ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٥٨٥ - ٥٧٧

همسانه‌سازی ژن کراتیناز در اشرشیاکلی و بررسی برخی از خصوصیات بیوانفورماتیکی آن

Keratinase gene Cloning in *Escherichia coli* and investigating some of its bioinformatics features

سمیه رحیم‌نهال[۱]، جمال فیاضی[*۱]، امیر میمندی‌پور[۲]، محمدتقی بیگی نصیری[۱]، مهدی شمس‌آرا[۲]، علی‌اصغر کارخانه‌ای[۲]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، دانشیار، استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- استادیاران، گروه بیوتکنولوژی حیوانی، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

Rahimnahal S[1], Fayazi J[*1], Meimandipour A[2], Beigi Nassiri MT[1], Shamsara M[2], Karkhane AA[2]

1- Graduated PhD Student, Associate Professor, Professor, Department of Animal Science, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2- Assistant Professors, Department of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: j_fayazi@ramin.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/١/٢٠ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٢/١٣)

چکیده

کراتیناز از آنزیم‌های پروتئولیتیک در طبیعت می‌باشد. این آنزیم تنها در حضور سوبسترای کراتین تولید می‌شود و عمدتاً پیوندهای دی‌سولفیدی را مورد هدف قرار می‌دهد. در این مطالعه از سویه باکتریایی *Bacillus licheniformis* که قبلا از بستر مرغداری جدا شده بود، برای استخراج ژن کراتیناز استفاده شد. واکنش تکثیر ژن کراتیناز با روش PCR با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده از باکتری بومی انجام شد. پس از خالص‌سازی، ژن کراتیناز با روش همسانه‌سازی T/A به ناقل pTZ57R/T منتقل شد. پس از انجام واکنش اتصال بین محصول PCR و حامل pTZ57R/T، ترنسفورم محصولات لایگیشن به باکتری اشرشیاکلی سویه *DH5α* صورت گرفت. انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای F. B. 1 و R. B. 1 روی پلاسمید *ker-* pTZ57R/T، منجر به تکثیر ژن *کراتیناز* به‌طول ١١٦٤ جفت‌باز شد که دارای توالی برش آنزیم‌های *Xho*I و *Nco*I برای انتقال مناسب به وکتور بیانی pET-26b(+) بودند. استخراج پلاسمید نوترکیب از کلنی‌های شناسایی شده صورت گرفت و به باکتری اشرشیاکلی سویه *BL21* انتقال داده شد که رشد کلنی‌های باکتریایی بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین نشان از انتقال موفقیت‌آمیز سازه *ker*-pET-26b(+) به این سویه داشت. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر انجام شد. وزن مولکولی پس از ترجمه توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئینی معادل ٣٩٨٧٩/٨٨ کیلو دالتون تخمین زده شد. بار خالص پروتئین معادل ٠/٠٠٩- با ضریب آلیفاتیک ٨٤/٧٣ و دارای سیگنال پپتیدی می‌باشد. این آنزیم یک سرین پروتئاز با جایگاه‌های فعال اسیدآمینه آسپارتیک ١٣٧، هیستیدین ١٦٨ و اسید آمینه سرین ٣٢٥ می‌باشد. به‌طورکلی نتایج مطالعات بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که آنزیم کراتیناز مورد مطالعه در دسته آنزیم‌های پایدار قرار می‌گیرد که قابلیت استفاده در صنایع مختلف را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

اشرشیاکلی
خصوصیات بیوانفورماتیکی
ژن کراتیناز
همسانه‌سازی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]

