

ساخت پروتئین نو ترکیب آلکالین سرین پروتئاز مقاوم به شرایط قلیایی: همسانه سازی و بیان ژن باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس در پلاسمید pMAL-c2X و بهینه سازی فعالیت آنزیمی آن

شاهین خوبانی^۱، رضا نقی‌ها^{۲*}، احمد عربان^۳، الهام معظمیان^۴

۱- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی و علوم نوین، دانشگاه آزاد واحد شیراز، شیراز، ایران

۲- دانشیار میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استاد پاتولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۴- استادیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده کشاورزی و علوم نوین، دانشگاه آزاد واحد شیراز، شیراز، ایران تاریخ

دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۲

چکیده مبسوط

زمینه و هدف مطالعه: پروتئازهای قلیایی میکروبی در سال‌های اخیر به یک محصول مهم صنعتی و تجاری بیوتکنولوژی تبدیل شده است. پروتئاز قلیایی به دلیل توانایی زیاد در هیدرولیز و تحمل شرایط قلیایی، به‌طور گسترده در صنایع غذایی، شوینده و داروسازی استفاده می‌شود. باسیلوس لیکنی فورمیس به دلیل تولید آنزیم‌های پروتئاز قلیایی مقاوم به حرارت نظر پژوهش‌گران زیادی را به خود جلب کرده است. از این رو، هدف از این پژوهش، کلونینگ و بیان ژن آلکالین سرین پروتئاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس، ساخت پروتئین نو ترکیب آلکالین سرین پروتئاز و بررسی اثر دما و pH بر فعالیت آنزیمی آن است. **مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، ژن آلکالین سرین پروتئاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تکثیر و به کمک پلاسمید pMAL-c2X درون اشریشیا کلی سویه DH5 (BL21) ترانسفورمه شد. انتقال ژن با استفاده از روش PCR بررسی و صحت ردیف نوکلئوتیدی محصولات کلون شده با تعیین توالی نوکلئوتیدی تایید گردید. سپس توان آنزیمی آلکالین سرین پروتئاز نو ترکیب در pH و دماهای مختلف با روش تغییر یافته Folin و Ciocalteu بررسی گردید. **نتایج:** یافته‌های این پژوهش نشان داد که کلونینگ ژن آلکالین سرین پروتئاز در باکتری اشریشیا کلی به شکل صحیح انجام و افزایش ۳۴۳ درصدی در بیان پروتئین نو ترکیب آلکالین سرین پروتئاز مشاهده گردید. از سوی دیگر، در واکنش زنجیره‌ای پلی مرز، کلونینگ ژن ۱۱۲۵ جفت بازی آلکالین سرین پروتئاز تأیید که پایداری و فعالیت بالایی در دمای بالا و pH قلیایی نشان داده شد. **نتیجه گیری:** لذا، تولید آنزیم پروتئاز با پایداری نسبتاً بالا در شرایط مختلف نشان دهنده ارزش کاربردی مهم این تکنیک برای تولید آنزیم در صنعت و تولید در مقیاس بزرگ است.

کلمات کلیدی: باسیلوس لیکنی فورمیس، پلاسمید pMAL-c2X، سرین پروتئاز قلیایی، کلونینگ

* نویسنده مسئول: رضا نقی‌ها

آدرس: دانشیار میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

پست الکترونیک: naghiha@gmail.com

مقدمه

آنزیم‌ها ترکیبات پروتئینی هستند که بدون مصرف شدن، انجام واکنش‌های شیمیایی را تسهیل کرده و سرعت آن‌ها را افزایش می‌دهند. تا به امروز، بیش از ۳۰۰۰ نوع آنزیم گوناگون از منابع میکروبی، گیاهی و غیره مورد بررسی قرار گرفته‌اند که در این میان، پروتئازها به عنوان پرمصرف‌ترین آنزیم‌های صنعتی برای هضم انواع پروتئین‌ها کاربرد دارند (Yimer and Tilahun, 2018). امروزه، منابع میکروبی قلمرو وسیعی در تولید آنزیم‌های متنوع محسوب می‌شوند و پروتئازهای باکتریایی، قارچی و ویروسی به دلیل اهمیت و کاربردشان در صنایع و زیست‌فناوری، به طور گسترده مطالعه شده‌اند. از میان آنزیم‌های به‌دست‌آمده از میکروب‌ها، سرین پروتئازهای قلیایی به خاطر مقاومت، پایداری و فعالیت در شرایط دشوار مانند pH قلیایی و حضور عوامل سورفکتانت یا اکسیدکننده‌ها، توجه پژوهشگران زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Pan et al., 2015). این آنزیم‌ها به طور اختصاصی به فرمول شونده‌ها افزوده می‌شوند و بیشترین کاربرد تجاری را دارا هستند.

