270.
- Egli Th, van Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A (1980) Methanol Metabolism in Yeasts: Regulation of the Synthesis of Catabolic Enzymes. *Archives of Microbiology* 124:115-21.
- Egli Th, Käppeli O, Fiechter A (1982) Regulatory Flexibility of Methylophilic Yeasts in Chemostat Cultures: Simultaneous Assimilation of Glucose and Methanol at a Fixed Dilution Rate. *Archives of Microbiology* 131:1-7.
- Gasser B, Matthias GS, Diethard M (2015) Methanol Regulated Yeast Promoters: Production Vehicles and Toolbox for Synthetic Biology. *Microbial Cell Factories* 14:196-219.
- Gastelum-Arellanez A, Paredes-López O, Olalde-Portugal V (2014) Extracellular Endoglucanase Activity from *Paenibacillus Polymyxa* BEB-40: Production, Optimization and Enzymatic Characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30:53-65.
- Gellissen G (2000) Heterologous Protein Production in Methylophilic Yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54:41-50.
- Gödecke S, Eckart M, Zbigniew AJ, Hollenberg CP (1994) Identification of Sequences Responsible for Transcriptional Regulation of the Strongly Expressed Methanol Oxidase-Encoding Gene in *Hansenula Polymorpha*. *Gene* 139:35-42.
- Haaning J, Oxvig C, Overgaard MT, Sottrup-Jensen L (1997) Simple and Reliable Procedure for PCR Amplification of Genomic DNA from Yeast Cells Using Short Sequencing Primers. *Biochemistry and Molecular Biology International* 42:169-72.
- Hasslacher M, Schall M, Marianne H, Rudolfo B, Karl R, Johannes L, Herfried G, Sepp DK, Schwab H (1997) High-Level Intracellular Expression of Hydroxynitrile Lyase from the Tropical Rubber Tree *Hevea Brasiliensis* in Microbial Hosts. *Protein Expression and Purification* 11:61-71.
- Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T, Olof enfors S (2006) Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia Pastoris*. *Biotechnology Progress* 22:1465-73.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-85.
- Mattanovich D, Branduardi P, Dato L, Gasser B, Sauer M, Porro D (2012) Recombinant Protein Production in Yeasts. *Methods in Molecular Biology* 824:329-58.

- Mellitzer A, Weis R, Glieder A, Flicker K (2012) Expression of Lignocellulolytic Enzymes in *Pichia Pastoris*. Microbial Cell Factories 11: 61-79.
- Miller G L (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry 31:426-28.
- Portela RMC, Vogl T, Ebner K, Oliveira R, Glieder A (2018) *Pichia Pastoris* Alcohol Oxidase 1 (AOX1) Core Promoter Engineering by High Resolution Systematic Mutagenesis. Biotechnology Journal 13: 17-31.
- Raschke WC, Neiditch BR, Hendricks M, Cregg JM-- (1996) Inducible Expression of a Heterologous Protein in *Hansenula Polymorpha* Using the Alcohol Oxidase 1 Promoter of *Pichia Pastoris*. Gene 177:163-67.
- Ravin, NV, Michael A, Vitaly EVK, Alexey VB, Schneider J, Eugenia S, Mardanova M, Zvereva M, Dontsova OA, Mardanov AV, Konstantin GS (2013) Genome Sequence and Analysis of Methylophilic Yeast *Hansenula Polymorpha* DL1. BMC Genomics 14: 814-837.
- Redden H, Alper HS (2015) The Development and Characterization of Synthetic Minimal Yeast Promoters. Nature Communications 6. DOI: 10.1038/ncomms8810.
- Shepherd CT, Adrienne NML, Paul S (2009) Determination of Transgene Copy Number by Real-Time Quantitative PCR. Methods in Molecular Biology 526: 129-134.
- Shuangqi T, Wang Z, Fan Z, Zuo L, Wang J (2011) Determination Methods of Cellulase Activity. African Journal of Biotechnology 10: 7122-7125.
- Sukumaran RK, Reeta RS, Ashok P (2005) Microbial Cellulases - Production, Applications and Challenges. Journal of Scientific and Industrial Research 64: 832-44.
- Tschopp JF, Paul FB, James MC, Cathy AS, Thomas RG (1987) Expression of the lacZ Gene from Two Methanol-Regulated Promoters in *Pichia Pastoris*. Nucleic Acids Research 15:3859-76.
- Vogl T, Glieder A (2013) Regulation of *Pichia Pastoris* Promoters and Its Consequences for Protein Production. New Biotechnology 30:385-404.
- Weinhandl K, Winkler M, Glieder A, Camattari A (2014) Carbon Source Dependent Promoters in Yeasts. Microbial Cell Factories 13.5. doi: 10.1186/1475-2859-13-5.
- Werten MWT, Van Den Bosch TJ, Wind RD, Mooibroek H, De Wolf F (1999) High-Yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia Pastoris*. Yeast 15:1087-96.
- Wongwisansri S, Peerada P, Panida M, Roongsawang N, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S (2013) High-Level Production of Thermotolerant β -Xylosidase of *Aspergillus* Sp. BCC125 in *Pichia Pastoris*: Characterization and Its Application in Ethanol Production. Bioresource Technology 132:410-13.
- Wray W, Boulikas T, Virginia W, Hancock R (1981) Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry 118:197-203.