

همسانه‌سازی، بیان و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *Bacillus licheniformis* *aprX* استخراج شده از باکتری

زهرا آقایی جشقانی^۱، رامین حسینی^{۲*}

۱. دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران

*نویسنده مسئول: r.hosseini@eng.ikiu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۳۰

پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۴

چکیده

هدف: پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی محسوب می‌شوند. به‌طور معمول برای تولید این آنزیم‌ها از باکتری‌های جنس *باسیلوس* استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش همسانه‌سازی، تعیین توالی، بیان و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *aprX* استخراج شده از باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* بوده است.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج DNA باکتریایی، ژن سرین پروتئاز با نام *aprX* از باکتری *Bacillus licheniformis* جداسازی و در ناقل pTG19-T و سپس ناقل pET28a(+) همسانه‌سازی شد و ساختار مولکولی، ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیلوژنتیکی آن بررسی شدند و ساختار سه‌بعدی آنزیم همسانه‌سازی شده پیش‌بینی شد. برای القای بیان ژن نوترکیب سرین پروتئاز از القاگر IPTG استفاده شد و بیان پروتئین در غلظت‌های مختلف IPTG، دماهای مختلف و زمان‌های گوناگون بررسی شدند. تأیید بیان ژن *aprX* به‌وسیله آنالیز SDS-PAGE و دات بلاتینگ انجام شد. در ادامه نیز فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب در دما و pHهای گوناگون سنجش شدند.

یافته‌ها: درستی همسانه‌سازی به‌وسیله توالی‌یابی تأیید شد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های فیلوژنتیکی، توالی پروتئینی به‌دست‌آمده شباهت زیادی را با توالی‌های سایر *باسیلوس*ها نشان داد. پس از ارزیابی مدل‌ها مشخص شد که مدل‌های ارائه‌شده به‌وسیله نرم‌افزارهای RAPTORX و I-TASSER مدل‌های مطلوبی برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی این پروتئاز هستند. تولید پروتئین نوترکیب با القای IPTG به میزبان حاوی پلاسمید pET28a-*aprX* با موفقیت انجام شد. بیشترین مقادیر بیان پروتئین نوترکیب در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و طی زمان ۲۰ ساعت و با IPTG ۰/۵ میلی‌مولار به‌دست‌آمده آمد. هم‌چنین پروتئین نوترکیب تولیدشده در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و pH: ۸ بیشترین فعالیت را نشان داد.

نتیجه‌گیری: آنزیم کدشونده به‌وسیله این ژن در دسته آنزیم‌های پایدار قرار گرفته و به‌صورت محلول بیان خواهد شد. این مزایا موجب می‌شود که آنزیم مذکور به‌عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنعت در نظر گرفته شود.

کلیدواژگان: بهینه‌سازی بیان، بیان پروتئین نوترکیب، توالی‌یابی، دات بلاتینگ، مدل‌سازی پروتئین، همسانه‌سازی مولکولی.

۱- مقدمه

پروتئازها، یکی از سه گروه مهم آنزیم‌های صنعتی هستند و ۶۰ درصد از فروش آنزیم‌های دنیا را به خود اختصاص داده‌اند [۱؛ ۲]. این آنزیم‌ها به‌طور گسترده‌ای در تولید مواد شوینده، مواد غذایی، کالاهای چرمی، تیمار و تجزیه فاضلاب و منسوجات استفاده می‌شوند [۳]. پروتئازها در فرایندهای بیولوژیکی گیاهان، حیوانات و ریزسازواره‌ها برای مثال در انعقاد خون، فعال‌سازی زیموژن، انتقال پروتئین ترشحی از غشا، رشد تومور، رشد و نمو سلول و کاتابولیسم پروتئین‌ها نقشه‌ای حیاتی را بازی می‌کنند [۴؛ ۵]. از پروتئازها به‌طور گسترده در صنعت داروسازی برای تهیه مواد دارویی نظیر پمادهایی برای بهبود زخم‌ها و تولید ترکیبات الیگوپپتیدی مختلف با اهداف دارویی استفاده می‌شود. از این آنزیم‌ها در پزشکی برای از بین بردن انگل‌های دستگاه گوارش، برداشت و حذف پوست مرده در بیماران با سوختگی نیز استفاده می‌شود [۱]. همچنین پروتئازها با تولید پپتیدهای کوچک می‌توانند به‌عنوان عناصر مؤثر بیولوژیکی در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و کاهنده فشارخون بالا استفاده شوند [۶].

ریزسازواره‌ها منبع مناسبی برای تولید آنزیم‌ها محسوب می‌شوند؛ چرا که آنزیم‌های موجود در آن‌ها از نظر خصوصیات بیوشیمیایی تنوع داشته و نیز دست‌کاری ژنتیکی در آن‌ها از امکان بیشتری برخوردار است. این موجودات به دلیل رشد سریع، نیاز به فضای محدود برای کشت و آسانی تولید آنزیم‌های جدید با خصوصیات تغییر یافته، بسیار مورد توجه هستند [۷]. در میان پروتئازهای میکروبی که شامل انواع باکتریایی، قارچی و ویروسی می‌باشند؛ پروتئازهای باکتریایی از لحاظ صنعتی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. بسیاری از گونه‌های جنس *باسیلوس* پروتئاز خارج سلولی و داخل سلولی تولید می‌کنند و به دلیل کیفیت عالی تخمیر، بازده

بالای محصول و تولید مقادیر اندک محصولات جانبی سمی به‌عنوان محبوب‌ترین گونه‌های تولیدکننده پروتئاز در فرایندهای بیولوژیکی شناخته می‌شوند [۸؛ ۹].

خصوصیات مربوط به بسیاری از پروتئازهای جنس *باسیلوس* شناسایی شده و ژن مرتبط با آن‌ها همسانه‌سازی و توالی‌یابی شده است که خلاصه‌ای از خصوصیات این آنزیم‌ها در جدول ۱ دیده می‌شود [۸؛ ۱۰-۱۵]. برای مثال همولوگ‌های ژن *aprE* از باکتری‌های *B. subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. licheniformis* CH3-17 به‌صورت هترولوگ درون میزبان باکتریایی بیان شده‌اند که از نظر زیستی فعال بوده و پروتئین‌هایی به طول ۲۷-۲۹ کیلودالتون را تولید کرده‌اند [۱۶؛ ۱۷]. هم‌چنین لین و همکاران پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز متعلق به *B. licheniformis* به نام *apr* در ناقل pGM-T، بیان این ژن را در ناقل بیانی مورد مطالعه قرار داده و در ادامه تأثیر اجزای محیط کشت را بر بیان این پروتئاز نوترکیب بررسی کرده‌اند [۱۸]. در مطالعه‌ای دیگر پس از همسانه‌سازی و بیان ژن *epr* متعلق به *B. licheniformis* مشخص شد که گرچه جرم مولکولی پروتئین نوترکیب تولیدی ۵۵ کیلودالتون است، اما این پروتئین فرم فعال آنزیم نبوده و نیازمند یک هضم آنزیمی برای فعال شدن است [۱۹]. هم‌چنین علاوه بر همسانه‌سازی و بیان پروتئازها متعلق به *B. licheniformis* در باکتری *E. coli*، مطالعاتی در زمینه همسانه‌سازی و بیان این ژن‌ها در باکتری *B. subtilis* WB600 نیز انجام شده است که به‌عنوان نمونه تانگ و همکاران موفق به افزایش ۶۵ درصد تولید پروتئین نوترکیب آلکالین پروتئاز در باکتری *B. subtilis* WB600 نسبت به سویه اصلی شده‌اند [۲۰]. سالیک و همکاران نیز با انتقال ژن آلکالین پروتئاز از *B. licheniformis* به *B. licheniformis* موفق به بیش بیان این ژن در این باکتری شده‌اند [۲۱]. با وجود مطالعه‌های گسترده انجام شده روی پروتئازهای *B. licheniformis*

هیچ‌گونه مطالعه‌ای روی ژن *aprX* متعلق به باکتری *B. licheniformis* انجام نشده است.

از آنجایی که توالی ژن‌های رمزکننده آنزیم‌ها با ساختار و عملکرد آن‌ها رابطه مستقیمی دارد، بنابراین آگاهی از توالی ژن برای استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک به‌منظور در سایر میزبان‌ها و در نتیجه بالا بردن تولید آنزیم و بهینه‌سازی آن نقش بسزایی دارد. هدف از این مطالعه، جداسازی، همسانه‌سازی و بیان ژن سرین پروتئاز از باکتری *B. licheniformis*، با عنوان *aprX* بود تا

ضمن شناسایی توالی و عملکرد آنزیم مورد مطالعه، در پژوهش‌های آینده بتوان از آن به کمک فناوری DNA نو ترکیب با اهداف خاص تجاری استفاده کرد. همچنین لازم است به‌منظور شناخت بیشتر نسبت به عملکرد این آنزیم، خصوصیات بیوشیمیایی و ساختار دوبعدی و سه‌بعدی پروتئین مورد مطالعه، پیش‌بینی شود و در ادامه نیز به‌منظور بررسی تعیین جایگاه آن در گروه ژن‌های پروتئاز، همولوژی و فیلوژنتیکی ژن همسانه‌سازی شده نیز انجام گیرد.