مهم‌ترین سرین پروتئازهایی که هم‌اکنون استفاده می‌شوند، سابتیلیزین کارلزیبرگ جداشده از باسیلوس لیکنی‌فورمیس، سابتیلیزین بی‌پی‌ان از باسیلوس آمیلو لیکنی‌فورمیس و سابتیلیزینای و سابتیلیزینانایتی از باسیلوس سوبتیلیس هستند (Harish and Uppuluri, 2018). از میان باکتری‌های قلیا دوست استفاده شده در صنایع گوناگون، گونه‌های باسیلوس، به‌خصوص باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی‌فورمیس (*Bacillus licheniformis*) از منابع اصلی تولیدکننده‌های پروتئازهای قلیایی هستند (Sharma et al., 2017). پروتئازهای گونه‌های باسیلوس در شرایط

آزمایشگاهی با وزن مولکولی ۲۷-۷۱ کیلودالتون، pH بهینه ۶-۱۰، دمای ۳۷-۶۰ درجه سانتی‌گراد، و پایداری بالا در طیف وسیعی از دما و pH مشخص می‌شوند (Karray et al., 2021). باسیلوس لیکنی‌فورمیس عموماً وضعیت ایمن (GRAS) دارد که آن را به عنوان سویه میزبان در صنایع داروسازی و غذایی توسعه می‌دهد (Li et al., 2019; Zhou et al., 2020). پروتئازهای قلیایی تولید شده توسط این باکتری برای تولید پروتئین‌های با ویژگی‌های عملکردی بالا به کار می‌روند. یکی از مهم‌ترین گروه‌های آنزیم‌های هیدرولیتیک، پروتئازهای قلیایی میکروبی مانند آلکالین سرین پروتئازها هستند.

از آنجایی که پروتئاز قلیایی دارای ویژگی‌های عالی مانند قدرت کاتالیزوری بالا، اختصاصیت، حلالیت در آب، غیر سمی بودن، خوراکی بودن، سازگاری با محیط زیست و غیره است، این آنزیم‌ها کاربردهای زیادی در زندگی انسان دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده در صنعت، ساخت پپتیدهای گوناگون، دترجنت‌ها و شوینده‌ها، صنایع غذایی، مدیریت پسماند، نساجی و چرم‌سازی اشاره کرد (Zhou et al., 2020). آلکالین سرین پروتئاز باکتری باسیلوس لیکنی‌فورمیس از آنزیم‌هایی است که با توجه به ویژگی‌هایی که دارد زیاد مورد توجه پژوهشگران می‌باشد (Wong et al., 2000).

امروزه از روش کلونینگ برای تولید محصولات میکروبی استفاده می‌شود. در این فرآیند، ژن یا بخشی از ژنوم یک موجود جداسازی شده و با کمک وکتور به سلول دیگری (مانند باکتری) منتقل می‌گردد تا ژن مورد نظر به طور فراوان تکثیر شود. برای باکتری‌هایی با رشد کند یا آنزیم‌های غیر قابل استخراج، ژن‌های مربوطه به باکتری‌هایی مانند *شریشیا کلی ترانسفورم* می‌شوند. پس از بیان ژن، محصول در محیط کشت باکتریایی تولید



شده و با مراحل خالص سازی قابل استفاده است (Brahmachari, 2023).