مقدمه

اختصاصی‌ترین صفت پرنده، داشتن پر است. در سراسر جهان، سالانه بیش از ۲۴ میلیارد مرغ کشتار شده که از این تعداد چیزی در حدود ۸/۵ میلیون تن پر تولید می‌شود. در حال حاضر از پودر پر برای تغذیه دام و نیز با توجه به محتوای بالای نیتروژن آن، از پر برای تولید کود حاصل‌خیز در زمین‌های کشاورزی استفاده می‌شود (Abdoli et al. 2014; Kondamudi et al. 2009). پر از ۹۰ تا ۹۲ درصد پروتئین (کراتین) و ۱ تا ۸ درصد چربی تشکیل شده‌است (Forgács et al. 2013). این ماده خوراکی مورد استفاده در تغذیه دام، حاوی ۴/۵ الی ۵ درصد سیستئین با قابلیت هضم ۶۰ درصد می‌باشد و از نظر بعضی از اسیدهای آمینه مانند لیزین محدودیت دارد. انرژی قابل متابولیسم آن ۳۳۰۰ کیلو کالری در کیلوگرم می‌باشد و ویتامین‌های موجود در آن به‌خصوص ویتامین‌های دسته B در حدود دانه غلات می‌باشد (Deivasigamani and Alagappan 2008). در ابتدا برای تجزیه پر از هیدرولیز قلیایی و فشار بخار استفاده می‌شد که این روش باعث تخریب اسیدهای آمینه‌ی ضروری مثل متیونین، لیزین و هیستیدین و در نتیجه تولید مواد مغذی با ارزش پائین بوده و همچنین روشی بسیار هزینه‌بر بود (Matikeviciene et al. 2009). بنابراین در سال‌های اخیر جهت غلبه بر این محدودیت استفاده از آنزیم‌های میکروبی جهت بهبود ارزش غذایی پر رواج پیدا کرده است (Kumar and Singh 2013). کراتین می‌تواند به‌وسیله کراتیناز ترشح شده توسط بعضی از میکروارگانیسم‌ها که به‌طور طبیعی کراتین را به مولکول‌های کوچکتر و قابل جذب و در نهایت قابل استفاده به‌عنوان یک منبع غذایی برای رشد باکتری‌ها، تبدیل می‌کنند، تجزیه شود (Bernal et al. 2006). کراتیناز از آنزیم‌های پروتئولیتیک در طبیعت می‌باشد (Tatineni et al. 2008). این آنزیم تنها در حضور سوبسترای کراتین تولید می‌شود و عمدتاً پیوندهای دی‌سولفیدی را مورد هدف قرار می‌دهد. گزارش‌های زیادی مبنی بر تولید کراتیناز توسط میکروارگانیسم‌های مختلف وجود دارد (Kojima et al. 2006; Riffel et al. 2007; Wang et al. 2010) این آنزیم توسط قارچ‌ها، استرپتومایسس و باکتری‌ها در pH قلیایی و درجه حرارت بالا تولید می‌شود (Poopathi et al. 2014). کراتیناز تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها، در تغذیه، تهیه کود، در صنایع پاک کننده‌ها و چرم‌سازی، داروسازی و در تکنولوژی تخمیر در صنایع کاربردی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Gupta and Ramnani 2006). برای مثال کراتیناز حاصل از *B.licheniformis* PWD-1 و *Virio sp.* kr2 که در هیدرولیز پر نقش دارند، می‌توانند در تغذیه دام به‌کار روند (Odetallah et al. 2003). هم‌چنین این آنزیم می‌توانند عفونت ناشی از prion را با حضور پاک کننده‌ها و تیمار دمایی کاهش دهد. در صنایع چرم‌سازی، کراتیناز حاصل از *B. subtilis S14* قابلیت چشمگیری در زدودن موهای روی پوست دارد بدون اینکه باعث تجزیه کلاژن شود (Macedo et al. 2005). میکروارگانیسم‌های قلیادوست به‌طور وسیعی در طبیعت پراکنده شده‌اند و تقریباً می‌توان آن‌ها را در همه جا یافت نمود. در میان این میکروارگانیسم‌ها، گونه‌های باسیلوس از اهمیت قابل توجهی در برنامه‌های کاربردی بیوتکنولوژی برخوردار می‌باشند.

گروهی از محققین پس از بررسی کراتیناز تولیدی حاصل از *Bacillus sp.* در تجزیه پودر پر به این نتیجه دست پیدا کردند که پر هیدرولیز شده توسط میکروارگانیسم‌ها دارای درصد بیش‌تری از آمینواسیدهای ضروری جهت تغذیه دام نسبت به پر هیدرولیز شده توسط روش‌های مکانیکی، هستند (Deivasigamani and Alagappan 2008). در سال ۲۰۱۲، گروهی از محققین به مطالعه‌ی جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات باکتری‌های تجزیه‌کننده پر پرداختند. نتایج مطالعات موروفولوژی و بیوشیمیایی، باکتری‌های موجود را جزء باسیلوس‌ها معرفی کردند. این محققین هم‌چنین گزارش کردند که، باکتری‌های تولید کننده کراتیناز گونه باسیلوس، در شرایط خاص؛ pH ۷–۷/۵، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، حضور ۲ درصد پودر پر به‌عنوان سوبسترا و کشت به مدت ۹۶ ساعت، در دسته پروتئازهای قلیایی قرار می‌گیرند (Pandian et al. 2012).

به‌طورکلی استفاده از آنزیم‌ها به‌عنوان یک افزودنی در تغذیه دام به سرعت افزایش یافته است. در دهه گذشته، مطالعات زیادی به‌منظور بررسی اثر آنزیم‌های اگزوژنوز بر عملکرد طیور صورت گرفته است. با بررسی این مطالعات می‌توان به یک نتیجه واحد دست پیدا کرد که، آنزیم یک ابزار مهم برای استفاده در خوراک طیور می‌باشد. هرچند منافع اقتصادی و اجتماعی آنزیم‌ها به

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]