جدول ۱ خلاصه‌ای از خصوصیات ژن‌های پروتئاز همسانه‌سازی شده متعلق به باسیلوس‌ها

نام جنس و گونه	نوع پروتئاز	وزن مولکولی آنزیم	دمای بهینه فعالیت آنزیم	pH بهینه فعالیت آنزیم	منبع
<i>Bacillus sp.</i>	سرین آلکالین پروتئاز	۳۴ kDa	۵۰	۱۱	Yamagata and Ichishima 1995 [۱۴]
<i>B. amyloliquefaciens</i>	آلکالین پروتئاز	۳۱ kDa	۵۰	۹/۵	Huang et al. 2012 [۱۲]
<i>Bacillus lehensis</i>	سرین پروتئاز	۳۹ kDa	۵۰	۱۲/۸	Joshi et al. 2013 [۸]
<i>B. licheniformis</i>	آلکالین پروتئاز	۳۰ kDa	۷۰	۱۰	Hadjidj et al. 2018 [۱۱]
<i>Bacillus pumilus</i>	سرین پروتئاز (فیبرینولیتیک)	۲۷ kDa	۴۰	۸	Yao et al. 2018 [۱۵]
<i>B. subtilis RD7</i>	سرین آلکالین پروتئاز	۴۳ kDa	۴۰	۱۰	Suberu et al. 2019 [۱۳]
<i>B. lehensis JO-26</i>	سرین آلکالین پروتئاز	۳۴ kDa	۵۰	۱۰	Bhatt et al. 2020 [۱۰]

استخراج DNA ژنومی با استفاده از آنزیم لیزوزیم و براساس روش بیان‌شده توسط چنگ و همکاران انجام گرفت [۲۲] و پس از آن کمیت و کیفیت آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed-UVD3200 انگلستان)، در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد بررسی شد. واکنش PCR روی DNA استخراجی با استفاده از Pfu DNA polymerase (fermentas) و آغازگرها در دستگاه Eppendorf

Mastercycler Gradient برای ۳۵ چرخه انجام شد. شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

خالص سازی محصول PCR با اندازه موردنظر (۱۳۲۹ bp) از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک Bioneer و براساس دستور کار شرکت سازنده انجام شد. اتصال میان ژن موردنظر و ناقل پلاسمیدی pTG19-T با استفاده از آنزیم DNA لیگاز (T4 (Takara) به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت [۲۳]. محصول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول های مستعد */شریشیا کلاهی (Escherichia coli)* سویه DH5α انتقال داده شد [۲۴]. به منظور انجام آزمون سفید-آبی، باکتری ها روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، IPTG و X-gal کشت داده شدند و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی های نو ترکیب، انتخاب و بررسی دقیق تر شدند. استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی با استفاده SDS انجام گرفت [۲۵] و کلونی های نو ترکیب با استفاده از دو روش PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* بررسی شدند. توالی یابی DNA پلاسمید حاوی قطعه نو ترکیب به وسیله شرکت Bioneer کره جنوبی و با استفاده از آغازگر پرموتر باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت انجام شد. پلاسمیدهای pET28a (+) و pTG19-T-aprX به صورت جداگانه با استفاده از دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و ژن مربوط به *aprX* در پلاسمید (+) pET28a همسانه سازی شد و صحت همسانه سازی بررسی شد. پلاسمید نو ترکیب به باکتری *E. coli* BL21 (DE3) انتقال داده شد [۲۴].

۲- بیان و تخلیص پروتئین His-Q65IP4

یکی از کلنی های BL21 (DE3) نو ترکیب به ۱۰ میلی لیتر LB مایع حاوی ۵۰ میکرومولار کانامایسین تلقیح و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با

سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس یک میلی لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۵۰ میلی لیتر LB افزوده و در انکوباتور قرار داده شد تا به OD موردنظر رسید. بیان ژن سرین پروتئاز در میزبان باکتریایی در شرایط مختلف دمایی شامل ۱۶، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ و غلظت های ۰/۱، ۰/۵ و یک میلی مولار IPTG و در زمان های ۴، ۸ و ۲۰ ساعت پس از القا IPTG به وسیله SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۱/۵ میلی لیتر از باکتری القا شده در شرایط مختلف، در ۷۰۰۰ دور در دقیقه در ۴ درجه سانتیفریوژ شدند و رسوب باکتری ها در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار Tris-HCl و ۱ میلی مولار EDTA) حل شد و باکتری ها توسط امواج فراصوت لیز گردیدند. سونیکاسیون شامل ده مرحله یک دقیقه ای با یک دقیقه فاصله بین هر مرحله و روی یخ با استفاده از دستگاه اولتراسونیک مدل UP50H ساخت شرکت Mhielsher آلمان با دامنه امواج ۱۰۰ درصد و چرخه ۷۰ درصد انجام شد. پروتئین کل و فاز محلول هر از یک نمونه ها برای بررسی روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد بارگذاری گردید. با توجه به این که قطعه همسانه سازی شده در انتهای آمینی خود دارای یک دنباله شش تایی هیستیدینی است؛ خالص سازی پروتئین هدف با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی و به کمک رزین و براساس دستور کار شرکت Thermo scientific انجام شد. به منظور تأیید بیان پروتئین هترولوگ از روش دات بلات و آنتی بادی ضد دنباله هیستیدینی (محصول شرکت Biolegend) به عنوان آنتی بادی اولیه استفاده شد. در این پژوهش آنتی بادی علیه IgG موش نشاندار با پراکسیداز ساخت شرکت Bio-Rad به عنوان آنتی بادی دوم مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت در حضور پراکسید هیدروژن و سوبسترایی به نام Diaminobenzidine (DAB)، در محل کمپلکس آنتی ژن - آنتی بادی بر روی غشا لکه های قهوه ای رنگ ایجاد شد.

۳- سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب

فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص سازی شده، براساس روش کمبهاوی با استفاده از کازئین یک درصد به عنوان سوبسترا و منحنی استاندارد تیروزین با سه تکرار اندازه گیری شد [۲۶]. یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز، مقدار آنزیمی است که می تواند در هر دقیقه یک میکرومول تیروزین را در شرایط آزمایش تولید کند. برای به دست آوردن یون مورد نیاز آنزیم نوترکیب خالص سازی شده، نخست فعالیت آنزیم نوترکیب در حضور یون های روی، منیزیم و کلسیم با غلظت های نهایی ۲، ۵ و ۱۰ میلی مولار بررسی شد. سپس به منظور بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم نوترکیب، سنجش فعالیت آنزیم نوترکیب

خالص سازی شده با غلظت بهینه یون مورد نظر در دماهای ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از مدت ۳۰ دقیقه، برای توقف واکنش ۵۰۰ میکرولیتر TCA سرد ۲۰ درصد به هر کدام از ویال ها اضافه شد و جذب آن ها در ۲۸۰ نانومتر قرائت و فعالیت آنزیم نوترکیب خالص سازی شده در دماهای مختلف (۲۰-۷۰ درجه سانتیگراد) بررسی شد. واکنش سنجش پروتئاز آنزیمی با pH های مختلف (۴-۱۲) و در دمای بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب خالص سازی شده انجام و جذب نمونه ها در ۲۸۰ نانومتر قرائت و فعالیت پروتئاز آنزیم نوترکیب خالص سازی شده در pH های مختلف (۴-۱۲) بررسی شد. (جدول ۲)

جدول ۲ آغازگرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

نام آغازگر	توالی آغازگر
aprX1329F	5'-AAGAATTCATGTTTCGGTTCCTACATGGTTCAAATG-3'
aprX1329FR	5'-ATAAGCTTCGGTCTTTAGTCTTGCGGCAC-3'

با استفاده از برنامه Translate توالی نوکلئوتیدی حاصل از فرایند توالی یابی ترجمه شد و ویژگی های فیزیکوشیمیایی پروتئین به دست آمده با استفاده از برنامه های ProtParam، ProtScale، TMHMM و Signalp موجود در تارنمای <https://www.expasy.org/proteomics> بررسی شد. محلول بودن پروتئین پس از بیان در باکتری /شریشیاکلاهی به وسیله برنامه SCRATCH موجود در تارنمای <http://scratch.proteomics.ics.uci.edu> و سرور آنالین Recombinant Protein Solubility Prediction به نشانی <http://www.biotech.ou.edu> مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی توالی های حفاظت شده و دومین های موجود در این پروتئین از برنامه های ScanProsite <http://prosite.expasy.org/scanprosite> و supfam <http://supfam.org> و Pfam <http://pfam.xfam.org> استفاده شد. تجزیه و تحلیل پروتئاز مطالعه شده با سایر

پروتئازها با استفاده از بانک اطلاعاتی MEROPS انجام شد [۲۷]. در ادامه توالی اسید آمینه به دست آمده از Translate به منظور یافتن پروتئین های مشابه در بانک های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST جستجو شد و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف (که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند)، انتخاب و برای هم ردیف سازی چندگانه استفاده شدند (جدول ۳) و درخت فیلوژنتیکی مربوط به ژن *aprX* با استفاده از نرم افزار MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ویرایش ۵/۲ و با استفاده از ماتریس های تشابه گوناگون ترسیم شد. درجه اعتبارسنجی گروه بندی های ایجاد شده با Bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد [۲۸]؛

[۲۹]

ساختارهای دوم و سوم پروتئین به وسیله SOPMA [۳۰]، PHYRE2 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi>

(PyMOL, ?id=index) موجود در تارنمای

I-TASSER (<https://www.pymol.org>)

(<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>)

و RAPTORX (<http://raptorx.uchicago.edu>) تعیین

شد. همچنین ساختار سوم پروتئین مورد مطالعه با استفاده

از نرم افزار Modeller 9v16 به روش چند الگویی

مدل سازی شد [۳۱]. از امتیاز (C-score) برای تخمین

کیفیت مدل های پیش بینی شده توسط I-TASSER استفاده

شد. همچنین به منظور ارزیابی کیفیت پارامترهای

ساختاری مدل های ترسیم شده از نرم افزاری به نام

procheck موجود در تارنمای

(<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES>) برای ترسیم

نمودار رامچاندران استفاده شد و در ادامه نیز Q-mean

score (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>) و Z-

score

(<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>)

مدل ها محاسبه شد [۳۲].