پژوهش ها نشان داده اند که آنزیم های به دست آمده از میکروارگانیسم ها به دلیل مقاومت بالا به شرایط گوناگون مانند دماهای بالا و تغییرات pH، از مقبولیت زیاد بیشتری نسبت به بقیه آنزیم ها برخوردارند؛ بنابراین آنزیم های باکتریایی، به دلیل سادگی مراحل ساخت متناسب با ویژگی های مورد نظر بیشتر در صنعت مورد استقبال قرار می گیرد. آنزیم پروتئاز هم به دلیل استفاده بیشتر در انواع فرآورده های غذایی و غیر غذایی بیشتر به روش باکتریایی تولید می شوند و همچنین تولید و خالص سازی این آنزیم ها از نظر اقتصادی هم قابل توجه می باشد (Namnieri et al., 2018). تلاش های زیادی در توسعه صنعتی برای بهبود تولید پروتئین های هدف و جلوگیری از سنتز مواد سمی شده است. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی امکان کلون سازی ژن کد کننده آنزیم آلکالین سرین پروتئاز باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس در میزبان اشریشیا کلی و بیان و خالص سازی این آنزیم و بررسی فعالیت آنزیمی آن در شرایط مختلف دمایی و pH می باشد.

مواد و روش ها

تهیه سویه باکتری

در این پژوهش سویه استاندارد باسیلوس لیکنی فورمیس (ATCC 21424)، باکتری اشریشیا کلی سویه

BL21 (DH5) و باکتری اشریشیا کلی سویه TOP10 F حاوی پلاسمید pMAL-c2x از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران خریداری و بر پایه دستورالعمل مرکز، به محیط کشت LB تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند. محیط های کشت برای انجام آزمایش های پسین، در دمای ۴ درجه سانتی گراد یخچال نگهداری شدند.

طراحی پرایمر و تکثیر ژن آلکالین سرین پروتئاز با روش PCR

نخست، یافته های مربوط به ردیف ژن سرین آلکالین پروتئاز (*sap*) باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس در بانک ژن (شماره دسترسی بانک ژن: MG753560.1) به دست آمد و سپس با استفاده از نرم افزار PRIMER3 پرایمرهای مورد نظر طراحی گردید. به پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱)، به ترتیب ژن های مربوط به ناحیه برشی توسط آنزیم *Bam*HI (فرمنتاز، آمریکا) در توالی جلویی (Forward) و ناحیه برش *Hind*III (فرمنتاز، آمریکا) در توالی عقبی (Reverse) افزوده شدند. به منظور بررسی عدم وجود نواحی برش در توالی های طراحی شده برای کلون سازی، از نرم افزار NEB cutter در بخش CDS استفاده شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها و اندازه ی قطعه ی مورد مطالعه

سایز ژن (bp)	توالی پرایمرها (۵' - ۳')	ژن - پرایمر
۵۹۸	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC	V-F
	CGCCAGGGTTCCTCCAGTCACGAC	V-R
۱۱۲۵	ACTGGATCCAAGAGTCTTTGGCTTGGGATGCT	<i>Bam</i> HI
	ACTAAGCTTTTGAGCGGCAGCTTCGACATT	<i>Hind</i> III



استخراج پلاسمید pMAL-c2x

در این مطالعه برای کلونینگ و انتقال ژن به میزبان باکتریایی، از پلاسمید pMAL-c2x استفاده شد. پلاسمید pMAL-c2x با استفاده از کیت GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit (شرکت سینا ژن-ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. برای این منظور ابتدا باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP10 F' حاوی پلاسمید pMAL-c2x به مدت ۱۸ ساعت در ۵ میلی لیتر محیط LB به همراه ۵ میکرولیتر آنتی بیوتیک تتراسایکلین و ۵ میکرولیتر آمپی سیلین کشت داده شد. ویال ۵ میلی لیتری حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. به رسوب سلولی ۲۵۰ میکرولیتر بافر RB افزوده و همگن سازی انجام شد. به مخلوط تهیه شده در گام پیشین، ۲۵۰ میکرولیتر بافر LB افزوده و ۴ تا ۵ بار سروته گردید تا محلول شفاف و یک نواختی ایجاد گردید. سپس به آن ۳۵۰ میکرولیتر بافر NB افزوده شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جدا و به ستون های سیلیکا انتقال، ۲ دقیقه سانتریفیوژ و مایع زیرین دور ریخته شد. به ستون ها ۷۰۰ میکرولیتر بافر WB افزوده و ۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع زیرین دور ریخته شد. ستون های جداسازی به میکروتیوب جدید منتقل و ۵۰ میکرولیتر بافر EB به ستون افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری، ۱ دقیقه rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع زیرین حاوی پلاسمید جهت مراحل بعدی در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری

برای تکثیر از ژن *sap* موجود در باکتری *باسیلوس لیکنی* فورمیس ATCC 21424 استفاده شد. به منظور استخراج DNA، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ باکتری کشت داده شده، با ۹۰۰ میکرولیتر بافر فسفات با اسیدیته ۷/۵ استریل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در یک بشر حاوی آب در حال جوش، جوشانده شد. سپس نمونه با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی حاوی DNA جهت انجام PCR استفاده شد. غلظت نمونه DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجش شد. آزمون PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (شامل؛ ۱۰ میکرولیتر MasterMix RED 2X (آمپلیکون، دانمارک)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی ژن، ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰۰ نانوگرم، ۶ میکرولیتر آب مقطر استریل) انجام شد. مخلوط واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bioered) بدین صورت انجام شد: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل که هر کدام شامل: واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. محصول نهایی PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد به همراه رنگ سیف (6X) بررسی گردید. پس از الکتروفورز، برای مشاهده باندهای تفکیک شده، ژل در دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده شد، اندازه ی باندهای DNA تکثیر یافته با توجه به مارکر ژنی استاندارد (bp) ۱۰۰ برآورد گردید (Garibyan and Avishia 2013).



قطعه‌ی *sap* جدا و با استفاده از کیت استخراج DNA، خالص سازی شدند.

واکنش الحاق ژن *sap* در وکتور پلاسمیدی

به منظور الحاق ژن *sap* در وکتور پلاسمیدی، فرآیند اتصال (Ligation) با استفاده از آنزیم لیگاز T4 انجام گرفت. مخلوط واکنش الحاق ژن حاوی ۳ میکرولیتر پلاسمید برش خورده، ۱ میکرولیتر ژن *sap* برش خورده، ۱/۵ میکرولیتر بافر لیگاز، ۱ میکرولیتر آنزیم لیگاز T4، ۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس برای غیرفعال کردن آنزیم، مخلوط واکنش الحاق ژن، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و مخلوط تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Toth et al., 2014).

پذیرا کردن باکتری /شریشیا کلی سویه (DH5 BL21) با روش کلرید کلسیم سرد

به منظور انتقال پلاسمید به میزبان مناسب، نخست از باکتری /شریشیا کلی سویه (BL21) DH5 سلول‌های مستعد (Competent cell) تهیه گردید. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری /شریشیا کلی سویه DH5 (BL21) بدون پلاسمید، در ۵ میلی لیتر محیط LB بدون آنتی بیوتیک کشت داده شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۲۰ در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر کشت ۱۸ ساعته باکتری به ۱۲۰۰ میکرولیتر محیط LB

شدند. جداسازی پلاسمید استخراج شده در ژل آگارز ۱ درصد و PCR بررسی و تایید شد. سپس از پرایمرهای عمومی تعیین توالی وکتور پلاسمیدی (جدول ۱) که قطعه‌ای به طول ۵۹۸ bp در دو طرف نواحی برش *BamHI* و *HindIII* را تکثیر می‌نماید، استفاده و برای تایید ردیف قطعه‌ی تکثیر یافته، خوانش شد (England, 1991).

هضم آنزیمی پلاسمید pMAL-c2x

هضم آنزیمی محصول PCR و پلاسمید با استفاده از آنزیم‌های برشی *BamHI* و *HindIII* انجام شد. بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، مخلوط‌های واکنش هضم با افزودن ۶ میکرولیتر از محصول PCR یا پلاسمید خالص (محصول گام پیشین)، ۱/۵ میکرولیتر بافر آنزیم (10X)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII*، ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر آماده و دو ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شد. برای غیرفعال نمودن آنزیم‌ها، محلول ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار گرفت و در آخر، کارایی واکنش‌ها با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید (England, 1991). شایان ذکر است که، آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII* در یک بافر برشی مشترک و به صورت همزمان برای هضم دو گانه (double digestion) استفاده شده‌اند. پس از هضم آنزیمی، محصولات برش خورده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و باندهای مربوط به وکتور خطی و



سوسپانسیون باکتری بر روی محیط TSA حاوی آنتی بیوتیک ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (England, 1991).