خوبی واضح و آشکار می‌باشد. با این حال، برای رسیدن آنزیم‌ها به پتانسیل کامل خود در صنعت، به‌ویژه برای مطابقت سطوح مختلف آنزیم و سوبسترا و چگونگی عملکرد آن در محیط‌های متغیر روده حیوانات مختلف، به تحقیقات بیش‌تری نیاز است. از طرفی حیوانات اهلی می‌توانند منابع مسمومیت غذایی انسان باشند، لذا برای کاهش یا حذف این خطر باید استراتژهایی برای جلوگیری از ورود عفونت‌های حیوانی به زنجیره غذایی انسان توسعه پیدا کنند (Ahsani et al. 2011). PCR از مدرن‌ترین تکنولوژی‌ها در تشخیص بیماری‌های عفونی در مقایسه با تکنیک‌های سنتی است و نشان داده شده که بسیار سریع‌تر و قابل اعتمادتر است و در طی چند ساعت نتایج قابل مشاهده هستند. PCR تشخیص سریع‌تر و مستقیم عفونت‌های باکتریایی را مستقیما از نمونه‌های کلینیکی فراهم می‌آورد (Ahsani et al. 2010). هم‌چنین با پیشرفت علم ژنتیک، تمایل برای شناخت هرچه بیش‌تر ژن‌ها به‌منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت. ژن به‌عنوان عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به‌صورتی که در چند دهه اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به‌طور گسترده‌ای افزایش یافته است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به‌دست آمده به‌وسیله علم بیوانفورماتیک از تحلیل داده‌های زیستی، در بررسی توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند (Hadizadeh et al. 2013; Hadizadeh et al. 2014). لذا، هدف این پژوهش همسانه‌سازی ژن کراتیناز در اشرشیاکلی و بررسی برخی از خصوصیات بیوانفورماتیکی آن بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از سویه باکتریایی *B. licheniformis* که قبلا از بستر مرغداری جدا شده بود و به‌عنوان یک سویه جدید در پایگاه اطلاعات داده‌ای با شماره دسترسی LT669765.1 و استوک آن در ۷۰°C- نگهداری شده بود برای استخراج ژن کراتیناز استفاده شد.

سویه‌های اشرشیاکلای *DH5α* و *Bl21* به‌عنوان میزبان‌های کلونینگ موجود در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران استفاده شد.

از استوک باکتری جدا شده‌ی موجود در ۷۰°C-، در محیط کشت نوترینت براث[1]، کشت داده شد. پس از این که کدورت (OD[2]) محیط کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/٤ رسید، ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت را که حاوی حدوداً 10^9 باکتری بود، به مدت ۱۰ دقیقه با ٤۰۰۰g سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد. سپس استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA (peqlab) و مطابق دستورالعمل آن انجام پذیرفت. با استفاده از دستگاه نانودراپ ND-1000 اسپکتروفتومتر (Thermo, USA)، غلظت DNA استخراج شده و هم‌چنین نسبت جذب نوری اسیدنوکلئیک در ۲٦۰nm، به جذب نوری بقایای پروتئینی آن در ۲۸۰nm اندازه‌گیری شد. با انجام الکتروفورز ژل آگارز، غلظت و خلوص DNA استخراج شده بررسی شد.

جهت استخراج ژن کراتیناز از ژنوم باکتری و تکثیر آن، آغازگرهای مستقیم و معکوس با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ابتدا و انتهای ژن بر اساس توالی ژن کراتیناز سویه‌های ثبت شده در NCBI که بیش‌ترین شباهت (با شباهت ۹۹ درصد) را در BLAST کردن ژن‌های ثبت شده از کراتیناز در سویه‌های مختلف، با هم داشتند، طراحی شدند (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi). به‌منظور اتصال ژن به حامل بیانی که در این مطالعه، pET-26b(+) انتخاب شده بود، جایگاه برش آنزیم‌های برشی مناسب، در توالی آغازگرها لحاظ شد. برای انتخاب آنزیم محدودالاثر مناسب، از بین آنزیم‌هایی که در جایگاه کلونینگ چندگانه (MCS) حامل pET-26b(+)، جایگاه برش داشتند، آنزیم‌هایی انتخاب شدند که روی ژن جایگاه برش نداشتند و شرایط بافری مورد نیاز برای عملکردشان نیز مشابه بود. با توجه به نکات فوق، آنزیم‌های *Nco*I و *Xho*I به‌عنوان آنزیم‌های برشی انتخاب شدند. پس از طراحی آغازگرها، با BLAST کردن آن‌ها با حامل و ژن کراتیناز حاصل از سویه‌ای که با آن طراحی پرایمر شده بود، از عدم اتصال

[1] Nutrient broth
[2] Optical density

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5] [Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]

