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

زهرا آقایی جشوقانی[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

مسئول:*نویسنده 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* استخراج‌شده 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 *باسیلوس‌ها* 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 به عنوان 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 ٦٠ 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 ریزسازواره ها برای مثال در انعقاد خون، فعال سازی زیموژن، انتقال پروتئین ترشحی از غشا، رشد تومور، رشد و نمو سلول و کاتابولیسم پروتئین ها نقشه ای حیاتی را بازی می‌کنند [؛ ۵]. از پروتئازها به‌طور گسترده در صنعت داروسازی برای تهیه مواد دارویی نظیر پمادهایی برای بهبود زخم ها و تولید ترکیبات الیگوپپتیدی مختلف با اهداف دارویی استفاده می‌شود. از این آنزیم‌ها در پزشکی برای از بین بردن انگل های 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 [٦].

ریزسازواره‌ها منبع مناسبی برای تولید آنزیم‌ها محسوب می‌شوند؛ چرا که آنزیم‌های موجود در آن‌ها ازنظر 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 آنزیم های جدید با خصوصیات تغییریافته، 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* شناسایی‌شده و ژن مرتبط با آن ها همسانه سازی 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. licheniformis* CH3-17 و *B. amyloliquefaciens* به‌صورت هترولوگ درون میزبان باکتریایی بیان‌شده‌اند که ازنظر زیستی فعال بوده و پروتئین‌هایی به طول ۲۹-۲۷ کیلودالتون را تولید کرده‌اند [۱٦؛ ۱۷]. هم‌چنین لین و همکاران پس از همسانه سازی 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 انجام‌شده است که به‌عنوان نمونه تانگ و همکاران موفق به افزایش ٦۵ 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 انجام‌شده روی پروتئازهای *B. licheniformis*

هیچ‌گونه مطالعه‌ای روی ژن *aprX* متعلق بـه بـاکتری *B. licheniformis* انجام‌نشده است.

از آنجایی کـه تـوالی ژن‌هـای رمزکننـده آنـزیم‌هـا بـا ساختار و عملکرد آن‌هـا رابطـه مسـتقیمی دارد، بنـابراین آگاهی از توالی ژن برای اسـتفاده از روش‌هـای مهندسـی ژنتیک به‌منظور در سایر میزبـان‌هـا و درنتیجـه بـالا بـردن تولید آنزیم و بهینه‌سازی آن نقش بسـزایی دارد. هـدف از این مطالعه، جداسازی، همسـانه‌سـازی و بیـان ژن سـرین پروتئاز از باکتری *B. licheniformis*، با عنوان *aprX* بود تا ضمن شناسایی توالی و عملکرد آنـزیم مـورد مطالعـه، در پژوهش های آینده بتـوان از آن بـه کمـک فنـاوری DNA نوترکیب با اهداف خاص تجاری استفاده کـرد. همچنـین لازم است به‌منظور شناخت بیشتر نسبت به عملکـرد ایـن آنـزیم، خصوصـیات بیوشـیمیایی و سـاختار دوبعـدی و سه‌بعدی پروتئین مورد مطالعه، پیش‌بینی شـود و در ادامـه نیز به منظور بررسی تعیـین جایگـاه آن در گـروه ژن هـای پروتئاز، همولوژی و فیلوژنتیکی ژن همسـانه سـازی شـده 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
Bacillus sp.	سرین آلکالین پروتئاز	۳٤ kDa	۵۰	۱۱	Yamagata and Ichishima 1995 [۱٤]
B. amyloliquefaciens	آلکالین پروتئاز	۳۱ kDa	۵۰	۹/۵	Huang et al. 2012 [۱۲]
Bacillus lehensis	سرین پروتئاز	۳۹ kDa	۵۰	۱۲/۸	Joshi et al. 2013 [۸]
B. licheniformis	آلکالین پروتئاز	۳۰ kDa	۷۰	۱۰	Hadjidj et al. 2018 [۱۱]
Bacillus pumilus	سرین پروتئاز (فیبرینولیتک)	۲۷ kDa	٤۰	۸	Yao et al. 2018 [۱۵]
B. subtilis RD7	سرین آلکالین پروتئاز	٤۳ kDa	٤۰	۱۰	Suberu et al. 2019 [۱۳]
B. lehensis JO-26	سرین آلکالین پروتئاز	۳٤ kDa	۵۰	۱۰	Bhatt et al. 2020 [۱۰]

استخراج DNA ژنومی با استفاده از آنـزیم لیـزوزیم و براساس روش بیان‌شده توسـط چنـگ و همکـاران انجـام گرفت [۲۲] و پـس از آن کمیـت و کیفیـت آن بـه‌وسـیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed-UVD3200 انگلستان)، در طول موج هـای ۲٦۰ و ۲۸۰ نـانومتر و الکتروفـورز ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد بررسـی شـد. واکـنش PCR روی DNA استخراجی بـا اسـتفاده از Pfu DNA polymerase (fermentas) و آغازگرهـــا در دســـتگاه Eppendorf Mastercycler Gradient بـرای ۳۵ چرخـه انجـام شـد. شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد بـه مـدت ۳۰ ثانیـه، مرحلـه اتصال با دمای ٦۰ درجه سانتیگراد به مدت یـک دقیقـه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بـه مـدت یـک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیـه در دمـای ۹٤ درجه سانتیگراد ۳ دقیقه و مرحله تکثیـر نهـایی در دمـای ۷۲ درجـه سـانتیگراد بـه مـدت ۵ دقیقـه انجـام گرفـت.

خالص‌سازی 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 (Takara) T4 به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و ۱٦ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام پذیرفت [۲۳]. محصول اتصال به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *اشریشیاکلای* (*Escherichia coli*) سویه DH5α انتقال داده شد [۲٤]. به‌منظور انجام آزمون سفید-آبی، باکتری‌ها روی محیط کشت جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار، IPTG و X-gal کشت داده شدند و پس از ۱٦ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، تعدادی کلونی سفید به‌عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب و بررسی دقیق‌تر شدند. استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش لیز قلیایی با استفاده SDS انجام گرفت [۲۵] و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو روش PCR و هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *HindIII* بررسی شدند. توالی یابی DNA پلاسمید حاوی قطعه نوترکیب به وسیله شرکت Bioneer کره جنوبی و با استفاده از آغازگر پروموتر باکتریوفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت انجام شد. پلاسمیدهای pTG19-T-aprX و pET28a (+) به صورت جداگانه با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و ژن مربوط به *aprX* در پلاسمید pET28a (+) همسانه‌سازی شد و صحت همسانه‌سازی بررسی شد. پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه BL21 (DE3) انتقال داده شد [۲٤].