غربالگری پرگنه‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

پس انتقال DNA نوترکیب به باکتری/شریشیا کلی سوبه BL21، پرگنه‌های رشد یافته با آزمون PCR (پرایمرهای اختصاصی ژن *sap*) غربال شدند. با توجه به اندازه ژن *sap* تکثیرشده (۱۱۲۵ bp) و کلون‌هایی که محصولات PCR با اندازه مذکور را تکثیر نمودند و پس از مشاهده بر روی ژل آگارز به عنوان کلون‌های مثبت احتمالی در نظر گرفته شدند (Garibyan and Avishia, 2013).

استخراج و غربالگری پلاسمیدهای مثبت

برای تأیید نهایی انتقال ژن هدف از طریق پلاسمید به میزبان باکتریایی، یک پرگنه مثبت باکتری از کلون‌های تأیید شده با PCR در محیط کشت LB حاوی آمپی-سیلین کشت و پلاسمید با استفاده از کیت GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit استخراج شد. پلاسمیدهای استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد و آزمون PCR تأیید گردید. در آخر، ۵۰ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب برای خوانش و تعیین توالی (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به صورت دو طرفه) ارسال گردید. یافته‌ها با برنامه هم ترازی BioEdit، هم تراز و با نرم افزار بیوانفورماتیک nBLAST شباهت توالی با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن NCBI مقایسه گردید. توالی به دست آمده با نرم افزار Expasy

تازه افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با شیک کردن با دور متوسط قرار داده شد تا کدوت آن به ۰/۶ برسد. سپس نمونه ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرارداده شد و ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور و رسوب باقی مانده به آرامی در ۳۰۰ میکرولیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار استریل سرد حل و نمونه ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. نمونه ۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و رسوب باقی مانده در ۲۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم ۰/۱ مولار سرد به آرامی مخلوط و ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. نمونه ۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع رویی حذف و در آخر، به رسوب حاصل ۱۰۰ میکرولیتر کلرید کلسیم سرد ۰/۱ مولار افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد (England, 1991).

ترانسفورماسیون

۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال و ۱۰۰ میکرولیتر باکتری پذیرا شده مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه و ۴۵ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محیط SOC 20X به ۹۵۰ میکرولیتر محیط LB بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط باکتری و پلاسمید افزوده و ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. نمونه با دور ۵۰۰۰ rpm برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و به رسوب ۲۰۰ میکرولیتر محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه گردید. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از



translate tool ترجمه و به منظور تأیید صحت کلونی، با نرم افزار Clustal-W با توالی که بیشترین شباهت را در بانک ژن نشان داد، ارزیابی هم پوشانی در سطح پروتئین انجام گرفت (Garibyan and Avishia, 2013).

استخراج و خالص سازی آنزیم پروتئاز قلیایی

یک حلقه پر از پرگنه های باکتری کلون شده، به ۱۰۰ میلی لیتر براث LB در شرایط آسپتیک منتقل شد و ۱۰ میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته به ۲۵۰ میلی لیتر محیط حاوی ۶ درصد گلوکز، ۲ درصد کنجاله سویا، ۰/۰۴ درصد کلرید کلسیم و ۰/۰۲ درصد کلرید منیزیم منتقل و پس از گرم خانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، محلول مورد نظر ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده با محلول استریل ۲ درصد کلرید پتاسیم و سپس با آب مقطر دو بار استریل شسته شد. سپس رسوب سلولی در محلول نمکی ۰/۸۵ درصد استریل تعلیق شد (Chatterjee, 2015).

سنجش فعالیت آنزیمی پروتئاز قلیایی

محلول به دست آمده از واکنش قبل (آنزیم خالص شده) برای سنجش میزان فعالیت پروتئازی با پیروی از روش تغییر یافته Folin و Ciocalteu مورد بررسی قرار گرفت. ۱۰۰ میکرو لیتر محلول حاوی عصاره آنزیمی به ۱۰۰ میکرو لیتر محلول سوبسترا ۱ درصد کازئین (شامل ۱ گرم کازئین و ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات با اسیدیته ۹) اضافه شد.