۴- نتایج

جداسازی، همسانه سازی، بیان و بررسی توالی های

آمینواسیدی و ویژگی های فیزیکوشیمیایی توالی

پروتئین به دست آمده

پس از استخراج DNA باکتریایی، ژن رمزکننده *aprX*

با استفاده از PCR از باکتری *B. licheniformis* جداسازی

و در ناقل پلاسمیدی pTG19-T همسانه سازی شد. پس

از استخراج پلاسمید، فرایند همسانه سازی با انجام

آزمون های PCR (شکل ۱- الف) و هضم آنزیمی دوگانه

با دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII* با تولید قطعه به اندازه bp

۱۳۲۹ به صورت تک باند بر ژل آگارز ۱/۲ درصد و بافر

TBE تأیید شد. همچنین نتایج توالی یابی DNA نشان داد

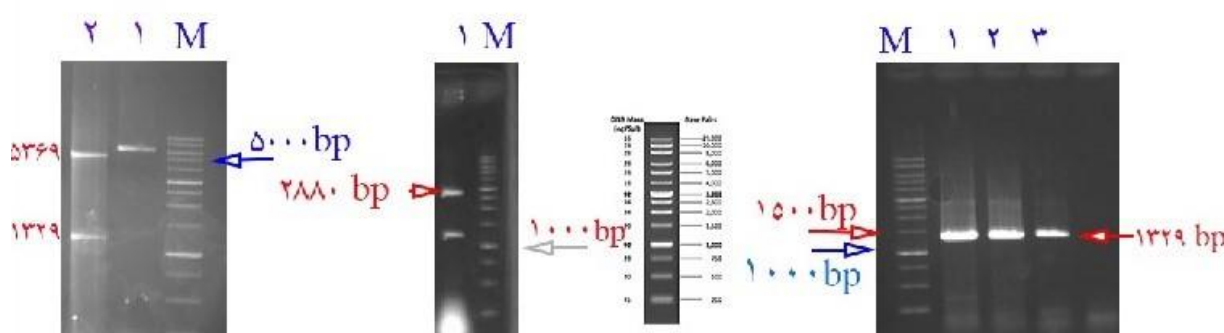
که ژن رمزکننده *aprX* به درستی روی جایگاه چندگانه

همسانه سازی ناقل pTG قرار گرفته است (شکل ۲).

الف:

ب:

ج:



شکل ۱ الف- تکثیر ژن *aprX* با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز M- نشانگر اندازه مولکولی 1 Kb، ۲ و ۳- نتایج حاصل از

تکثیر ژن *aprX* به وسیله PCR؛ ب- نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTG-*aprX* M- نشانگر اندازه مولکولی 1Kb-۱

پلاسمید pTG-*aprX* نوترکیب هضم شده با دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII*؛ ج- نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET28-

aprX M- نشانگر اندازه مولکولی ۱Kb-۱ پلاسمید نوترکیب هضم نشده ۲- پلاسمید pET28-*aprX* نوترکیب هضم شده با دو آنزیم

HindIII و *EcoRI*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2438 bits(1320)	0.0	1326/1329(99%)	0/1329(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTTGGTTTCTACATGGTTCAAATGGTAAGGTCCAAAGCCCATAGCTGGACCGGCG	60		
Sbjct 3726353	ATGTTGGTTTCTACATGGTTCAAATGGTAAGGTCCAAAGCCCATAGCTGGACCGGCG	3726412		
Query 61	CTGAGAGAAAGCGTGCTGAAACTCTATAAACCTTTTAAATGGAAGCCTTGCTTTTACAC	120		
Sbjct 3726413	CTGAGAGAAAGCGTGCTGAAACTCTATAAACCTTTTAAATGGAAGCCTTGCTTTTACAC	3726472		
Query 121	GGGTTTTTCGAAAAAATATTAAATGAAAAACAAAAAATACCGGTCAATTTGAATTTGAA	180		
Sbjct 3726473	GGGTTTTTCGAAAAAATATTAAATGAAAAACAAAAAATACCGGTCAATTTGAATTTGAA	3726532		
Query 181	AAAGACTGTCAGCATAAAGGCTATCAATTAGTCAATGAAATGATCGGACGAAAAGAAGA	240		
Sbjct 3726533	AAAGACTGTCAGCATAAAGGCTATCAATTAGTCAATGAAATGATCGGACGAAAAGAAGA	3726592		
Query 241	AACAAATCAAGCATCGCTTCTCCACGTTAGCTGCTGCAGCGCTGAAGTCACCCCTTCT	300		
Sbjct 3726593	AACAAATCAAGCATCGCTTCTCCACGTTAGCTGCTGCAGCGCTGAAGTCACCCCTTCT	3726652		
Query 301	TCTTTGCAATCGCTTCTATCTGAGTGCGGCGACATTGCAAAATTTATTTAAATGCAAA	360		
Sbjct 3726653	TCTTTGCAATCGCTTCTATCTGAGTGCGGCGACATTGCAAAATTTATTTAAATGCAAA	3726712		
Query 361	GTAAGAGCGCTCCTCGAGTAGCGGTTGAATCAAGCCATGCCAAGAAGTGGTCAGAAAC	420		
Sbjct 3726713	GTAAGAGCGCTCCTCGAGTAGCGGTTGAATCAAGCCATGCCAAGAAGTGGTCAGAAAC	3726772		
Query 421	AATCAGACGCTGACAGGCAAGGAGTGACATGCTGTCATTGATACGGCGTATACCCCT	480		

شکل ۲ توالی حاصل از توالی‌یابی پلاسمید نو ترکیب pTG-aprX با توالی ژن پروتئاز موجود در پایگاه NCBI

جدول ۳ توالی‌های پروتئینی استفاده‌شده برای ساخت درخت فیلوژنتیکی ژن *aprX*

ردیف	جنس و گونه	نام اختصاصی ژن	نام اختصاصی پروتئین در پایگاه UNIPROT	شماره دسترسی	درصد تشابه پروتئین
1	<i>B. licheniformis</i>	<i>AprX</i>	Q65IP4	NC_006322.1	100
2	<i>B. subtilis</i>	<i>AprX</i>	Serine protease AprX O31788	NC_000964	71
3	<i>B. gobiensis</i>	AM592_19005	A0A0M5JMB5	NZ_CP012600	68.8
4	<i>B. halodurans</i>	<i>aprX</i>	Intracellular alkaline serine protease Q9KBJ7	NC_002570	68.6
5	<i>B. oleivorans</i>	SAMN05877753_101131	Serine protease AprX A0A285CH30	SNX66819.1	68.9
6	<i>Gracilbacillus orientalis</i>	SAMN04487943_101608	Serine protease AprX A0A1I4HRS8	SFL44939	62.2
7	<i>B. pumilus</i>	BPUM_1616	Serine protease A8FDI1	NC_009848.4	62.8
8	<i>Salinibacillus kushneri</i>	SAMN05421676_103147	Serine protease AprX A0A1I0CEV5	SET18117	63.1
9	<i>Lentibacillus salicampi</i>	E4U82_14845	Serine protease A0A4Y9AC97	TFJ91991.1	60.4
10	<i>Thalassobacillus Cyri</i>	SAMN05421743_102249	Serine protease AprX A0A1H3XVP1	SEA02632.1	61.4
11	<i>Alteribacillus bidgolensis</i>	SAMN05216352_102473	Serine protease AprX A0A1G8F131	SDH75822	60.3
12	<i>Tenuibacillus multivorans</i>	SAMN05216498_2945	Serine protease AprX A0A1H0DUE9	SDN73708	58.1
13	<i>Paenibacillus Yonginensis</i>	AWM70_02105	Serine protease A0A1B1N6J5	NZ_CP014167	56.2
14	<i>B. asahii</i>	D1953_19810	Serine protease A0A398AVZ8	RID81837	55.6

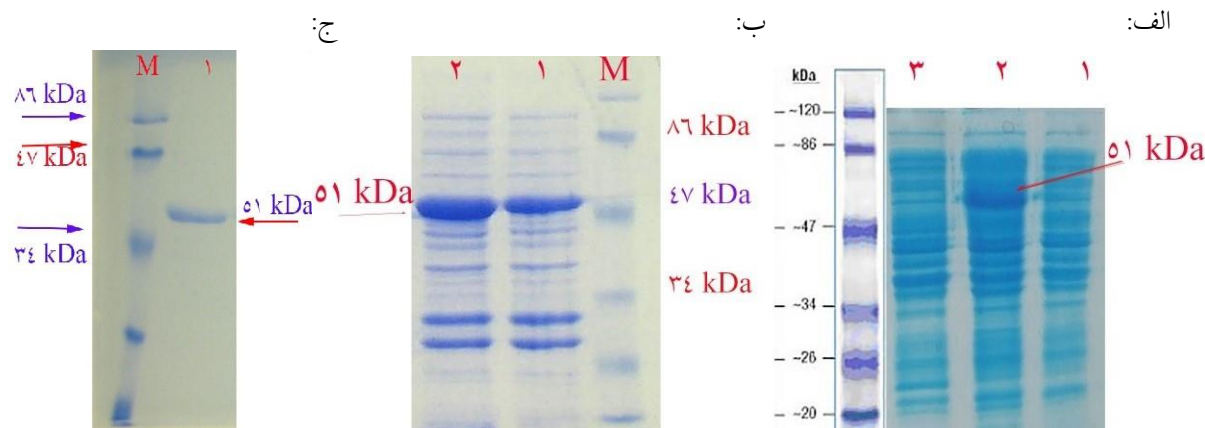
از آن ژن *aprX* در ناقل خطی شده pET28a(+) طی فرایند اتصال و با استفاده از آنزیم DNA لیگاز (Takara) T4

پلاسمیدهای pTG-aprX و pET28a(+) به‌صورت جداگانه با دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII* برش یافتند و پس

الحاق شد و پلاسمید نو ترکیب pET28a-aprX به باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد و با هضم آنزیمی با دو آنزیم *EcoRI* و *HindIII* و توالی یابی، حضور ژن و استقرار آن به درستی تأیید شد (شکل ۱-ب).