۲- بیان و تخلیص پروتئین His-Q65IP4

یکی از کلنی‌های BL21 (DE3) نوترکیب به ۱۰ میلی‌لیتر LB مایع حاوی ۵۰ میکرومولار کانامایسین تلقیح و به مدت ۱٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۵۰ میلی‌لیتر 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 ۱٦، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ و غلظت‌های ۰/۱ ، ۰/۵ و یک میلی‌مولار IPTG و در زمان‌های ٤، ۸ و ۲۰ ساعت پس از القا IPTG به‌وسیله SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از باکتری القاشده در شرایط مختلف، در ۷۰۰۰ دور در دقیقه در ٤ درجه سانتریفیوژ شدند و رسوب باکتری‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl و ۱ میلی‌مولار EDTA) حل شد و باکتری‌ها توسط امواج فراصوت لیز گردیدند. سونیکاسیون شامل ده مرحله یک‌دقیقه‌ای 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 نمونه‌ها برای بررسی روی ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد بارگذاری گردید. با توجه به این‌که قطعه همسانه‌سازی شده در انتهای آمینی خود دارای یک دنباله شش‌تایی هیستیدینی است؛ خالص‌سازی پروتئین هدف با استفاده از روش کروماتوگرافی جذبی و به کمک رزین و براساس دستور کار شرکت Thermo scientific انجام شد. به‌منظور تأیید بیان پروتئین هترولوگ از روش دات بلات و آنتی‌بادی ضد دنباله هیستیدینی (محصول شرکت Biolegend) به‌عنوان آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. در این پژوهش آنتی‌بادی علیه IgG موش نشاندار با پراکسیداز ساخت شرکت Bio-Rad به‌عنوان آنتی‌بادی دوم مورد استفاده قرار گرفت. درنهایت در حضور پراکسید هیدروژن و سوبسترایی به نام Diaminobenzidine (DAB)، در محل کمپلکس آنتی‌ژن – آنتی‌بادی بر روی غشا لکه‌های قهوه‌ای رنگ ایجاد شد.

۳- سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب

فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص‌سازی شده، براساس روش کمبهاوی با استفاده از کازئین یک درصد به‌عنوان سوبسترا و منحنی استاندارد تیروزین با سه تکرار اندازه‌گیری شد [۲٦]. یک واحد فعالیت آنزیم پروتئاز، مقدار آنزیمی است که می‌تواند در هر دقیقه یک میکرومول تیروزین را در شرایط آزمایش تولید کند. برای به دست آوردن یون موردنیاز آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده، نخست فعالیت آنزیم نوترکیب در حضور یون‌های روی، منیزیم و کلسیم با غلظت های نهایی ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌مولار بررسی شد. سپس به‌منظور بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم نوترکیب، سنجش فعالیت آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده با غلظت بهینه یون موردنظر در دماهای ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰ و ۷۰ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از مدت ۳۰ دقیقه، برای توقف واکنش ۵۰۰ میکرولیتر TCA سرد ۲۰ درصد به هرکدام از ویال‌ها اضافه شد و جذب آن‌ها در ۲۸۰ نانومتر قرائت و فعالیت آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده در دماهای مختلف (۲۰-۷۰ درجه سانتیگراد) بررسی شد. واکنش سنجش پروتئاز آنزیمی با pHهای مختلف (٤-۱۲) و در دمای بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده انجام و جذب نمونه‌ها در ۲۸۰ نانومتر قرائت و فعالیت پروتئاز آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده در pHهای مختلف (٤-۱۲) بررسی شد. (جدول ۲)

جدول ۲ آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر

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

با استفاده از برنامه Translate توالی نوکلئوتیدی حاصل از فرایند توالی یابی ترجمه شد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست‌آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam، ProtScale، TMHMM و Signalp موجود در تارنمای (https://www.expasy.org/proteomics) بررسی شد. محلول بودن پروتئین پس از بیان در باکتری *اشریشیاکلای* به‌وسیله برنامه SCRATCH موجود در تارنمای (http://scratch.proteomics.ics.uci.edu) و سرور آنلاین Recombinant Protein Solubility Prediction به نشانی http://www.biotech.ou.edu موردبررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی توالی‌های حفاظت‌شده و دومین‌های موجود در این پروتئین از برنامه‌های ScanProsite (http://prosite.expasy.org/scanprosite)، 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 اسیدآمینه به‌دست‌آمده از Translate به‌منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST جستجو شد و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف (که بیشترین شباهت را با توالی موردنظر داشتند)، انتخاب و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه استفاده شدند (جدول ۳) و درخت فیلوژنتیکی مربوط به ژن *aprX* با استفاده از نرم‌افزار MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ویرایش ۵/۲ و با استفاده از ماتریس‌های تشابه گوناگون ترسیم شد. درجه اعتبارسنجی گروه بندی‌های ایجادشده با Bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار تعیین شد [۲۸؛ ۲۹].