آن‌ها به حامل و هم‌چنین ژن کراتیناز غیر از ابتدا و انتهای ژن، اطمینان حاصل شد. هم‌چنین صحت قاب خواندن ژن هنگام ترجمه، پس از اتصال به حامل بیانی(+)pET-26b، از کد شروع تا کد پایان، با استفاده از ابزار ترجمه سایت ExPASy بررسی شد (http://www.expasy.org). توالی نهایی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن کراتیناز حاصل از باکتری مورد نظر، در جدول ۱ آورده شده‌است. واکنش با استفاده از کیت مستر میکس لیوفیلیزه شرکت Bioneer (کره جنوبی) در حجم نهایی ۲۰µL و طبق دستور زیر انجام شد: ۱µL از DNA استخراج شده با غلظت ۲۵۲ng/µL، ۰/۵µL از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و ۱۸µL از آب استریل در میکروتیوپ PCR PREMIX لیوفیلیزه شده مخلوط و درون دستگاه PCR قرار گرفت. برای واسرشت‌سازی اولیه، برنامه دمایی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ سیکل به صورت واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ٥٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت نود ثانیه و در آخر یک مرحله طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام شد. محصول تکثیر یافته توسط PCR در کنار مارکر ژنی ۱kb (Fermentase، آمریکا) بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. پس از تأیید صحت PCR، محصول تکثیر با استفاده از کیت AccuPrep Gel Gel purification kit (Bioneer، کره‌جنوبی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، از ژل خالص‌سازی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

پس از خالص‌سازی، ژن کراتیناز با روش همسانه‌سازی T/A به ناقل به‌منظور اتصال ژن کراتیناز بهpTZ57R/T منتقل شد. برای انجام این واکنش، ۱µL محصول خالص شده PCR (با غلظت ۳۵ng/µl)، ۱µL حامل pTZ57R/T (با غلظت ٥٥ng/µl)، ۱۰ واحد آنزیم T4 DNA لیگاز، ۱µL بافر آنزیم لیگاز (۱۰X) و ٦µL آب دو بار تقطیر در حجم نهایی ۱۰µL مخلوط و به صورت شبانه (١٦ ساعت)؛ ۱ ساعت در دمای ۲۲°C و ۱۵ ساعت در دمای ١٦°C، انکوبه شد. سپس محصول اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی به سویه *DH5α* اشرشیاکلی مستعد شده توسط کلرید کلسیم منتقل شد. کلنی‌های مثبت توسط غربالگری آبی/سفید با استفاده از X-gal و IPTG بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آمپی‌سیلین جداسازی شدند. برای تأیید حضور ژن هدف در کلنی‌های سفید، از روش کلنی–PCR استفاده شد. پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید AccuPrep Nano-plus Plasmid mini Extraction kit (Bioneer، کره‌جنوبی) استخراج شدند و برای تأیید همسانه‌سازی مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. پلاسمید مثبت به‌منظور بررسی وقوع جهش احتمالی برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران (تهران، ایران) ارسال شد. برای تعیین توالی از آغازگرهای عمومی[۱] M13 (-40) F و M13 (-40) R استفاده شد.

در این مطالعه از ناقل بیانی (+)pET-26b برای همسانه‌سازی دوباره ژن کراتیناز استفاده شد. استخراج حامل (+)pET-26b از استوک باکتری *E. coli DH5α* دارای این حامل، به روش لیز قلیایی و به‌صورت دستی و هم با کیت استخراج پلاسمید شرکت Bioneer انجام شد. واکنش برش آنزیمی حامل‌های pTZ57R/T نوترکیب (*ker*- pTZ57R/T) و (+)pET-26b، با آنزیم‌های *Nco*I و *Xho*I انجام شد. پس از الکتروفورز محصول برش آنزیمی حامل *ker*- pTZ57R/T، در ژل آگارز و رنگ‌آمیزی آن با اتیدیوم بروماید، قطعه هدف به‌وسیله اسکالپل با دقت از ژل بریده شد و در ویال استریل که وزن آن قبلاً اندازه‌گیری شده بود قرار گرفت. با وزن کردن مجدد ویال، وزن قطعه بریده شده تعیین شد. سپس خالص‌سازی DNA از ژل، با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR، و مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. هم‌چنین، محصول برش آنزیمی حامل (+)pET-26b، با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR، و مطابق دستورالعمل کیت، خالص شد. در نهایت، غلظت و کیفیت نمونه‌های خالص شده، با استفاده از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. به‌منظور اتصال ژن *کراتیناز* به حامل بیانی (+)pET-26b، ترکیبات واکنش مطابق جدول ۲ با هم مخلوط و به صورت شبانه (١٦ ساعت)؛ ۱ ساعت در دمای ۲۲°C و ۱۵ ساعت در دمای ١٦°C، انکوبه شد. برای انجام واکنش الحاق، مولاریته ژن را سه برابر مولاریته حامل در نظر گرفتیم. حجم کلی واکنش ۲۰ میکرولیتر بود.

[1] Universal primers

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن کراتیناز.