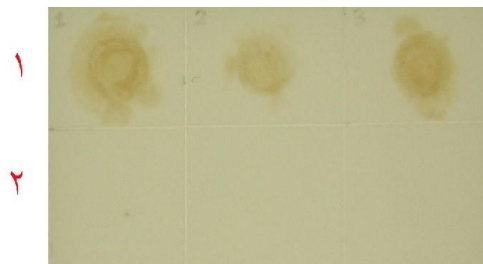
برای تولید پروتئین نو ترکیب، پلاسمید pET28a-aprX و همچنین پلاسمید pET28a(+) فاقد ژن به میزبان بیانی *E. coli* سویه BL21(DE3) انتقال داده شدند. وزن مولکولی پروتئین Q65IP4 و His-Q65IP4 به ترتیب ۴۸/۲۲ و ۵۱/۷۷ کیلودالتون پیش بینی شد. وجود باند پروتئینی واضح در محدوده ۵۱ کیلودالتون بر ژل SDS-PAGE در حضور IPTG (با غلظت ۰/۵ میلی مولار) نسبت به عدم حضور القا کننده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۴ ساعت پس از افزودن IPTG بیانگر تولید موفق پروتئین نو ترکیب بود (شکل ۳-الف). گرچه وزن مولکولی آنزیم تولیدی در محدوده وزن مولکولی اغلب سرین پروتئازها قرار ندارد، اما نزدیک به وزن مولکولی گزارش شده برای آلکالین پروتئاز *B. subtilis* DMA-09 و *B. circulans* MTCC 7906 و پروتئین بیان شده به وسیله

ژن *epr* متعلق به *B. licheniformis* است [۳۴؛ ۳۳؛ ۱۹]. در ادامه به منظور بهینه سازی بیان پروتئین نو ترکیب از دماهای ۱۶، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده گردید و نمونه های بیانی ۰، ۴ و ۲۰ ساعت پس از القای IPTG جمع آوری شدند. بیشترین میزان بیان پروتئین در دمای ۲۵ درجه و ۲۰ ساعت پس از القای IPTG با غلظت ۰/۵ میلی مولار مشاهده شد (شکل ۳-ب). پس از استخراج پروتئین های محلول، پروتئین نو ترکیب تولید شده در فاز محلول توسط کروماتوگرافی جذبی خالص سازی شد که در شکل ۳-ج نمونه خالص شده این پروتئین در محدوده ۵۱ کیلودالتون دیده می شود. در شکل ۴ نیز نتایج حاصل از دات بلات موجود است. ردیف اول حاوی واکنش بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX است که به صورت لکه های قهوه ای رنگ مشاهده می شود و نشان دهنده صحت بیان پروتئین نو ترکیب است و این در حالی است که در ردیف دوم که ژنی وارد پلاسمید نشده و پروتئینی بیان نشده است و به این ترتیب لکه های قهوه ای هم مشاهده نمی شود.



شکل ۳ آنالیز SDS-PAGE بیان و خالص سازی پروتئین نو ترکیب His-Q65IP4 تولید شده در باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3).

الف- M- نشانگر پروتئینی. ۱- پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX در زمان صفر. ۲- پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۴ ساعت پس از القا. ۳- پروتئین کل استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۴ ساعت پس از القا با غلظت نیم میلی مولار؛ ب- M- نشانگر پروتئینی. ۱- پروتئین محلول استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۸ ساعت پس از القا با غلظت نیم میلی مولار. ۲- پروتئین محلول استخراج شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۲۰ ساعت پس از القا با غلظت نیم میلی مولار؛ ج- ۱- پروتئین خالص سازی شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX



شکل ۴ آنالیز دات بلات پروتئین نو ترکیب Q65IP4. ۱- بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX -۲ بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a(+)

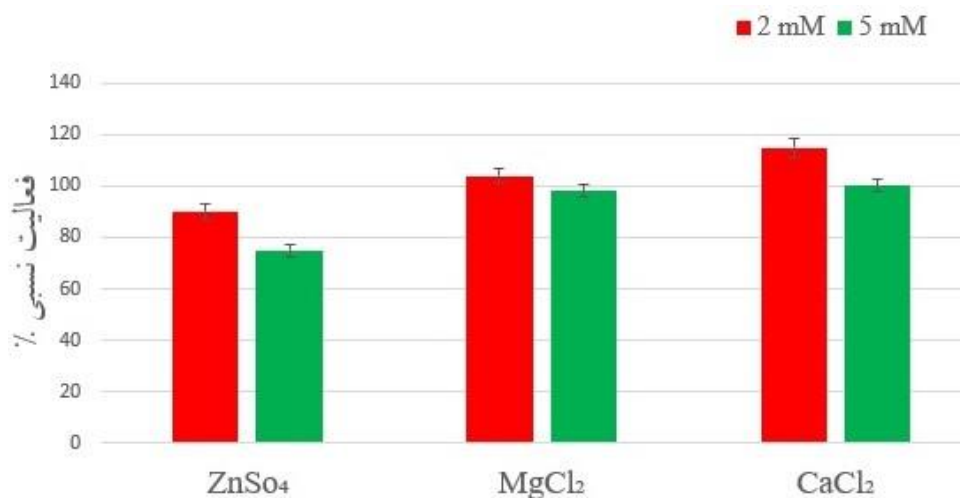
۵- سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم نو ترکیب

در آزمایش‌های سنجش فعالیت پروتئازی روی آنزیم نو ترکیب خالص‌سازی شده His-Q65IP4، مشخص شد که یون کلسیم با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را بر فعالیت پروتئازی این آنزیم نو ترکیب دارد و فعالیت پروتئازی آنزیم نو ترکیب تولیدی را تا ۱۱۵ درصد نسبت به حالت استفاده نکردن از یون کلسیم افزایش نشان داد. فعالیت پروتئازی آنزیم نو ترکیب خالص‌سازی شده در هر دو غلظت یون روی موجب کاهش فعالیت آنزیم شد. نتایج حاصل از بررسی اثر کلسیم بر آنزیم مذکور با نتایج گزارش شده در مورد آلکالین پروتئاز *Bacillus subtilis* SJ4 و پروتئاز *B. amyloliquefaciens* هم‌خوانی دارد [۳۵؛ ۳۶]. در مورد منیزیم هم گرچه غلظت ۲ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت پروتئازی آنزیم نو ترکیب شد، اما در مقایسه با تأثیر غلظت ۲ میلی‌مولار کلسیم این مقدار کمتر از ابود (شکل ۵).

نتایج حاصل از بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم نو ترکیب نشان داد که آنزیم نو ترکیب خالص‌سازی شده در طیف دمایی ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد بیش ۵۵ درصد فعالیت داشته (شکل ۶- ب) و بهینه فعالیت آن در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد است. دمای بهینه آنزیم نو ترکیب

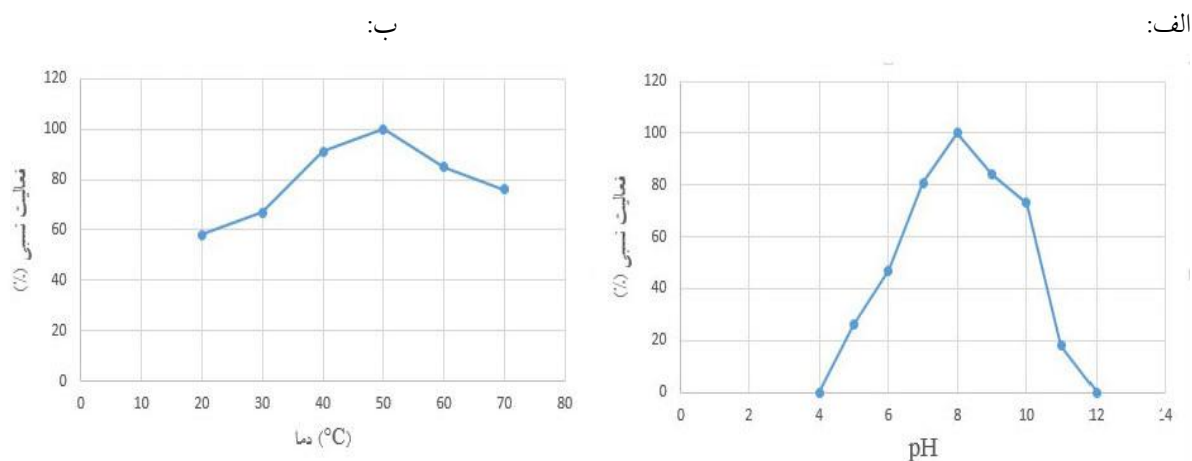
His-Q65IP4 با دمای بهینه متعلق به پروتئاز *B. lehensis* JO-26، سرین پروتئاز باکتری *B. megaterium* و دمای بهینه پروتئاز مورد مطالعه سارین و همکاران مطابقت دارد [۳۷؛ ۳۸؛ ۳۹].

آنزیم نو ترکیب خالص‌سازی شده در pHهای ۵ تا ۱۱ فعالیت پروتئازی داشته است (شکل ۶- الف). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج مطالعه انجام شده به وسیله یانگ و همکاران روی سه آلکالین پروتئاز متعلق به *Bacillus altitudinis* W3 هم‌خوانی دارد. این پژوهشگران گزارش داده‌اند که دو آنزیم BaApr1 و BaApr2 در محدوده pH ۶/۵ تا ۱۰/۵ بیش از ۶۰ درصد فعالیت دارند و آنزیم BaApr9 نیز فعالیت بیش از ۶۰ درصدی در محدوده pH ۱۰/۵-۱۱/۵ دارد [۳۹]. هم‌چنین در مطالعه انجام شده توسط سویرا و همکاران بر پروتئاز *B. subtilis* RD7 نیز محدوده pH ۶ تا ۱۱ برای فعالیت آنزیم گزارش شد [۱۳]. بهینه فعالیت آنزیم نو ترکیب His-Q65IP4 در pH: ۸ مشاهده شد که با pH بهینه گزارش شده در مورد آنزیم فیبرینولیتیک *B. subtilis* HK176 تطابق دارد [۴۰؛ ۴۱؛ ۴۲].