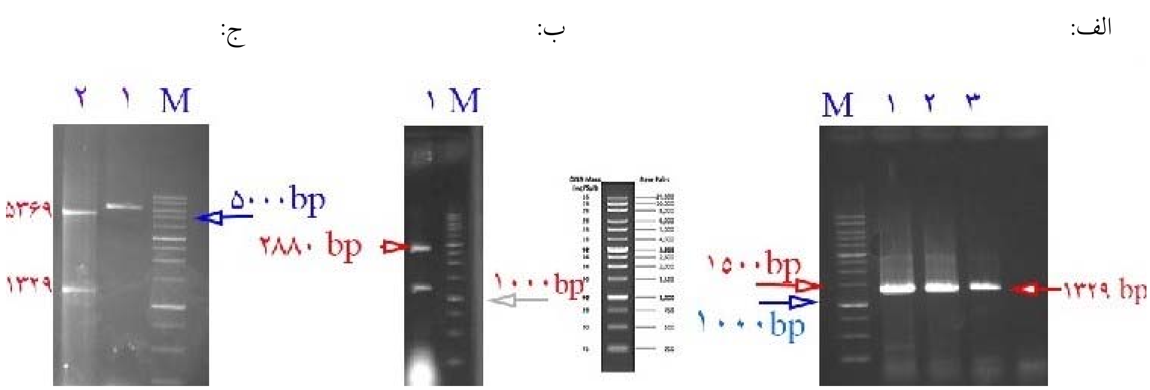
ساختارهای دوم و سوم پروتئین به‌وسیله SOPMA [۳۰]، PHYRE2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi

?id=index)، PyMOL موجـــــود در تارنمـــــای (https://www.pymol.org)، I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) و RAPTORX (http://raptorx.uchicago.edu) تعیـــین شد. هم چنین ساختار سوم پروتئین مورد مطالعه با استفاده از نـرم‌افـزار Modeller 9v16 بـه روش چنـد الگـویی مدل‌سازی شد [۳۱]. از امتیاز C (C-score) بـرای تخمـین کیفیت مدل های پیش بینی‌شده توسط I-TASSER استفاده شـد. هـم‌چنـین بـه‌منظـور ارزیـابی کیفیـت پارامترهـای ساختاری مـدل‌هـای ترسـیم‌شـده از نـرم‌افـزاری بـه نـام procheck موجـــــود در تارنمـــــای (https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES) برای ترسیم نمودار راماچاندران استفاده شد و در ادامـه نیـز Q-mean score (http://swissmodel.expasy.org/qmean) و Z-score (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) مدل‌ها محاسبه شد [۳۲].

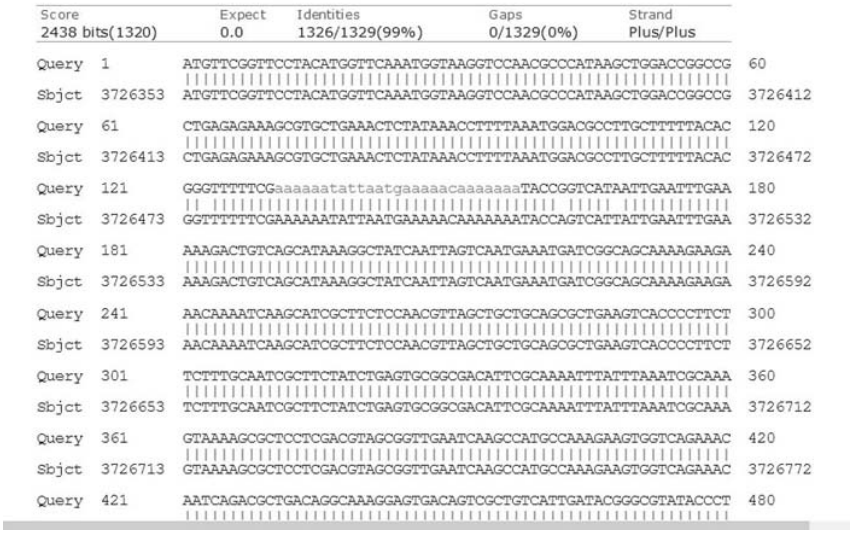
٤- نتایج

جداسازی، همسانه‌سازی، بیان و بررسی توالی‌هـای آمینواسـیدی و ویژگـی‌هـای فیزیکوشـیمیایی تـوالی پروتئین به‌دست‌آمده

پس از استخراج DNA باکتریایی، ژن رمزکننـده *aprX* با استفاده از PCR از باکتری *B. licheniformis* جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pTG19-T همسانه سازی شـد. پـس از اسـتخراج پلاسـمید، فراینـد همسـانه‌سـازی بـا انجـام آزمون‌های PCR (شکل ۱- الف) و هضم آنزیمی دوگانـه با دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III با تولید قطعه به اندازه bp ۱۳۲۹ به‌صورت تک باند بر ژل آگارز ۱/۲ درصـد و بـافر TBE تأیید شد. هم‌چنین نتایج توالی‌یابی DNA نشـان داد که ژن رمزکننده *aprX*، به درستی روی جایگـاه چندگانـه همسانه‌سازی ناقل pTG قرار گرفته است (شکل ۲).



شکل ۱ الف- تکثیر ژن *aprX* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز M- نشانگر انـدازه مولکـولی 1 Kb، ۱ و ۲ و ۳- نتـایج حاصـل از تکثیر ژن *aprX* به‌وسیله PCR ؛ ب- نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیـب M pTG-aprX- نشـانگر انـدازه مولکـولی 1Kb ۱- پلاسمید pTG-aprX نوترکیب هضم شده با دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III؛ ج- نتایج حاصل از هضم آنزیمـی پلاسـمید نوترکیـب pET28-aprX M- نشانگر اندازه مولکولی1Kb ۱- پلاسمید نوترکیب هضم نشده ۲- پلاسمید pET28-aprX نوترکیـب هضـم شـده بـا دو آنـزیم *Eco*RI و *Hind*III