نام آغازگر	توالی	مشخصات
F. B. 1 (*Nco*I enzyme)	5′-GCCATGGTGAGGAAAAAGAGTTTTTG-3′	GC%: 42.3 No. Bases: 26 Tm: 62
R. B. 1 (*Xho*I enzyme)	5′-ATCTCGAGTTGAGCGGCACCTTCGAC-3′	GC%: 57.7 No. Bases: 26 Tm: 54

جدول ۲- ترکیبات مورد نیاز برای اتصال ژن کراتیناز به حامل بیانی pET-26b(+).

ترکیبات	غلظت	مقدار (میکرولیتر)
حامل pET-26b(+)	٤٠ نانوگرم بر میکرولیتر	۲
ژن *کراتیناز*	۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر	٤
آنزیم T_4 لیگاز	۱۰ واحد بر میکرولیتر	۲
بافر آنزیم T4 لیگاز	۱۰X	۲
آب مقطر استریل	-	۱۰

مقدار ۲۰µL حامل pET-26b(+) نوترکیب (*ker*-pET-26b)، به روش شوک حرارتی، به ۱۰۰µL باکتری *E.coli DH5α* مستعد شده، منتقل شد. برای کشت باکتری از پلیت LB آگار حاوی کانامایسین استفاده شد. پلیت به‌صورت شبانه (١٦ ساعت) در انکوباتور با دمای ۳۷^{o}C قرار گرفت. حامل pET-26b(+) دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌باشد؛ بنابراین، همه کلنی‌هایی که در محیط کشت حاوی این آنتی‌بیوتیک رشد کردند، حامل pET-26b(+) را دریافت کرده‌اند. به‌منظور شناسایی کلنی‌هایی که حامل *ker*- pET-26b(+) را دریافت کرده‌اند، از روش‌های؛ بررسی اختلاف حرکت DNA پس از استخراج پلاسمید بر روی ژل آگارز، واکنش PCR با پلاسمیدهای نوترکیب و واکنش برش آنزیمی با آنزیم‌های *Xho*I و *Nco*I استفاده شد. به‌منظور تعیین توالی ژن کراتیناز، ۳۰µL از *ker*-pET-26b(+) استخراج شده از باکتری *E.coli DH5α*، به‌همراه ٥µL از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت عمومی حامل pET-26b(+)، (T7promoter و T7terminator)، به شرکت ژن فناوران ارسال شد. استخراج پلاسمید، با کیت و مطابق دستورالعمل آن انجام شد. پس از دریافت نتیجه تعیین توالی، کیفیت توالی با توجه به ارتفاع امواج ثبتی حاصل بررسی شد (با استفاده از نرم‌افزار Chromas v1.45). سپس، توالی حاصل با استفاده از نرم‌افزار BLAST در پایگاه داده NCBI با توالی ژن کراتیناز باکتری‌های مختلف مقایسه شد. هم‌چنین توالی حاصل با استفاده از ابزار ترجمه سایت ExPASy از نظر قاب خواندن ترجمه نیز مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۱۰µl حامل *ker*-pET-26b(+)، به روش شوک حرارتی، به ۱۰۰µL باکتری *E.coli BL21* مستعد شده، منتقل شد.

در این مطالعه با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و نرم‌افزارهای آنلاین به پیش‌بینی برخی خصوصیات بیوشیمیایی آنزیم کراتیناز مورد نظر پرداخته شد. توالی نوکلئوتیدی ژن کراتیناز با استفاده از برنامه Translate (www.expasy.ch/tools/dna.html)، به توالی آمینواسیدی ترجمه شد و خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین از قبیل وزن مولکولی[1]، نقطه ایزوالکتریک[2]، شاخص ناپایداری[3]، ضریب آلیفاتیک[4] و بار

1 Molecular weight
2 Isoelectric point
3 Instability index
4 Aliphatic index

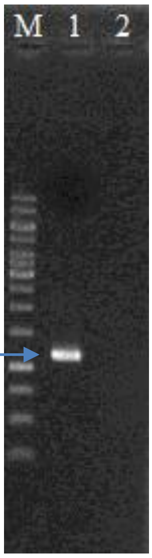
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]

خالص[1] پروتئین، با استفاده از برنامه protparam مورد بررسی قرار گرفت (www.expasy.org/tools/protpar-ref.html). بررسی امکان وجود پیوند دی‌سولفید توسط پایگاه اینترنتی DISULFIND انجام شد. درصد GC در مورد توالی کدکننده آنزیم، با برنامهGC Calculator Genom محاسبه شد (www.sciencelauncher.com/oligocalc.html). بررسی وجود سیگنال پپتید، با کمک برنامه SignalP 4.1 انجام شد (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP).