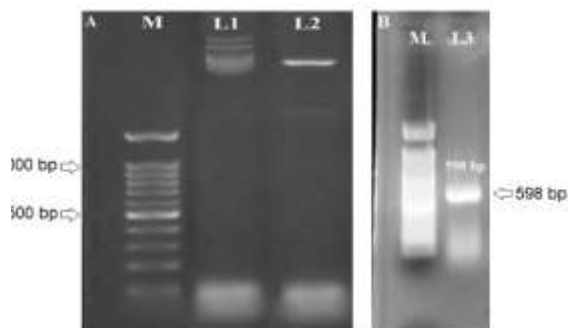
مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس به آن ۲۰۰ میکرو لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه شد تا واکنش آنزیمی متوقف شود. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی حذف و به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرو لیتر معرف Folin-Ciocalteu اضافه گردید و جذب نوری در ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم با استفاده از محلول های تیروزین به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی (U/ml) پروتئاز قلیایی به عنوان مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول تیروزین در دقیقه را تحت شرایط سنجش آزاد می کند، تعریف شد (Chatterjee, 2015).

اثر pH و دما بر فعالیت آنزیم پروتئاز

جهت بررسی تأثیر pH و دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم نو ترکیب، واکنش مرحله قبل در بافری با اسیدیته ۴ تا ۱۰ و دمای ۳۰-۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه بررسی شد. پس از گذشت این مدت زمان، برای توقف واکنش ۲۰۰ میکرو لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع رویی حذف و به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرو لیتر معرف Folin-Ciocalteu اضافه گردید و جذب نوری در ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم با استفاده از محلول های تیروزین به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیمی (U/ml) پروتئاز قلیایی به عنوان مقدار آنزیمی که



به حالت هضم نشده (برش نخورده و چند باندی، شکل ۲، چاهک L1) بود (شکل ۲).



شکل ۲- A: نتایج الکتروفورز پلاسمید هضم شده و هضم نشده، چاهک M: مارکر ژنی ۱۰۰ bp، چاهک L1: پلاسمید هضم نشده، چاهک L2: پلاسمید هضم شده، چاهک L3: باند ۵۹۸ bp و کتور خالص شده.

ترانسفورماسیون پلاسمیدهای نو ترکیب در باکتری /شریشیا کلی سویه (DH5 BL21)

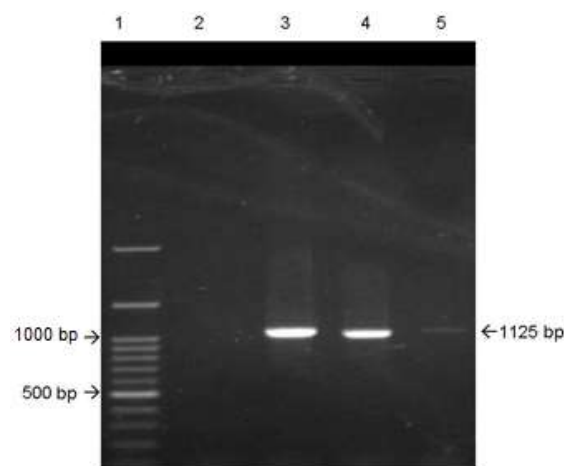
جهت بررسی انتقال پلاسمید حاوی ژن موردنظر به میزبان باکتریایی، بعد از الحاق پلاسمید در باکتری /شریشیا کلی سویه (DH5 BL21)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی محیط TSA کشت داده شد. از آنجایی که این محیط حاوی آنتی بیوتیک آمپی-سیلین بود، لذا تنها باکتری هایی در این محیط رشد می-کردند که حامل پلاسمید نو ترکیب هستند. بعد از کشت باکتری های ترانسفورمه شده، پرگنه های حامل پلاسمید نو ترکیب پس از یک شبانه روز انکوباسیون بر روی محیط TSA ظاهر شدند (شکل ۳).

۱ میکرو مول تیروزین در دقیقه را تحت شرایط سنجش آزاد می کند، تعریف شد (Esakkiraj et al., 2016).

نتایج

تکثیر ژن سرین آلکالین پروتئاز (sap)

تکثیر ژن سرین آلکالین پروتئاز (sap) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی دارای نواحی برش آنزیم های BamHI و HindIII در دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد منجر به تکثیر قطعه ای به طول ۱۱۲۵ bp شد (شکل ۱).