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

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

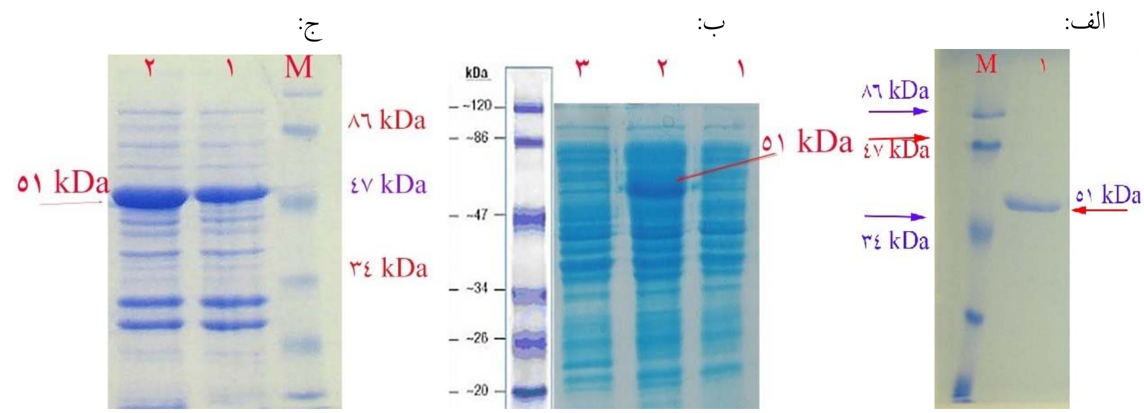
ردیف	جنس و گونه	نام اختصاصی ژن	نام اختصاصی پروتئین در پایگاه UNIPROT	شماره دسترسی	درصد تشابه پروتئین
1	*B. licheniformis*	*AprX*	Q65IP4	NC_006322.1	100
2	*B. subtilis*	*AprX*	Serine protease AprX O31788	NC_000964	71
3	*B. gobiensis*	AM592_19005	A0A0M5JMB5	NZ_CP012600	68.8
4	*B. halodurans*	*aprX*	Intracellular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

پلاسمیدهای pTG-aprX و pET28a(+) به‌صورت جداگانه با دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III، برش یافتند و پس از آن ژن *aprX* در ناقل خطی‌شده pET28a(+) طی فرایند اتصال و با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Takara)

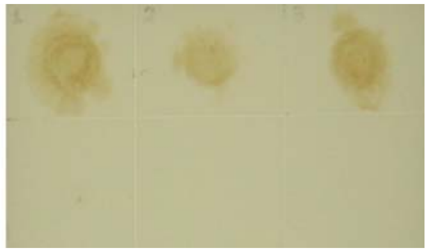
الحاق شد و پلاسمید نوترکیب pET28a-aprX به باکتری *E. coli* سویه DH5α انتقال داده شد و با هضم آنزیمی با دو آنزیم *Eco*RI و *Hind*III و توالی‌یابی، حضور ژن و استقرار آن به‌درستی تأیید شد (شکل ۱- ب).

برای تولید پروتئین نوترکیب، 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 پیش‌بینی شد. وجود باند پروتئینی واضح در محدوده ۵۱ کیلودالتون بر ژل SDS-PAGE در حضور IPTG (با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار) نسبت به عدم حضور القاکننده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۴ ساعت پس از افزودن IPTG بیانگر تولید موفق پروتئین نوترکیب بود (شکل ۳- الف). گرچه وزن مولکولی آنزیم تولیدی در محدوده وزن مولکولی اغلب سرین پروتئازها قرار ندارد، اما نزدیک به وزن مولکولی گزارش‌شده برای آلکالین پروتئاز *B. subtilis* DMA-09 و *B. circulans* MTCC 7906 و پروتئین بیان‌شده به‌وسیله ژن *epr* متعلق به *B. licheniformis* است [۱۹؛ ۳۳؛ ۳۴].

در ادامه به‌منظور بهینه‌سازی بیان پروتئین نوترکیب از دماهای ۱۶، ۲۲، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده گردید و نمونه‌های بیانی ۰ ، ۴ و ۲۰ ساعت پس از القای IPTG جمع‌آوری شدند. بیشترین میزان بیان پروتئین در دمای ۲۵ درجه و ۲۰ ساعت پس از القای IPTG با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۳-ب). پس از استخراج پروتئین‌های محلول، پروتئین نوترکیب تولیدشده در فاز محلول توسط کروماتوگرافی جذبی خالص‌سازی شد که در شکل ۳-ج نمونه خالص‌شده این پروتئین در محدوده ۵۱ کیلودالتون دیده می‌شود. در شکل ۴ نیز نتایج حاصل از دات بلات موجود است. ردیف اول حاصل واکنش بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX است که به‌صورت لکه‌های قهوه‌ای رنگ مشاهده می‌شود و نشان‌دهنده صحت بیان پروتئین نوترکیب است و این در حالی است که در ردیف دوم که ژنی وارد پلاسمید نشده و پروتئینی بیان‌نشده است و به‌این‌ترتیب لکه‌های قهوه‌ای هم مشاهده نمی‌شود.



شکل ۳ آنالیز SDS-PAGE بیان و خالص‌سازی پروتئین نوترکیب His-Q65IP4 تولیدشده در باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3).
الف- M- نشانگر پروتئینی. ۱- پروتئین کل استخراج‌شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX در زمان صفر. ۲- پروتئین کل استخراج‌شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۴ ساعت پس از القا. ۳- پروتئین کل استخراج‌شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a ۴ ساعت پس از القا IPTG با غلظت نیم میلی‌مولار؛ ب- M- نشانگر پروتئینی. ۱- پروتئین محلول استخراج‌شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۸ ساعت پس از القای IPTG با غلظت نیم میلی‌مولار. ۲- پروتئین محلول استخراج‌شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۲۰ ساعت پس از القای IPTG با غلظت نیم میلی‌مولار؛ ج- ۱- پروتئین خالص‌سازی شده از باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX



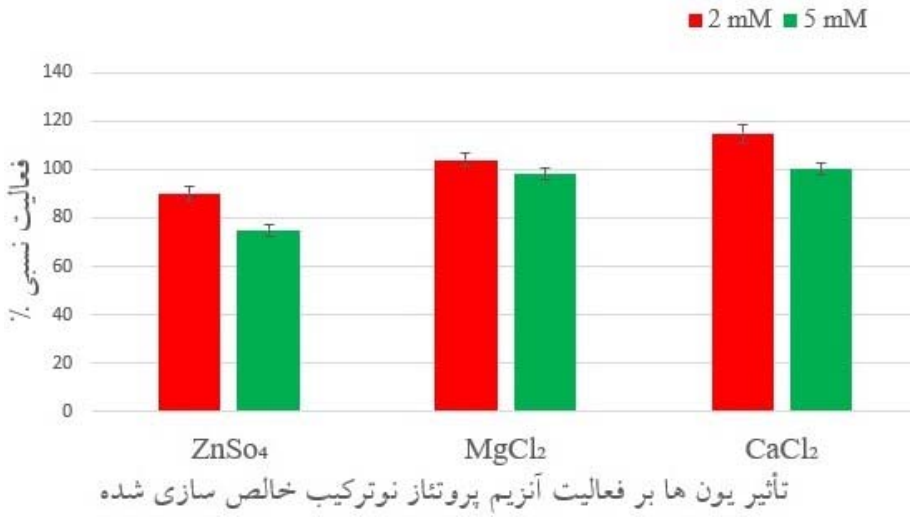
شکل ٤ آنالیز دات بلات پروتئین نوترکیب Q65IP4. ۱- بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a-aprX ۲- بیان پروتئین محلول مربوط به باکتری حاوی پلاسمید pET28a(+)

۵- سنجش فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب

در آزمایش‌های سنجش فعالیت پروتئازی روی آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده His-Q65IP4، مشخص شد که یون کلسیم با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار بیشترین تأثیر را بر فعالیت پروتئازی این آنزیم نوترکیب دارد و فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب تولیدی را تا ۱۱۵ درصد نسبت به حالت استفاده نکردن از یون کلسیم افزایش نشان داد. فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده در هر دو غلظت یون روی موجب کاهش فعالیت آنزیم شد. نتایج حاصل از بررسی اثر کلسیم بر آنزیم مذکور با نتایج گزارش‌شده در مورد آلکالین پروتئاز *Bacillus subtilis* SJ4 و پروتئاز *B. amyloliquefaciens* هم‌خوانی دارد [۳۵؛ ۳٦]. در مورد منیزیم هم گرچه غلظت ۲ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب شد، اما در مقایسه با تأثیر غلظت ۲ میلی‌مولار کلسیم این مقدار کمتر از ۱بود (شکل ۵).

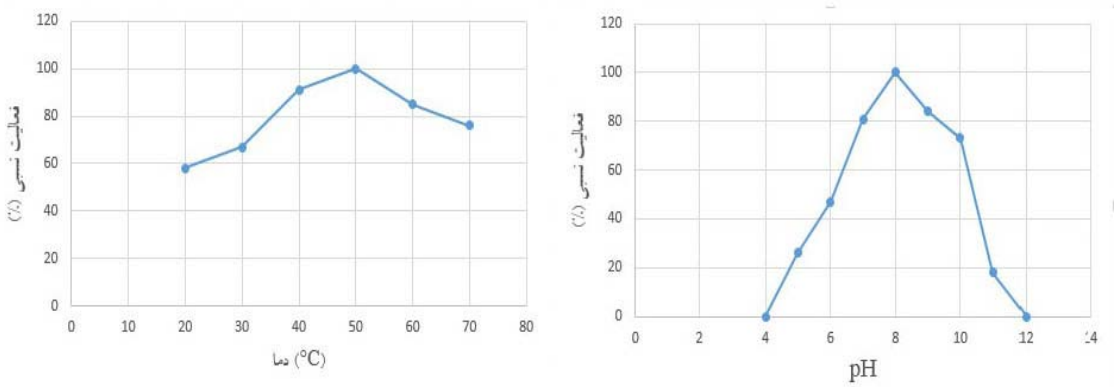
نتایج حاصل از بررسی تأثیر دما بر فعالیت آنزیم نوترکیب نشان داد که آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده در طیف دمایی ۲۰ تا ۷۰ درجه سانتیگراد بیش ۵۵ درصد فعالیت داشته (شکل ٦- ب) و بهینه فعالیت آن در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد است. دمای بهینه آنزیم نوترکیب His-Q65IP4 با دمای بهینه متعلق به پروتئاز *B. lehensis* JO-26 ، سرین پروتئاز باکتری *B. megaterium* و دمای بهینه پروتئاز مورد مطالعه سارین و همکاران مطابقت دارد [۱۰؛ ۳۷؛ ۳۸].

آنزیم نوترکیب خالص‌سازی شده در pHهای ۵ تا ۱۱ فعالیت پروتئازی داشته است (شکل ٦- الف). نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج مطالعه انجام شده به‌وسیله 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 ٦/۵ تا ۱۰/۵ بیش از ٦۰ درصد فعالیت دارند و آنزیم BaApr9 نیز فعالیت بیش از ٦۰ درصدی در محدوده pH ۱۰/۵– ۱۱/۵ دارد [۳۹]. هم‌چنین در مطالعه انجام شده توسط سوبرا و همکاران بر پروتئاز *B. subtilis* RD7 نیز محدوده pH ٦ تا ۱۱ برای فعالیت آنزیم گزارش شد [۱۳]. بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب His-Q65IP4 در pH: ۸ مشاهده شد که با pH بهینه گزارش‌شده در مورد آنزیم فیبرینولیتیک *B. licheniformis* HJ4، *B. pumilus* BS15 و *B. subtilis* HK176 تطابق دارد [۱۵؛ ٤۰؛ ٤۱].



شکل ۵ بررسی تأثیر یون‌های مختلف با غلظت‌های متفاوت بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص‌سازی شده

الف: ب:



شکل ٦ الف- بررسی اثر pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص‌سازی شده؛ ب- بررسی اثر دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز نوترکیب خالص‌سازی شده.

بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب بازخوانی DNA رمزکننده سرین پروتئاز *aprX* ثبت‌شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی NC_006322.1 به طول bp ۱۳۲۹ بوده که با کدون ATG آغازشده و با کدون‌های TAA پایان پیدا کرده و پروتئینی با ٤٥٦ آمینواسید را رمز می‌کند. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست‌آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه‌شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی‌شده پروتئین ژن رمزکننده *aprX* با فرمول مولکولی $C_{2110}H_{3360}N_{590}O_{662}S_{20}$، به ترتیب برابر با ٤٨/٢٢ کیلو دالتون و ٥/٦٩ می‌باشد. شاخص ناپایداری پروتئین کدشده به‌وسیله *aprX* در لوله ٣٥/١٦ محاسبه شد و درنتیجه پروتئین در رسته پروتئین‌های پایدار قرار می‌گیرد [٤٢]. همچنین شاخص آلیفاتیک به‌عنوان یک عامل مهم به‌منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت ٨٢/٢٦ برای پروتئین Q65IP4 محاسبه شد که به میزان این شاخص در مورد آلکالین پروتئاز موجود در *B.*

lehensis SP1 *B. amyloliquefaciens* و *B. safensis* نزدیک است [۸، ۴۳، ٤٤] و پروتئین مطالعه شده در این پژوهش را در گروه پروتئین های پایدار در برابر حرارت به شمار آورد [٤٥]. 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 ۰/۳٤۱- 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 (٤٤٢ عدد)، ۵۷ اسیدآمینه بار منفی داشتند؛ درحالی‌که تعداد کل اسیدآمینه ها با بار مثبت ٤٩ بود [٤٦]. براساس برآوردی که به‌وسیله برنامه SCRATCH انجام شد؛ گرچه سه باند دی سولفیدی در پروتئین Q65IP4 تشکیل می‌شود، میزان محلول بودن آن پس از بیان دارای احتمالی برابر با ۰/٦٦۸۳٤٤ می‌باشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که به‌صورت محلول بیان می‌شود. براساس نتایج مشاهده شده 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 ۱۲٦ تا ٤۳۹ دارد که این نتایج با نتایج گزارش‌شده توسط والبوزی و همکاران در مورد ژن *apr* موجود در *B. subtilis* مطابقت دارد [٤٧]. 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 [٤۸]. 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 رمزشده به‌وسیله این ژن نیز مشاهده شد و نتایج مشاهده‌شده با نتایج گزارش‌شده در مورد ژن *apr* موجود در *B. subtilis* و سایر اعضای خانواده سرین پروتئازهای شبه‌سوبتیلیزین مطابقت دارد [٤۷، ٤۸].

٦- بررسی همولوژی و فیلوژنتیکی پروتئین Q65IP4 با سایر پروتئازها

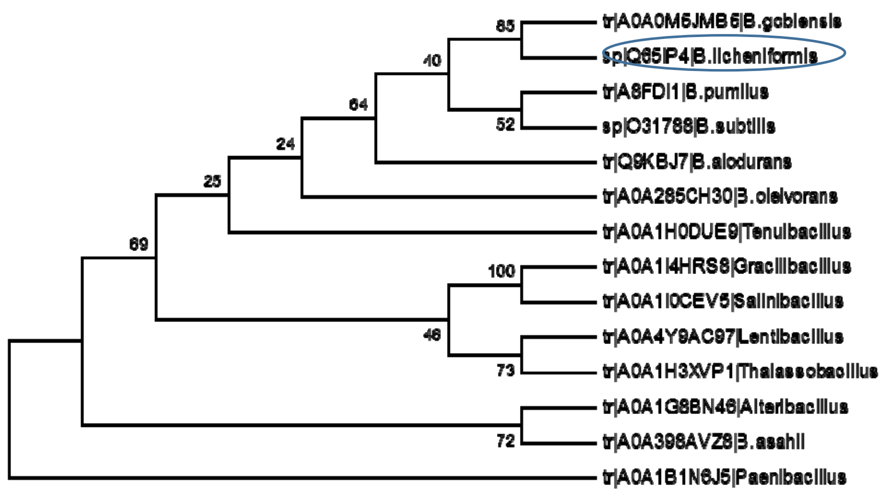
توالی پروتئینی به‌دست‌آمده از سرین پروتئاز *aprX* با پروتئازهای موجودات دیگر مقایسه شدند. پروتئین Q65IP4 بالاترین تشابه را با پروتئین‌های O31788 موجود در *B. subtilis*، A0A0M5JMB5 متعلق به *B. gobiensi* و Q9KBJ7 مربوط به *B. halodurans* به ترتیب به میزان ۷۱، ٦۸/۸ و ٦۸/٦ درصد دارد. ازآنجایی‌که گونه *B. licheniformis* ازنظر ژنتیکی با گونه *B. subtilis* ٨٤ درصد شباهت دارد [٤۹] انتظار می‌رفت که بیشترین شباهت پروتئین مذکور با پروتئین *B. subtilis* دیده شود. در تمامی توالی‌های ذکرشده در جدول ۳، توالی‌های DTG (۱۵۵-۱۵۷)، GHGTHCAG (۱۸٦-۱۹۳)، PYDD (۱۸٤-۱۸۱)، ITVGA (۳۱۱-۳۱۵) و SGTSMA (۳۸٦-۳۸۱) حفاظت شده هستند. حفاظت شدگی 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 کوییک 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 توالی های اسیدآمینه سه تایی جایگاه فعال آنزیمی شامل سرین، آسپارتات 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* (ازجمله *B. circulans*، *B. subtilis* و *B. licheniformis*)، حفاظت‌شدگی ازنظر تعداد نوکلوتید و نیز آمینواسید در میان این گونه‌ها گزارش‌شده است [۳٤]. بررسی فیلوژنتیکی توالی پروتئین Q65IP4 با توالی های مربوط به پروتئازهای سایر موجودات با استفاده از نرم‌افزار Mega 5.2 و به روش Neighbor Joining نشان داد که پروتئین مذکور ازنظر 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* قرارگرفته اند که نشان دهنده قرابت میان پروتئازهای مختلف جنس *باسیلوس* است [۵۰]. گزارش های تاکاگی و همکارانش نیز نشان می‌دهد که ۸۵ درصد همولوژی بین پروتئازهای مقاوم به حرارت باکتری‌های *B. stearothermophilus* و *B. thermoproteolyticus* و 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.