نتایج و بحث

پس از کشت باکتری، با استفاده از کیت استخراج DNA، ۵۰µL DNA با غلظت ۳۸۰/٤ ng/µL حاصل شد. DNA استخراج شده روی ژل یک درصد آگارز الکتروفورز شد و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد (شکل ۱). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ژن کراتیناز باکتری *Bacillus licheniformis* با روش PCR تکثیر شد و سپس روی ژل آگارز بررسی شد. همانطورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، در چاهک شماره‌ی ۱، تک‌باند خالص و با وضوح بالا، مربوط به ژن تکثیر شده‌ی کراتیناز با اندازه‌ی ۱۱٦٤ bp می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۲ مربوط به نمونه کنترل منفی PCR می‌باشد. پس از انجام واکنش اتصال بین محصول PCR و حامل pTZ57R/T، ترنسفورم محصولات لایگیشن به سویه *DH5α* باکتری اشرشیاکلی صورت گرفت. وجود کلنی‌های سفید بر روی محیط LB جامد دارای IPTG و Xgal نشان داد که پلاسمید نوترکیب (حاوی ژن کراتیناز) به درستی به درون باکتری منتقل شده‌است. با استفاده از روش کلنی–PCR و هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب استخراج شده، از صحت همسانه‌سازی و حضور ژن هدف در کلنی‌های سفید اطمینان حاصل شد (شکل ۳). پلاسمیدهای نوترکیب تایید شده با PCR و برش آنزیمی، جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال شدند. توالی‌های به‌دست آمده از پلاسمیدها پس از BLAST کردن در پایگاه بانک ژن NCBI با توالی‌های ژن کراتیناز ثبت شده از سویه‌های مختلف، نشان داد که ژن کراتیناز به درستی تکثیر و همسانه‌سازی صورت گرفته است. انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای F. B. 1 و R. B. 1 روی پلاسمید *ker*-pTZ57R/T، منجر به تکثیر ژن کراتیناز به طول ۱۱٦٤ جفت‌باز شد که دارای توالی برش آنزیم‌های برشی *Xho*I و *Nco*I برای انتقال مناسب به وکتور بیانی pET-26b(+) بودند (شکل ۳).

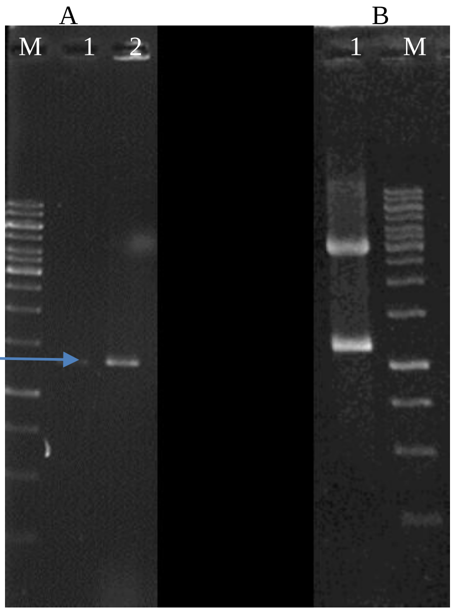
شکل ۱– الکتروفورز DNA استخراج شده از ژنوم باکتری ۱) نشان‌گر اندازه مولکولی DNA، ۲و۳) DNA ژنومی باکتری Bacillus licheniformis.



شکل ۲– الکتروفورز ژن کراتیناز تکثیرشده به روش PCR. M) نشانگر اندازه مولکولی DNA، چاهک ۱) محصول PCR (ژن کراتیناز)، چاهک ۲) کنترل منفی (PCR بدون DNA ژنومی).

[1] Net charge

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]



شکل ۳- A. M نشانگر اندازه مولکولی DNA (1kb) ۱) تکثیر ژن کراتیناز به‌طول ۱۱٦٤ جفت‌باز. B. ۱) روش کلنی-PCR جهت تایید کلونینگ.

کلنی‌های باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب *ker*-pET-26b(+) با روش‌های کلنی- PCR و برش آنزیمی، شناسایی شدند که نشان از همسانه‌سازی صحیح ژن کراتیناز در سویه‌ی *DH5α* از باکتری اشرشیاکلی داشت. استخراج پلاسمید نوترکیب از کلنی‌های شناسایی شده صورت گرفت و به باکتری اشرشیاکلی سویه *BL21* انتقال داده شده که رشد کلنی‌های باکتریایی بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین نشان از ترنسفورم موفقیت‌آمیز سازه *ker*-pET-26b(+) به این سویه داشت.