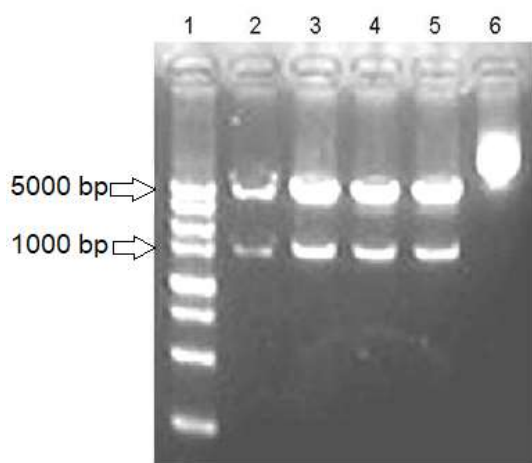


شکل ۱- نتایج الکتروفورز ژن sap چاهک ۱: مارکر ژنی ۱۰۰ bp، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک های ۳، ۴ و ۵: محصول PCR ژن sap با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

استخراج و هضم آنزیمی پلاسمید pMAL-c2x

نتایج این آزمون حضور پلاسمید خالص pMAL-c2x با وزن مولکولی تقریبی ۶/۷ kb را نشان داد. بررسی الکتروفورز محصول هضم آنزیمی این پلاسمید با آنزیم های BamHI و HindIII، نشان دهنده تشکیل یک باند (در حالت برش خورده، شکل ۲، چاهک L2) نسبت

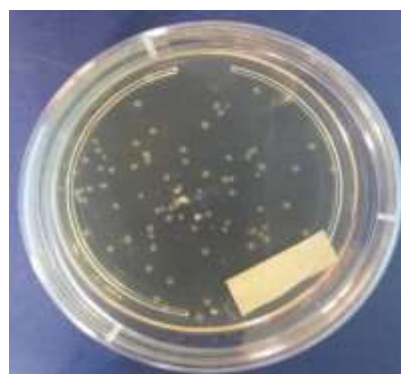
پس از برش آنزیمی توسط آنزیم‌های BamHI و HindIII، یک فرم خطی از پلاسمید و یک باند به طول تقریبی ۱۱۰۰ جفت بازی را بر روی ژل آگارز مشاهده شد که نشان‌دهنده پلاسمید های حاوی ژن sap در باکتری میزبان بود (شکل ۵). همچنین نتایج تعیین توالی پلاسمید نو ترکیب، پس از ارزیابی توالی‌های حاصل از خوانش دوطرفه، توالی به طول ۹۸۰ bp استخراج و میزان قرابت آن با توالی موجود شباهت ۱۰۰ درصدی توالی ژن sap انسانی با توالی موجود در بانک ژن با عدد دسترسی MG753560.1 بود.



شکل ۵- الکتروفورز وکتور برش خورده با آنزیم‌های محدودکننده. چاهک ۱: مارکر ژنی ۱۰۰ bp تا ۵kb، چاهک‌های ۲-۵: برش وکتور با استفاده از آنزیم‌های BamHI و HindIII که منجر به ایجاد باند با وزن مولکولی تقریبی ۱۰۰۰ bp اشد، چاهک ۶: وکتور برش نخورده.

بررسی فعالیت آنزیمی پروتئاز قلیایی

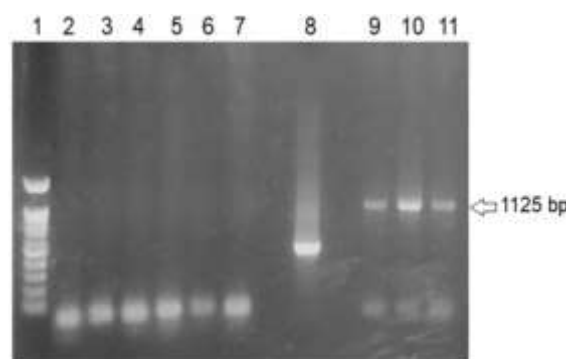
مقایسه فعالیت آنزیمی آلکالین سرین پروتئاز (U/ml) استخراج شده از سه نمونه باکتری باسیلوس



شکل ۳- رشد کلون‌های مثبت/شریشیاکلی حاوی پلاسمید نو ترکیب بر روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین.