تأثیر یون ها بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص سازی شده

شکل ۵ بررسی تأثیر یون های مختلف با غلظت های متفاوت بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص سازی شده



شکل ۶ الف- بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص سازی شده؛ ب- بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص سازی شده.

ژن رمزکننده *aprX* با فرمول مولکولی $C_{2110}H_{3360}N_{590}O_{662}S_{20}$ به ترتیب برابر با ۴۸/۲۲ کیلو دالتون و ۵/۶۹ می باشد. شاخص ناپایداری پروتئین گذشته به وسیله *aprX* در لوله ۳۵/۱۶ محاسبه شد و در نتیجه پروتئین در رسته پروتئین های پایدار قرار می گیرد [۴۲]. همچنین شاخص آلیفاتیک به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین ها در برابر حرارت ۸۲/۲۶ برای پروتئین Q65IP4 محاسبه شد که به میزان این شاخص در مورد آلکالین پروتئاز موجود در *B.*

بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب بازخوانی DNA رمزکننده سرین پروتئاز *aprX* ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی NC_006322.1 به طول ۱۳۲۹ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون های TAA پایان پیدا کرده و پروتئینی با ۴۵۶ آمینواسید را رمز می کند. بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی پروتئین به دست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش بینی شده پروتئین

B. safensis و *B. amyloliquefaciens* SP1 *lehnensis* نزدیک است [۴۳، ۴۴] و پروتئین مطالعه شده در این پژوهش را در گروه پروتئین‌های پایدار در برابر حرارت به شمار آورد [۴۵]. مقدار GRAVY یک پپتید یا پروتئین از مجموع مقدار هیروپاتی همه اسیدآمینه‌ها تقسیم بر تعداد اسیدآمینه‌های توالی پروتئین به دست می‌آید که در مورد Q65IP4 برابر با ۰/۳۴۱- است. مقدار منفی این شاخص نشان می‌دهد که پروتئین مذکور غیر قطبی است. نیمه‌عمر توالی مطالعه شده در یاخته‌های پستانداران ۳۰ ساعت، در مخمر بیش از ۲۰ ساعت و در *E. coli* بیش از ده ساعت پیش‌بینی شد. شاخص Hydropathy محاسبه‌شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش کیت و دولیتل نشان داد که سرین پروتئاز مطالعه شده آب‌گریز بوده که از مجموع کل اسیدهای آمینه (۴۴۲ عدد)، ۵۷ اسیدآمینه بار منفی داشتند؛ درحالی‌که تعداد کل اسیدآمینه‌ها با بار مثبت ۴۹ بود [۴۶]. براساس برآوردی که به‌وسیله برنامه SCRATCH انجام شد؛ گرچه سه باند دی‌سولفیدی در پروتئین Q65IP4 تشکیل می‌شود، میزان محلول بودن آن پس از بیان دارای احتمالی برابر با ۰/۶۶۸۳۴۴ می‌باشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که به‌صورت محلول بیان می‌شود. براساس نتایج مشاهده‌شده در برنامه supfam، پروتئین کدشده توسط ژن *aprX* متعلق به بالا خانواده subtilisin-like می‌باشد. نتایج حاصل از برنامه Pfam نشان داد که توالی مربوط به پروتئین Q65IP4 دومین peptidase_S8 دارد. براساس برآورد برنامه ScanProsite پروتئین کدشده به‌وسیله ژن *aprX* دومین subtilase را در ناحیه آمینواسیدی بین ۱۲۶ تا ۴۳۹ دارد که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط والبوزی و همکاران در مورد ژن *apr* موجود در *B. subtilis* مطابقت دارد [۴۷]. در طی بررسی انجام‌شده با استفاده از برنامه TMHMM در توالی پروتئین Q65IP4 دومین گذرنده از غشا مشاهده نشد و تمام نواحی پروتئین در خارج سلول قرارگرفته‌اند که در این

ویژگی با سایر اعضای گروه سوبتیلیزین‌ها مشابه است [۴۸]. در پایگاه داده MEROPS پروتئین Q65IP4 در گروه S08.137 قرار می‌گیرد که جایگاه فعال آنزیم شامل Asp155، His187، Asn293 و Ser384 می‌باشد. در این گروه از آنزیم‌ها سرین به‌عنوان نوکلئوفیل عمل می‌کند. این آنزیم متعلق به زیرخانواده S8A بوده و هر سه موتیف عملکردی مربوط به این زیرخانواده در توالی پروتئین رمز شده به‌وسیله این ژن نیز مشاهده شد و نتایج مشاهده‌شده با نتایج گزارش شده در مورد ژن *apr* موجود در *B. subtilis* و سایر اعضای خانواده سرین پروتئازهای شبه‌سوبتیلیزین مطابقت دارد [۴۷، ۴۸].

۶- بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی پروتئین

Q65IP4 با سایر پروتئازها

توالی پروتئینی به‌دست‌آمده از سرین پروتئاز *aprX* با پروتئازهای موجودات دیگر مقایسه شدند. پروتئین Q65IP4 بالاترین تشابه را با پروتئین‌های O31788 موجود در *B. subtilis*، A0A0M5JMB5 متعلق به *B. gobiensi* و Q9KBJ7 مربوط به *B. halodurans* به ترتیب به میزان ۷۱، ۷۸ و ۶۸ درصد دارد. از آنجایی‌که گونه *B. licheniformis* از نظر ژنتیکی با گونه *B. subtilis* ۸۴ درصد شباهت دارد [۴۹] انتظار می‌رفت که بیشترین شباهت پروتئین مذکور با پروتئین *B. subtilis* دیده شود. در تمامی توالی‌های ذکر شده در جدول ۳، توالی‌های (۱۵۷-۱۵۵) DTG، (۱۸۶-۱۹۳) GHGTHCAG، (۱۸۴-) PYDD (۱۸۱) (۳۱۵-۳۱۱) ITVGA و (۳۸۱-۳۸۶) SGTSMA حفاظت شده هستند. حفاظت‌شدگی در مورد هیستیدین، سرین و آسپارتیک اسید موجود در جایگاه فعال این آنزیم در *B. licheniformis* و سایر نمونه‌ها کاملاً مشاهده می‌شود که با نتایج یافته‌های کویید و همکارانش مطابقت دارد. این پژوهشگران ضمن مقایسه توالی‌های اسیدآمینه سرین پروتئازهای داخل سلولی *B.*

subtilis با سرین پروتئازهای Carlsberg و Subtilisin BPN خارج سلولی به این نتیجه رسیدند که علاوه بر همولوژی توالی‌های اسیدآمینه سه‌تایی جایگاه فعال آنزیمی شامل سرین، آسپارات و هیستیدین، نواحی اطراف جایگاه فعال کاملاً حفظ شده است که نمایانگر منشعب شدن پروتئازهای داخل و خارج سلولی از اجدادی مشترک می‌باشد [۵۰]. هم‌چنین آسپارژین (به‌عنوان یکی از اجزای جایگاه فعال آنزیم مطالعه شده) در بیشتر نمونه‌های استفاده‌شده در ترسیم درخت فیلوژنتیک به‌صورت حفاظت‌شده می‌باشد. در پژوهش انجام‌شده بر *B. circulans* MTCC 7906، پس از مقایسه میان هفت آلکالین پروتئاز از جنس‌های مختلف باسیلوس (از جمله *B. subtilis*، *B. circulans* و *B. licheniformis*)، حفاظت‌شدگی از نظر تعداد نوکلوتید و نیز آمینواسید در میان این گونه‌ها گزارش شده است [۳۴]. بررسی فیلوژنتیکی توالی پروتئین Q65IP4 با توالی‌های مربوط به پروتئازهای سایر موجودات با استفاده از نرم‌افزار Mega 5.2 و به روش Neighbor Joining نشان داد که پروتئین مذکور از نظر فیلوژنتیکی با پروتئازهای مربوط به *B. gobiensi*، *B. pumilus* و *B. subtilis* بیشترین نزدیکی را داشته و در یک گروه قرار می‌گیرند. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده نزدیکی بین پروتئازهای متعلق به جنس باسیلوس بیش از نزدیکی بین پروتئین مطالعه شده با پروتئازهای سایر موجودات است و این نکته شاید نشان‌دهنده این است که پروتئازهای جنس باسیلوس یک جد مشترک دارند (شکل ۷). سارین و همکاران نیز پس از همسانه‌سازی ژن آلکالین پروتئاز *apr46* متعلق به *B. licheniformis* درخت فیلوژنتیکی مربوط به این ژن را رسم کردند. گرچه در درخت ترسیم‌شده توسط این پژوهشگران پروتئاز مربوط به *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 بیشترین نزدیکی را با پروتئاز مطالعه شده نشان داده است، اما پروتئازهای مربوط به سایر

باسیلوس‌ها نیز در نزدیکی پروتئاز مربوط به ژن *apr* قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده قرابت میان پروتئازهای مختلف جنس باسیلوس است [۵۰]. گزارش‌های تاکاگی و همکارانش نیز نشان می‌دهد که ۸۵ درصد همولوژی بین پروتئازهای مقاوم به حرارت باکتری‌های *B. thermoproteolyticus* و *B. stearothermophilus* ۸۲ درصد همولوژی بین پروتئازهای پایدار در برابر حرارت باکتری‌های *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens* وجود دارد [۵۱]. تمامی این شواهد نظریه جد مشترک در بین پروتئازهای جنس باسیلوس را تقویت می‌کند.