گروهی از محققین در سال ۲۰۰۷، به مطالعه کلونینگ و بیان ژن کراتیناز در *Bacillus megaterium* و بهینه‌سازی شرایط تخمیر برای تولید کراتیناز توسط سویه‌های نوترکیب پرداختند. در این مطالعه ژن کراتیناز به طول 1/14 kbp از DNA ژنومی *B. licheniformis* سویه‌ی MKU3، استخراج و با استفاده از پرایمرهای KERORF-F و KERORF-R و با روش PCR تکثیر، و در pTZ57R/T کلون شدند. نتیجه توالی‌یابی این قطعه نشان داد که حاوی ۱۱۳۷ نوکلئوتید می‌باشد. در نتیجه دارای ۳۷۹ اسید آمینه می‌باشد که ۳۵۰ تای آن‌ها کدکننده پروکراتیناز بوده و مابقی سیگنال‌های پپتیدی می‌باشند. توالی اسید آمینه‌ای ژن کراتیناز حاصل از *B. licheniformis* MKU3، ۹۹ درصد با توالی اسیدآمینه‌ای ژن کراتیناز حاصل از *B. licheniformis* PWD1 و ۹۸ درصد با توالی اسید آمینه‌ای ژن کراتیناز حاصل از *B. licheniformis* 6816 مشابهت داشت (Radha and Gunasekaran 2007). Alinezhad and Mirabdollah (2009)، ژن کراتیناز را از *B. licheniformis* استخراج نموده و با استفاده از پرایمرهای *Bgl*II-B.M-*ker*A–Forward و *Sph*I-B.M-*ker*A–Reverse با روش PCR تکثیر نمودند. ژن تکثیر یافته از روی ژل جدا شده و توسط آنزیم‌های برشی *Bgl*II و *Sph*I مورد هضم قرار گرفتند و به وکتور بیانی pSTREPHIS1525.SPlipA از باسیلوس مگاتریوم متصل شدند.

در بررسی‌های بیوانفورماتیکی ژن کراتیناز، وزن مولکولی پس از ترجمه توالی نوکلئوتیدی به توالی پروتئینی توسط سایت http://web.expasy.org/translate معادل ۳۹۸۷۹/۸۸ کیلو دالتون تخمین زده شد. برای بیان پایداری آنزیم از مقیاسی تحت عنوان شاخص ناپایداری استفاده شد. عددی که حاصل شد معادل ۸/٤٤ بود که با توجه به محدوده عددی کمتر از ٤۰ بیانگر پایداری آنزیم می‌باشد پس در نتیجه آنزیم کراتیناز مورد مطالعه در دسته آنزیم‌های پایدار قرار می‌گیرد. بار خالص پروتئین معادل ۰/۰۰۹- بوده بنابراین کروماتوگرافی تعویض آنیونی می‌تواند به‌عنوان یکی از راه‌هایی که جهت خالص‌سازی آنزیم به‌کار می‌رود، استفاده شود. ضریب آلیفاتیک آنزیم که بیان‌گر حجم اشغال شده توسط زنجیره جانبی اسیدآمینه‌های ALa، Val، Leu و Ile پروتئین می‌باشد ۸٤/۷۳ تعیین شد که نشان‌دهنده مقاومت حرارتی بالای این آنزیم است زیرا تعداد اسیدآمینه‌های آبگریز پروتئین‌های باکتری‌های گرمادوست بیش‌تر است که این موضوع احتمالاً دلیلی بر افزایش ضریب آلیفاتیک و نهایتاً افزایش پایداری حرارتی پروتئین‌ها می‌باشد (Ikai 1980). بر اساس نتایجی که از بررسی توالی آمینواسیدی در پایگاه DISULFIND حاصل شد، اگر مقابل عبارت DB_state عدد یک قرار گرفت به معنی احتمال وجود پیوند دی‌سولفید در توالی می‌باشد در حالی‌که برای توالی مورد نظر در این تحقیق عدد صفر ثبت شد که نشان‌دهنده عدم وجود پیوند دی‌سولفید می‌باشد. طی بررسی انجام شده با نرم‌افزار آنلاین SignalP این آنزیم دارای سیگنال پپتید بود زیرا برای وجود پپتید نشانه باید نمره‌ی D از ۰/٤٥ بیش‌تر باشد که برای پروتئین فوق عدد ۰/۷۰۳ ثبت شد که بر حضور سیگنال پپتید در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]

این تحقیق دلالت دارد. این آنزیم یک سرین پروتئاز با جایگاه‌های فعال اسیدآمینه آسپارتیک ۱۳۷، هیستیدین ۱۶۸ و اسید آمینه سرین ۳۲۵ می‌باشد. آنزیم‌ها نقش بسیار کلیدی در فرایندها و محصولات متعدد زیست فناوری ایفا می‌کنند. این فرایندها معمولاً شامل تولید مواد غذایی و نوشیدنی‌ها، پاک‌کننده‌ها، پوشاک، محصولات سلولزی، حمل و نقل، سوخت، دارو و غیره می‌شوند. بنابراین، آنزیم‌ها طیف گسترده‌ای از کاربردها را در صنایع مختلف نشان می‌دهند (Gurung et al. 2013). آنزیم کراتیناز در صنایع مختلف از جمله صنعت تولید خوراک دام، صنایع شوینده، صنعت چرم‌سازی و صنایع شیمیایی و فرآیندهای دارویی کاربرد دارد. نتایج مطالعه بیوانفورماتیکی این پژوهش نشان می‌دهد که آنزیم کراتیناز دارای پایداری خوب و مقاومت حرارتی بالایی بوده که با توجه به کاربرد این آنزیم در صنایع مختلف از جمله صنعت تولید خوراک دام، که دمای فرآوری تهیه خوراک دام بالا می‌باشد، این نتایج در جهت تولید این آنزیم بسیار قابل توجه خواهد بود.