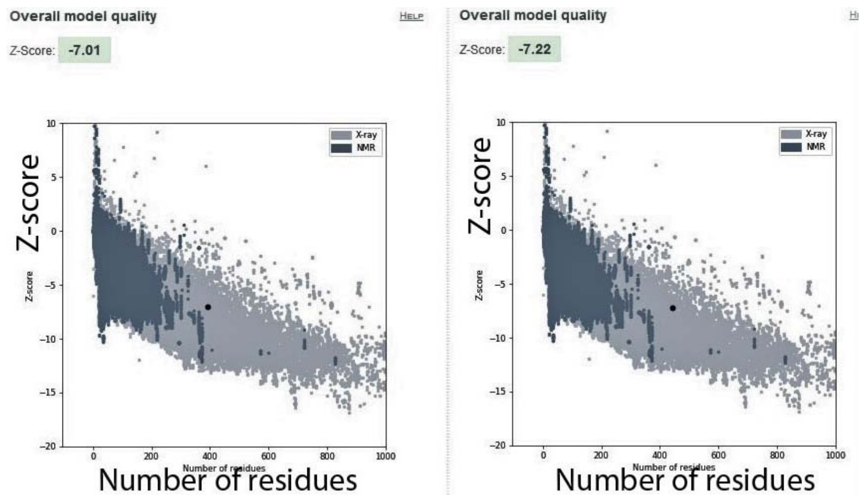
۷- بررسی ساختار دوم و مدل‌سازی مولکولی پروتئین رمزشده به‌وسیله ژن *aprX*

بررسی ساختار دوم پروتئین Q65IP4 با استفاده از برنامه SOPMA نشان داد ۱۵۱ آمینواسید متعلق به این پروتئین در ساختار آلفا هلیکس (۳٤/۱٦ درصد)، ٤۳/۲۱ درصد مارپیچ اتفاقی (۱۹۱ آمینواسید)، ۳٤ آمینواسید در ساختار دور β (۷/٦۹ درصد) قرارگرفته‌اند. بیشترین ساختار دوم برای پروتئین Q65IP4 در نرم‌افزار PHYRE2، آلفاهلیکس با ۲۷ درصد از کل ساختارهای دوم و پس از آن صفحه‌های بتا با فراوانی ۲۳ درصد در نظر گرفته‌شده است. پس از پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین مذکور با استفاده از نرم افزارهای PHYRE2، I-TASSER، Modeller و RAPTORX، این مدل‌ها با استفاده از نمودار راماچاندران 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

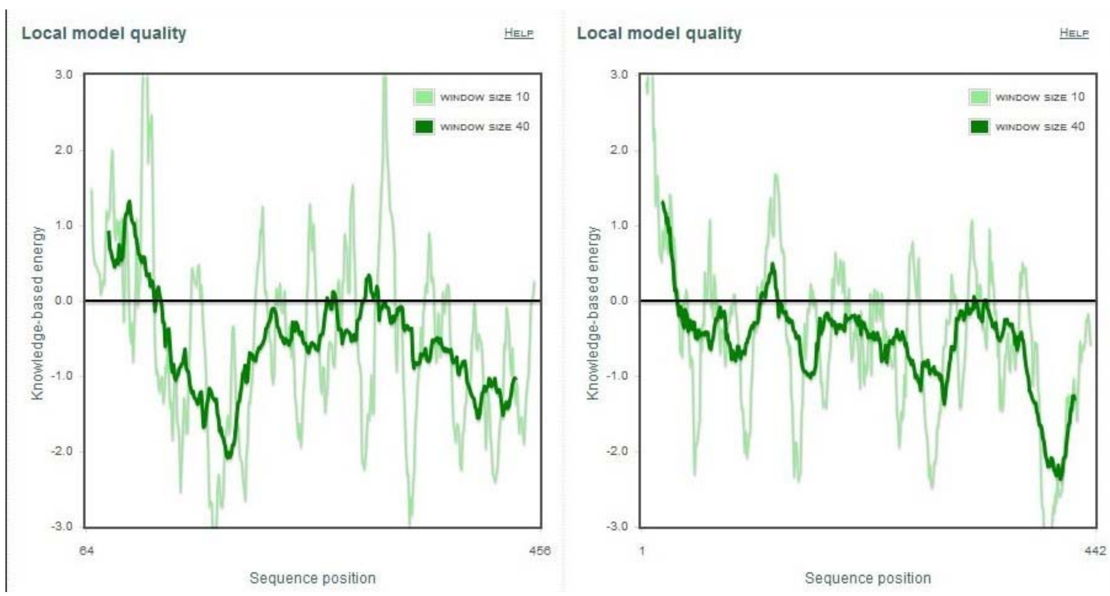
درصد برای مدل شماره یک مشاهده شد. میزان اسیدهای آمینه های موجود در ناحیه مطلوب در نمودار راماچاندران مربوط به مدل ارائه‌شده به‌وسیله نرم‌افزار PHYRE2 ۸۱ درصد بود. ازاین‌رو براساس برآورد نمودار راماچاندران، مدل ترسیمی به‌وسیله نرم‌افزار RAPTORX مدل مطلوب‌تری می‌باشد و مدل ارائه‌شده توسط PHYRE2 و Modeller در مرتبه دوم قرار می‌گیرند. پس از ارزیابی شاخص Q-mean مربوط به مدل‌های ترسیم‌شده، مدل ارائه‌شده به‌وسیله نرم‌افزار RAPTROX با احتساب Q-mean برابر با ۰/٦۰۵ باکیفیت‌ترین 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. هم‌چنین مدل پیشنهادی به‌وسیله ابزار آنلاین I-TASSER نیز با داشتن Q-mean برابر با ۰/٦۰۱ مدلی قابل‌قبول محسوب می‌شود. ساختارهای پیش‌گویی شده خروجی نرم‌افزارهای I-TASSER و RAPTORX به‌وسیله نرم‌افزار Prosa به‌عنوان بهترین مدل‌ها انتخاب شدند. میزان Z-score برای این دو مدل به ترتیب با ۷/۲۲- و ۷/۰۱- محاسبه شد که در بازه امتیازهایی است که به‌طور معمول برای پروتئین‌هایی با اندازه‌های مشابه یافت می‌شود (شکل ۸ الف و ب). لذا می‌توان نتیجه گرفت دو مدل ترسیم‌شده توسط RAPTORX و I-TASSER مدل‌های قابل اعتمادی بوده و ساختارهای ترسیم شده به ساختارهای تجربی نزدیک است. از سویی دیگر در این دو مدل، باقیمانده‌های اسیدهای آمینه نیز بیشتر از سطح انرژی منفی برخوردار هستند (شکل‌های ۹ الف و ب).