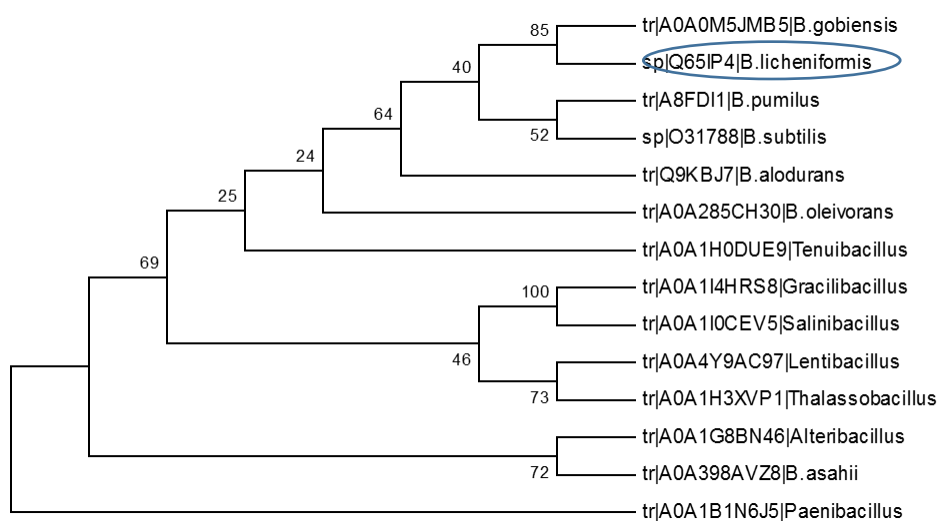
۷- بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی

پروتئین رمز شده به‌وسیله ژن *aprX*

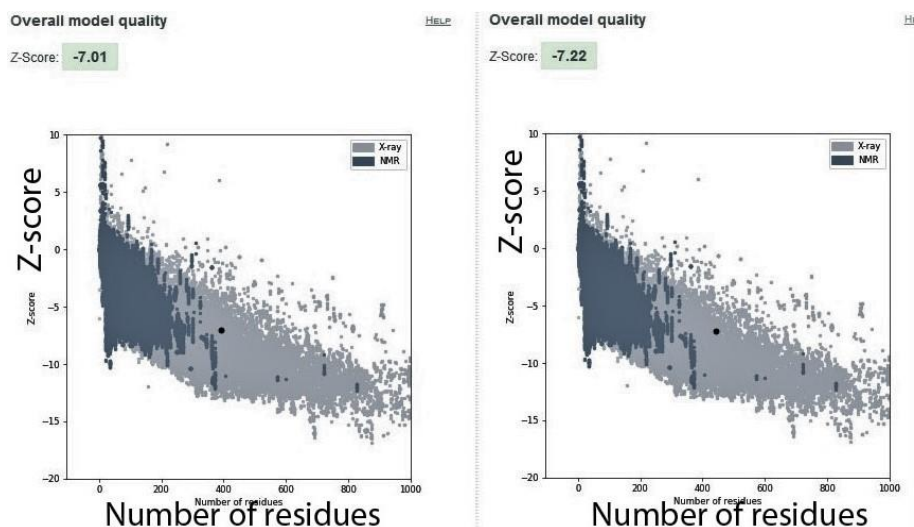
بررسی ساختار دوم پروتئین Q65IP4 با استفاده از برنامه SOPMA نشان داد ۱۵۱ آمینواسید متعلق به این پروتئین در ساختار آلفا هلیکس (۳۴/۱۶ درصد)، ۴۳/۲۱ درصد مارپیچ اتفاقی (۱۹۱ آمینواسید)، ۳۴ آمینواسید در ساختار دور β (۷/۶۹ درصد) قرار گرفته‌اند. بیشترین ساختار دوم برای پروتئین Q65IP4 در نرم‌افزار PHYRE2، آلفا هلیکس با ۲۷ درصد از کل ساختارهای دوم و پس از آن صفحه‌های بتا با فراوانی ۲۳ درصد در نظر گرفته شده است. پس از پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین مذکور با استفاده از نرم‌افزارهای I-PHYRE2، TASSER، Modeller و RAPTORX، این مدل‌ها با استفاده از نمودار رامانچاندرا ارزیابی شدند. در مدل ارائه‌شده به‌وسیله RAPTORX ۸۵/۵ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب قرار گرفتند و این در حالی است که این مقدار برای مدل ارائه‌شده به‌وسیله نرم‌افزار Modeller 9V16 ۸۱/۵ درصد برآورد شده است. از میان پنج مدل پیشنهادی به‌وسیله نرم‌افزار I-TASSER نیز بیشترین درصد اسیدهای آمینه مطلوب برابر با ۷۰/۳ درصد برای مدل شماره یک مشاهده شد. میزان اسیدهای

قابل قبول محسوب می شود. ساختارهای پیش گویی شده خروجی نرم افزارهای I-TASSER و RAPTORX به وسیله نرم افزار Prosa به عنوان بهترین مدل ها انتخاب شدند. میزان Z-score برای این دو مدل به ترتیب با $-7/22$ و $-7/01$ محاسبه شد که در بازه امتیازهایی است که به طور معمول برای پروتئین هایی با اندازه های مشابه یافت می شود (شکل ۸ الف و ب). لذا می توان نتیجه گرفت دو مدل ترسیم شده توسط RAPTORX و I-TASSER مدل های قابل اعتمادی بوده و ساختارهای ترسیم شده به ساختارهای تجربی نزدیک است. از سویی دیگر در این دو مدل، باقیمانده های اسیدهای آمینه نیز بیشتر از سطح انرژی منفی برخوردار هستند (شکل های ۹ الف و ب).

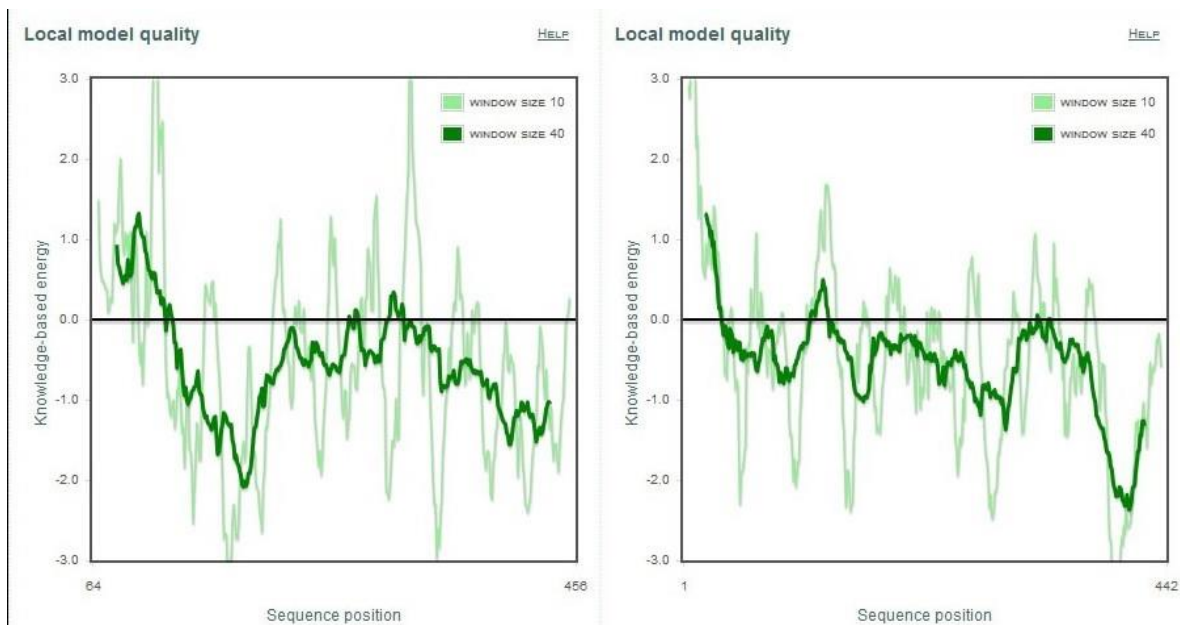
آمینوهای موجود در ناحیه مطلوب در نمودار رامچاندردان مربوط به مدل ارائه شده به وسیله نرم افزار PHYRE2 ۸۱ درصد بود. از این رو براساس برآورد نمودار رامچاندردان، مدل ترسیمی به وسیله نرم افزار RAPTORX مدل مطلوب تری می باشد و مدل ارائه شده توسط PHYRE2 و Modeller در مرتبه دوم قرار می گیرند. پس از ارزیابی شاخص Q-mean مربوط به مدل های ترسیم شده، مدل ارائه شده به وسیله نرم افزار RAPTORX با احتساب Q-mean برابر با $0/605$ با کیفیت ترین مدل برای پروتئین مذکور تشخیص داده شد که با بررسی Z-score مربوط به این مدل در مقایسه با سایر مدل ها نیز این نتیجه تأیید شدند. هم چنین مدل پیشنهادی به وسیله ابزار آنالیز I-TASSER نیز با داشتن Q-mean برابر با $0/601$ مدلی



شکل ۷ درخت فیلوژنتیکی رسم شده مربوط به پروتئین های مختلف جنس باسیلوس و سایر موجودات با استفاده از نرم افزار MEGA5.2. نام اختصاصی ژن ها و پروتئین های موجود در این درخت فیلوژنتیکی در جدول ۳ آمده است. پروتئین کد شده به وسیله ژن *aprX* داخل چارچوب مشخص شده است.