تشکر و قدردانی

از مرکز ملی ژنتیک و زیست‌فناوری کشور به‌خاطر حمایت‌های مالی و آزمایشگاهی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به‌خاطر حمایت‌های مالی و معنوی تشکر می‌کنیم.

منابع

Abdoli MA, Mohamadi F, Ghobadian B, Fayyazi E (2014) Effective Parameters on Biodiesel Production from Feather fat oil as a Cost-Effective Feedstock. International Journal of Environmental Research 8:139-148.

Ahsani MR, Bafti MS, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR (2011) Genotyping of isolates of Clostridium perfringens from vaccinated and unvaccinated sheep. Small Ruminant Research 95:65-69.

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Shamsaddini MB (2010) Clostridium perfringens isolate typing by multiplex PCR. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 16:573-578.

Alinezhad S, Mirabdollah A (2009) Production of recombinant keratinase for poultry feather degradation. Master Thesis. University of Borås School of Engineering, Sweden.

Bernal C, Cairo J, Coello N (2006) Purification and characterization of a novel exocellular Keratinase from Kocuria rosea. Enzyme and Microbial Technology 38:49-54.

Deivasigamani B, Alagappan KM (2008) Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins. Journal of Environmental Biology 29: 933-936.

Forgács G, Lundin M, Taherzadeh MJ, Horváth IS (2013) Pretreatment of Chicken Feather Waste for Improved Biogas Production. Applied Biochemistry and Biotechnology 169:2016-2028.

Gupta R, Ramnani P (2006) Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied Microbiology and Biotechnology 70:21-33.

Gurung N, Ray S, Bose S, Ray V (2013) A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. Journal of Biomedicine and Biotechnology Article ID 329121: 1-18.

Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A, Esmailizadeh Koshkoiyeh AK, Mehdizadeh Gazooei Y, Molaei S (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of GDF9 gene in Tali and Beetal goats. Modern Genetics Journal (MGJ) 8:283-288. (In Farsi).

Hadizadeh M, Niazi A, Mohammad Abadi M, Esmailizadeh A, Mehdizadeh Gazooei Y (2014) Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genetics 9:117-120. (In Farsi).

Ikai A (1980) Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. The Journal of Biochemistry 88:1895-8.

Kojima M, Kanai M, Tominaga M, Kitzume S, Akira I, Horikoshi K (2006) Isolation and characterization of a feather degrading enzyme from Bacillus pseudofirmus FA30-01. Extremophiles 10:229-235.

Kondamudi N, Strull N, Misra M, Mohaptra S (2009) A green process for biodiesel from feather meal, American Chemical Society. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:6163-6166.

Kumar A, Singh S (2013) Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application. Critical Reviews in Biotechnology 33:365-378.

Macedo AJ, da Silva WOB, Gava R, Driemerier D, Henriques JAP Termignoni C (2005) Novel keratinase from Bacillus subtilis S14 exhibiting remarkable dehairing capabilites. Applied and Environmental Microbiology 71:594-596.

Matikeviciene V, Masiliûniene D, Grigiskis S (2009) Degradation of keratin containing wastes by bacteria with keratinolytic activity, Environment. Technology. Resources. Proceedings of the 7th International Scientific and Practical Conference. Lithuania.Volume 1.

Odetallah NH, Wang JJ, Garlich JD, Shih JCH (2003) Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. Poultry Science Journal 82:664-670.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]

Pandian S, Sundaram J, Panchatcharam P (2012) Isolation, identification and characterization of feather degrading bacteria. European Journal of Experimental Biology 2:274-282.

Poopathi S, Thirugnanasambantham K, Mani C, Lakshmi PV, Ragul K (2014) Purification and characterization of keratinase from feather degrading bacterium useful for mosquito control – A new report. Tropical Biomedicine 31:97-109.

Radha S, Gunasekaran P (2007) Cloning and expression of keratinase gene in Bacillus megaterium and optimization of fermentation conditions for the production of keratinase by recombinant strain. Journal of Applied Microbiology. 103:1301–1310.

Riffel A, Brandelli A, Bellato CM, Souza GHMF, Eberlin MN, Tavares FCA (2007) Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from Chryseobacterium sp. kr6. Journal of Biotechnology 128: 693-703.

Tatineni R, Doddapaneni KK, Potumarthi RC, Vellanki RN, Kandathil MT, Kolli N, Mangamoori LN (2008) Purification and characterization of an alkaline keratinase from Streptomyces sp. Bioresource Technology 99:1596-1602.

Wang K, Li G, Yu SQ, Zhang CT, Liu YH (2010) A novel metegenome-derived β-galactosidase: Gene cloning, overexpression, purification and characterization. Applied Microbiology and Biotechnology 88: 155-165.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.4.9.5]