شکل ۷ درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده مربوط به پروتئازهای مختلف جنس *باسیلوس* و سایر موجودات با استفاده از نرم‌افزار MEGA5.2. نام اختصاصی ژن‌ها و پروتئین‌های موجود در این درخت فیلوژنتیکی در جدول ۳ آمده است. پروتئین کدشده به‌وسیله ژن *aprX* داخل چارچوب مشخص‌شده است.



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



شکل ۹ نمودار انرژی استخراج‌شده از تارنمای Prosa web مربوط به پروتئین Q65IP4 مدل‌سازی شده به‌وسیله RAPTROX و I-TASSER

۸- بحث

پژوهش حاضر با هدف همسانه سازی، تعیین توالی، بیان و بررسی بیوانفورماتیکی ژن سرین پروتئاز *aprX* استخراج‌شده از *Bacillus licheniformis* انجام گرفت. به‌منظور بهبود عملکرد آنزیم‌ها در صنعت، شناخت توالی و خصوصیات مربوط به آنزیم‌های میکروبی جدید با استفاده از همسانه سازی و فناوری DNA نوترکیب لازم می‌باشد. تاکنون پژوهشی به‌منظور توالی یابی، تعیین خصوصیات و بیان ژن سرین پروتئاز انجام نشده است. در این پژوهش برای نخستین بار پس از همسانه‌سازی ژن

aprX در پلاسمید pET28a؛ بیان در باکتری BL21(DE3) انجام گرفت. ازآنجایی که ژن همسانه‌سازی شده در ناحیه MCS قرار می‌گیرد؛ تحت کنترل راه‌انداز T7 بوده و انتظار می‌رفت که پروتئین موردنظر به‌خوبی بیان شود. پروتئین Q65IP4 همراه با شریک الحاقی Histag با وزن ۵۱ کیلودالتونی تولید شد. گرچه وزن مولکولی آنزیم تولیدی در محدوده وزن مولکولی اغلب سرین پروتئازها قرار ندارد، اما نزدیک به وزن مولکولی گزارش‌شده 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؛ ازاین 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 خالص سازی 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 قابل‌توجه فعالیت پروتئازی آنزیم نوترکیب شد و از آن جایی که پروتئین مذکور ازجمله پروتئین‌های شبه‌سوبتیلیزین می‌باشد، این نتیجه مورد انتظار بود [۵۳]. در مطالعه‌هایی که روی پروتئازهای *B. licheniformis* CH 3-17 با خاصیت فیبرینولیتیکی انجام‌شده است، یون کلسیم همانند آنچه در این آزمایش مشاهده شده است، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های موردمطالعه شده است [۵٤]. هم‌چنین طی مطالعه انجام‌شده به‌وسیله اگیوتس و همکاران مشخص شد که پروتئاز کدشده توسط ژن *Epr* متعلق به باکتری *B. licheniformis* برای فعالیت نیازمند یون کلسیم است [۱۹]. گزارش های دیگری نیز مبنی بر تأثیر کلسیم بر فعالیت و پایداری پروتئازها منتشرشده است، برای مثال می‌توان به *Bacillus mojavensis* strain A21 و آلکالین پروتئاز تولیدشده به‌وسیله باکتری اندوفایت *B. halotolerans* اشاره کرد [۵۵، ٥٦].

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*، پروتئاز *B. alveayuensis* CAS 5 و نیز آلکالین سرین پروتئاز موردمطالعه آریایی و همکاران مطابقت دارد [۸، ۵۷، ۵۸]. بهینه فعالیت آنزیم نوترکیب His-Q65IP4 در pH: ۸ مشاهده شد که با pH بهینه گزارش‌شده در مورد آلکالین سرین پروتئاز *B. velezensis* SW5 و *B. cereus* VITSN04 تطابق دارد [٦۰،۵۹]. در مطالعه دیگری نیز که توسط فرهادیان و همکاران بر روی پروتئاز *B. subtilis* DR8806 انجام‌شده است pH: ۸ به‌عنوان pH بهینه گزارش‌شده است [٦١].

پروتئین Q65IP4 که در این پژوهش مطالعه شده است، نوعی سرین آلکالین پروتئاز و از اعضای خانواده سوبتیلیزین‌ها می‌باشد. سرین آلکالین پروتئازها بزرگ‌ترین زیرگروه از سرین پروتئازها هستند که در pHهای قلیایی بالا فعال می‌باشند [٦٢، ٦٣]. 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 به وسیله چندین جنس از باکتری‌ها تولید می‌شوند ولی سوبتیلیزین تولیدشده به‌وسیله سویه‌های باسیلوس از بقیه بیشتر شناخته‌شده است [٦٤]. خانواده سوبتیلیزین‌ها شامل سوبتیلازها و گروه کوچکی از پروتئازهای داخل سلولی هستند که ممکن است نقش

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 آسپارتات و هیستیدین همراه با سرین، و تشکیل سه گانه کاتالیستی، 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 سویی، آنزیم سرین پروتئاز مطالعه شده علاوه بر این‌که در دسته آنزیم‌های پایدار قرار می‌گیرد؛ به شکل محلول در میزبان بیان خواهد شد و به صورت 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.

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, Kown DY. Cloning of fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* isolated from Cheonggukjang and its expression in protease-deficient *Bacillus subtilis* strains. J Microbiol Biotechn. 2007; 17: 1018-1023.

17- Kim GM, Lee AR, Lee KW, Park JY, Chun J, Cha J, et al. Characterization of a 27 kDa

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 Genefor 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 recombinanat 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 Ca^{2+}-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'. 3nd 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.

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 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 A 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 alveayuensis* 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 adehairing 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.

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 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.

Biotechnology-Tarbiat Modares University

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 exisiting 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 dimentional 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 soluable in *Escherichia coli*. These advantages make the enzyme is a suitabale candidate to be considered for use in industry.

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