شکل ۸ نقشه Z-score و بسایت Prosa. Z-score کیفیت کلی دو مدل RAPTROX و I-TASSER را نشان می‌دهد و به وسیله کریستالوگرافی اشعه X (روشن) یا اسپکتروسکوپی NMR (تیره) با توجه به طول زنجیره‌های پروتئینی موجود در پایگاه PDB تعیین می‌شود. Z-score پروتئین Q65IP4 به صورت یک نقطه بزرگ مشخص شده است.



شکل ۹ نمودار انرژی استخراج شده از تارنمای Prosa web مربوط به پروتئین Q65IP4 مدل سازی شده به وسیله RAPTROX و I-TASSER

۸- بحث

و خصوصیات مربوط به آنزیم‌های میکروبی جدید با استفاده از همسانه سازی و فناوری DNA نو ترکیب لازم می‌باشد. تاکنون پژوهشی به منظور توالی یابی، تعیین خصوصیات و بیان ژن سرین پروتئاز انجام نشده است. در این پژوهش برای نخستین بار پس از همسانه سازی ژن

پژوهش حاضر با هدف همسانه سازی، تعیین توالی، بیان و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *aprX* استخراج شده از *Bacillus licheniformis* انجام گرفت. به منظور بهبود عملکرد آنزیم‌ها در صنعت، شناخت توالی

aprX در پلاسمید pET28a بیان در باکتری BL21(DE3) انجام گرفت. از آنجایی که ژن همسانه‌سازی شده در ناحیه MCS قرار می‌گیرد؛ تحت کنترل راه‌انداز T7 بوده و انتظار می‌رفت که پروتئین مورد نظر به‌خوبی بیان شود. پروتئین Q65IP4 همراه با شریک الحاقی Histag با وزن ۵۱ کیلودالتون تولید شد. گرچه وزن مولکولی آنزیم تولیدی در محدوده وزن مولکولی اغلب سرین پروتئازها قرار ندارد، اما نزدیک به وزن مولکولی گزارش شده برای آلکالین پروتئاز *B. circulans* MTCC 7906 و سرین پروتئاز متعلق به *B. licheniformis* W10 است [۱۹، ۵۲].

همچنین این پروتئین در مقادیر بالایی به‌صورت محلول بیان شد؛ از این رو به نظر می‌رسد که این سیستم بیانی برای تولید انبوه این پروتئین مناسب باشد. در ادامه نیز با توجه به وجود ناحیه Histag در انتهای آمینوی پروتئین نوترکیب تولیدی، امکان خالص‌سازی آن با کروماتوگرافی تمایلی فراهم شد. بیان پروتئین نوترکیب تولیدی علاوه بر مشاهده بر ژل SDS- PAGE با ایجاد لکه‌های قهوه‌ای در محل کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی، در روش دات بلات، تأیید شد.

سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده در حضور مقادیر مختلف یون‌های روی، منیزیم و کلسیم ارزیابی شدند و در این میان یون کلسیم موجب افزایش قابل توجه فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب شد و از آن جایی که پروتئین مذکور از جمله پروتئین‌های شبه‌سوبتیلزین می‌باشد، این نتیجه مورد انتظار بود [۵۳].

در مطالعه‌هایی که روی پروتئازهای *B. licheniformis* CH 3-17 با خاصیت فیبرینولیتیکی انجام شده است، یون کلسیم همانند آنچه در این آزمایش مشاهده شده است، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه شده است [۵۴].

همچنین طی مطالعه انجام شده به‌وسیله اگیوتس و همکاران مشخص شد که پروتئاز کدشده توسط ژن *Epr* متعلق به باکتری *B. licheniformis* برای فعالیت نیازمند

یون کلسیم است [۱۹]. گزارش‌های دیگری نیز مبنی بر تأثیر کلسیم بر فعالیت و پایداری پروتئازها منتشر شده است، برای مثال می‌توان به *Bacillus mojavensis* strain A21 و آلکالین پروتئاز تولیدشده به‌وسیله باکتری اندوفایت *B. halotolerans* اشاره کرد [۵۵، ۵۶].

علاوه بر این پس از سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده مشخص گردید که آنزیم مذکور در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و pH: ۸ فعالیت بهینه دارد و دمای بهینه آنزیم نوترکیب His-Q65IP4 با دمای بهینه پروتئاز *B. lehensis* CAS، پروتئاز *B. alveayuensis* 5 و نیز آلکالین سرین پروتئاز مورد مطالعه آریایی و همکاران مطابقت دارد [۸، ۵۷، ۵۸]. بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب His-Q65IP4 در pH: ۸ مشاهده شد که با pH بهینه گزارش شده در مورد آلکالین سرین پروتئاز *B. cereus* VITSN04 و *velezensis* SW5 تطابق دارد [۵۹، ۶۰]. در مطالعه دیگری نیز که توسط فرهادیان و همکاران بر روی پروتئاز *B. subtilis* DR8806 انجام شده است pH: ۸ به‌عنوان pH بهینه گزارش شده است [۶۱].

پروتئین Q65IP4 که در این پژوهش مطالعه شده است، نوعی سرین آلکالین پروتئاز و از اعضای خانواده سوبتیلزین‌ها می‌باشد. سرین آلکالین پروتئازها بزرگ‌ترین زیرگروه از سرین پروتئازها هستند که در pHهای قلیایی بالا فعال می‌باشند [۶۲، ۶۳]. سرین آلکالین پروتئازها به‌وسیله چندین باکتری، کپک‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. آن‌ها پیوندهای پپتیدی را که در سمت کربوکسیل خود اسیدهای آمینه تیروزین، فنیل آلانین یا لوسین هستند، هیدرولیز می‌کنند. اگر چه سرین آلکالین پروتئازها به‌وسیله چندین جنس از باکتری‌ها تولید می‌شوند ولی سوبتیلزین تولیدشده به‌وسیله سویه‌های باسیلوس از بقیه بیشتر شناخته شده است [۶۴]. خانواده سوبتیلزین‌ها شامل سوبتیلازها و گروه کوچکی از پروتئازهای داخل سلولی هستند که ممکن است نقش

- 6- Danquah MK, Agyei D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA Biotech*. 2012; 1 (2): 1-7.
- 7- Chu WH. Optimization of extracellular alkaline protease production from *Bacillus*. *J Ind Microbiol Biot*. 2007; 34: 241-245.
- 8- Joshi S, Satyanarayana T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*. *Bioresour Technol*. 2013; 131: 76-85.
- 9- Pero J, Sloma A. *Proteases in Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*, Pp. 939-952. Edited by AL, Sonenshein JA, Hoch R, Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1993.
- 10- Bhatt HB, Singh SP. Cloning, expression, and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. 2020; *Front Microbiology* 11: 941-956.
- 11- Hadjidj R, Badis A, Mechri S, Eddouaouda K, Khelouia L, Annane R, et al. Purification, biochemical, and molecular characterization of novel protease from *Bacillus licheniformis* K7A. *Int J Biol Macromol*. 2018; 114: 1033-1048.
- 12- Huang W-J, Zuo ZR, Shen W, Singh S, Chen XZ, Fan Y, et al. High-level expression of alkaline protease using recombinant *Bacillus amyloliquefaciens*. *Afr J Biotechnol*. 2012; 11 (14): 3358-3362.
- 13- Suberu Y, Akande I, Samuel T, Lawal A, Olaniran A. Cloning, expression, purification and characterisation of serine alkaline protease from *Bacillus subtilis* RD7. 2019; *Biocatal Agric Biotechnol*. 20: 101264
- 14- Yamagata Y, Ichishima E. A new alkaline serine protease from alkalophilic *Bacillus* sp.: cloning, sequencing, and characterization of an intracellular protease. *Curr Microbiol*. 1995; 30 (6): 357-366.
- 15- Yao Zh, Kim JA, Kim JH. Gene cloning, expression, and properties of a fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus pumilus* BS15 isolated from gul (oyster) jeotgal. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2018; 23 (3): 293-301.
- 16- Jeong SJ, Kwon GH, Chun J, Kim JS, Park CS, Kwon DY. Cloning of fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* isolated from Cheonggukjang and its expression in protease-deficient *Bacillus subtilis* strains. *J Microbiol Biotechnol*. 2007; 17: 1018-1023.
- 17- Kim GM, Lee AR, Lee KW, Park JY, Chun J, Cha J, et al. Characterization of a 27 kDa

مهمی در گردش پروتئین، اسپورزایی و یا پاسخ‌های شوک گرمایی داشته باشند [۴۷-۴۹]. سوبتیلیزین‌ها یک باقیمانده سرین هسته‌دوست واقع در سایت فعال خود دارند. علاوه بر این، این پروتئازها با داشتن باقیمانده آمینواسیدی آسپاراتات و هیستیدین همراه با سرین، و تشکیل سه‌گانه کاتالیتی، از سایر پروتئازها متمایز می‌شوند که این ویژگی نیز در این مطالعه مشاهده شد [۶۵].

همان‌طور که مطالعه‌های بیوانفورماتیکی و مشاهده‌های آزمایشگاهی نشان داد، از سوئی، آنزیم سرین پروتئاز مطالعه شده علاوه بر این که در دسته آنزیم‌های پایدار قرار می‌گیرد؛ به شکل محلول در میزبان بیان خواهد شد و به‌صورت اجسام اینکلوژن تجمع پیدا نخواهد کرد و از سوی دما و pH بهینه گزاش شده‌ای این آنزیم، موجب می‌شود که آنزیم مذکور به‌عنوان گزینه مناسب برای استفاده در صنعت در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در گروه بیوتکنولوژی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره) انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

۹- منابع

- 1- Gupta R, Beg, QK, Khan S, Chahuan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002; 60: 381-95.
- 2- Nascimento WCAD, Martins MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol*. 2004; 35: 91-96.
- 3- Pastor MD, Lorda GS, Balatti A. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Braz J Microbiol*. 2001; 32: 6-9.
- 4- Singh R. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 *Biotech*. 2016; 6(2): 1-15.
- 5- Souza PM, Bitten court MA, Magalhaes PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol*. 2015; 46: 337-346.

- 30- Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics*. 1995; 11(6): 681-4.
- 31- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993; 234: 779-815.
- 32- Benkert P, Künzli M, Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res*. 2009; gkp322.
- 33- Bukhari DA, Barkat, A, Rehman A. Expression, purification, and molecular characterization of a full-length thermostable alkaline protease gene from *Bacillus subtilis* DMA-09. *Biologia*. 2021; 76(2): 741-750.
- 34- Kaur I, Kocher GS, Gupta VK. Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene for an Alkaline Protease from *Bacillus circulans* MTCC 7906. *Indian J microbial*. 2012; 52(4): 630-637.
- 35- Cho S J. Primary structure and characterization of a protease from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from meju, a traditional Korean soybean fermentation starter. *Process Biochem*. 2019; 80: 52-57.
- 36- Yao Z, Meng Y, Le HG, Lee SJ, Jeon HS, Yoo JY. Cloning of a Novel vpr Gene Encoding a Minor Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus subtilis* SJ4 and the Properties of Vpr. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2020; 1720-1728.
- 37- Jeong YJ, Baek SC, Kim H. Cloning and characterization of a novel intracellular serine protease (IspK) from *Bacillus megaterium* with a potential additive for detergents. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018; 108: 808-816.
- 38- Sareen R, Bornscheuer UT, Mishra P. Cloning, functional expression and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol let*. 2005; 27: 1901-1907.
- 39- Yang S, Zhai L, Huang L, Meng D, Li J, Hao Z, et al. Mining of alkaline proteases from *Bacillus altitudinis* W3 for desensitization of milk proteins: Their heterologous expression, purification, and characterization. *Int. J. Biol. Macromol*. 2020; 153:1220-1230.
- 40- Jeong SJ, Heo K, Park JY, Lee KW, Park JY, Joo SH. et al. Characterization of AprE176, a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* HK176. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2015; 25(1): 89-97.
- fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from cheonggukjang. *J Microbiol Biotechn*. 2009; 19: 997-1004.
- 18- Lin S, Zhang M, Liu J, Jones GS. Construction and application of recombinant strain for the production of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *J Biosci Bioeng*. 2015; 119(3): 284- 288.
- 19- Ageitos JM, Vallejo JA, Serrat M, Sanchez-Perez A, Villa TG. In Vitro Ca²⁺-Dependent Maturation of Milk-Clotting Recombinant Epr: Minor Extracellular Protease: From *Bacillus licheniformis*. *Mol Biotechnol*. 2013; 54:304-311.
- 20- Tang XM, Shen W, Lakay FM, Shao WL, Wang ZX, Prior BA, Zhang J. Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett*. 2004; 26: 975-979.
- 21- Çalık P., Kalender N., Özdamar T.H. (2003) Overexpression of serine alkaline protease encoding gene in *Bacillus* species: performance analyses. *Enzyme and microbial technology* 33(7), 967-974.
- 22- Cheng RH, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*. 2006; 28: 55-59.
- 23- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Vol: 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. 2001.
- 24- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc, Natl. Acad. Sci*. 1972; 69: 2110-2114.
- 25- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res*. 1979; 7: 1513-1525.
- 26- Kembhavi AA, Kulharni A, Pant AA. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1993; 38: 83-92.
- 27- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acid Res*. 2007; 36: 320-325.
- 28- Felsenstein J. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol* 1985; 39(4): 783-91.
- 29- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007; 24 (8): 1596 -1599.

- protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020; 145: 594-603.
- 53- Smith CA, Toogood HS, Baker HM, Daniel RM, Baker EN. Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus* Ak.1 protease at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1999; 294(4): 1027-40.
- 54- Jo HD, Kwon GH, Park JY, Cha J, Song, YS, Kim JH. Cloning and Overexpression of aprE3-17 Encoding the Major Fibrinolytic Protease of *Bacillus licheniformis* CH 3-17. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2011; 16: 352-359.
- 55- Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, Hmidet N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresour Technol.* 2009; 100: 3366-3373.
- 56- Dorra G, Ines K, Imen BS, Laurent C, Sana A, Olfa T, et al. Purification and characterization of a novel high molecular weight alkaline protease produced by an endophytic *Bacillus halotolerans* strain CT2. *Int J Biol Macromol.* 2018; 111: 342-351.
- 57- Annamalai N, Rajeswari MV, Balasubramanian T. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveyensis* CAS 5 using marine wastes. 2014; *Food Bioprod Process.* 92 (4): 335-342.
- 58- Ariyaei A, Farhadi A, Moradian F, Rahimi Mianji G. Cloning, expression and characterization of a novel alkaline serine protease gene from native Iranian *Bacillus* sp.; a producer of protease for use in livestock. *Gene.* 2019; 693: 10-15
- 59- Sundararajan S, Kannan CH, Chittibabu S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as dehairing agent. *J Biosci Bioeng.* 2010; 11(2): 128-133.
- 60- Yang H, Liu Y, Ning Y, Wang C, Zhang C, Weng P, Wu Z. Characterization of an Intracellular Alkaline Serine Protease from *Bacillus velezensis* SW5 with Fibrinolytic Activity. *Curr Microbiol.* 2020; 77 (8): 1610-1621.
- 61- Farhadian Sh, Asoodeh A, Lagzian M. Purification, biochemical characterization and structural modeling of a potential htrA-like serine protease from *Bacillus subtilis* DR8806. 2015; *J Mol Catal B: Enzym.* 115: 51-58.
- 41- Meng Y, Yao Z, Le HG, Lee, SJ, Jeon HS, Yoo JY, et al. Characterization of a salt-resistant fibrinolytic protease of *Bacillus licheniformis* HJ4 isolated from Hwangseokae jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Folia Microbiol.* 2021; 1-9.
- 42- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A. Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. Pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. *The proteomics protocols handbook.* Totowa, NJ: Humana Press. 2005.
- 43- Elyasi Far B, Yari Khosroushahi A, Dilmaghani A. In Silico Study of Alkaline Serine Protease and Production Optimization in *Bacillus* sp. Khoz1 Closed *Bacillus safensis* Isolated from Honey. *Int J Pept Res Ther.* 2020; 13: 1-11.
- 44- Guleria S, Walia A, Chauhan A, Shirkot CK. Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *Int J Food Microbiol.* 2016; 232: 134-143.
- 45- Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem.* 1980; 88: 1895-1898.
- 46- Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J mol Boil.* 1982; 157: 105-32.
- 47- Valbuzzi A, Ferrari E, Albertini AM. A novel member of the subtilisin-like protease family from *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 1999; 145(11): 3121-3127.
- 48- Siezen RJ, Leunissen JAM. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein sci.* 1997; 6: 501-523.
- 49- Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 2004; 5 (10): 1-12.
- 50- Koide Y, Nakamura A, Uozumi T, Beppu T. Cloning and sequencing of the major intracellular serine protease gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1986; 167: 110-116.
- 51- Takagi H, Takashi M. A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 63: 1-9.
- 52- Ji ZL, Peng S, Chen LL, Liu Y, Yan C, Zhu F. Identification and characterization of a serine

keratinolytic activity. Appl Biochem Biotechnol. 1998; 70-72, 199-205. doi:10.1007/BF02920136.

65- Doukyu N, Ogino, H. Organic solvent-tolerant enzymes. Biochem Eng J. 2010; 48 (3): 270-282.

62- Hedstrom, Lizbeth. Serine protease mechanism and specificity. Chem Rev. 2002; 102 (12): 4501-4524.

63- Kraut Joseph. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. Annu Rev Biochem. 1977; 46 (1): 331-358.

64- Zaghloul TI. Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease (aprA) gene showing high level of

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

zahra aghaei jeshvaghani, Ramin Hosseini

1-master of science PhD student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University .iran

2- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University –iran

*Corresponding author: r.hosseini@eng.ikiu.ac.ir

Receipt: 2021/04/19

Accepted: 2021/09/26

Abstract

Introduction: Proteases are among the most important industrial enzymes. *Bacillus* bacteria are commonly used to produce these enzymes. The aim of this study was cloning, sequencing, expression and bioinformatics study of *aprX* serine protease gene existing in *Bacillus licheniformis*.

Materials and Methods: In this study, after extraction of bacterial DNA, *aprX* serine protease genes was isolated from *Bacillus licheniformis* and cloned into pTG19-T and then subcloned in pET28a vector. The molecular structure, its biochemical and phylogenetic properties were investigated and three-dimensional structure of the cloned enzyme was predicted. For the induction of gene expression and protein production of the recombinant serine protease IPTG was used at different concentrations, different temperatures and different time courses. Confirmation of *aprX* gene expression was performed by SDS-PAGE and dot blot analysis. Then, the activity of recombinant protease enzyme was measured at different temperatures and pHs.

Results: Cloning was validated by sequencing. Based on the results of phylogenetic studies, the obtained protein sequence showed a high similarity to the sequences of proteases present in other *Bacillus* species. After evaluating the obtained models, it was found that the models provided by RAPTrox and I-TASSER software were suitable for predicting the three dimensional structure of this protease. The recombinant protein production was successfully induced by IPTG induction in the host containing the plasmid pET28a-*aprX*. The highest expression values were obtained at 25 °C after 20 h induction with 0.5 mM IPTG. Also, the produced recombinant protein showed the highest activity at 50 °C and pH 8.

Conclusion: Studies have shown that the enzyme encoded by this gene is in the category of stable enzymes and will be expressed soluble in *Escherichia coli*. These advantages make the enzyme is a suitable candidate to be considered for use in industry.

Keywords: Expression optimization, Recombinant protein expression, Sequencing, Dot blotting, Protein modeling, Molecular cloning