غربالگری کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب

نتایج الکتروفورز بر روی ژل آگارز نشان دهنده تکثیر باندی با اندازه تقریبی ۱۱۰۰ جفت باز بود که با توجه به اندازه قطعه مورد نظر (۱۱۲۵ bp)، بیانگر الحاق ژن sap در پلاسمید pMAL-c2X بود (شکل ۴).

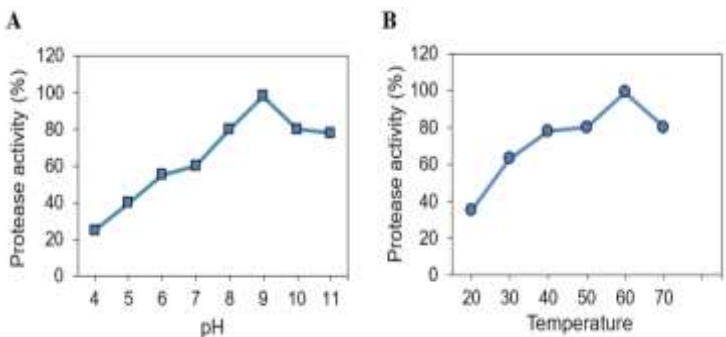


شکل ۴- غربالگری کلون‌های حاوی پلاسمید با استفاده از روش PCR. چاهک ۱: مارکر ژنی ۱۰۰ bp، چاهک‌های ۲-۷: کلون‌های منفی از نظر حضور ژن sap، چاهک ۸: کلون حامل وکتور فاقد ژن الحاق شده، چاهک‌های ۹-۱۱: کلون‌های حامل وکتور الحاق شده با ژن sap.

تائید نهایی کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب

در pH برابر با ۹ با بیش از ۹۸ درصد از خود نشان داد. همچنین در بررسی اثر دما، این آنزیم در دماهای ۷۰-۴۰ درجه سانتی گراد بیش از ۷۰ درصد فعالیت داشت و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه دارای فعالیتی بیش از ۹۹ درصد بود (شکل ۷). بنابراین نتایج این مطالعه به خوبی نشان می دهد که آنزیم نو ترکیب با توان فعالیت در رنج های دمایی بالا و pH قلیایی قابلیت استفاده در صنایع مختلف را دارا می باشد.

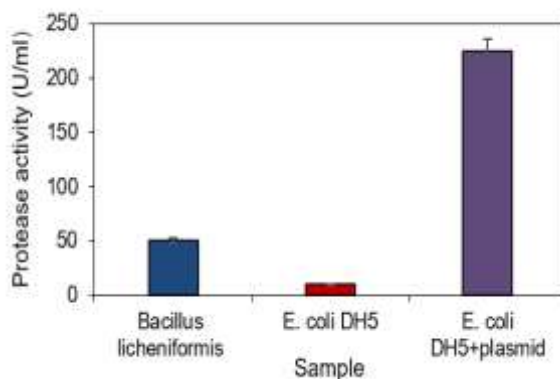
لیکنی فورمیس، اشریشیا کلی سویه DH5 (BL21) و اشریشیا کلی ترانسفورمه شده با پلاسمید pMAL-c2X حاوی ژن آلکالین سرین پروتئاز نشان داد که باکتری اشریشیا کلی ترانسفورمه شده با پلاسمید ژن مورد نظر، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی را دارا می باشد و حدود ۲۲۴/۴۵۲ U/ml است، درحالی که میزان فعالیت آنزیم استخراج شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس که حاوی این ژن بود حدود ۵۰/۶۴۲ U/ml بوده است (شکل ۶). این نتایج به خوبی نشان می دهد که تکنیک کلونینگ ژن آلکالین سرین پروتئاز در باکتری اشریشیا کلی منجر به تولید آنزیم پروتئازی با فعالیت بیشتر نسبت به سویه طبیعی (باسیلوس لیکنی فورمیس) شده است.



شکل ۷- تأثیر pH و دماهای مختلف بر فعالیت آنزیم پروتئاز. نمودار A: فعالیت آنزیم در دماهای مختلف و نمودار B: فعالیت آنزیم در pH های مختلف.

بحث

پروتئازها یکی از مهم ترین رده از آنزیم های هیدرولیتیک هستند که نزدیک ۶۰ درصد از آنزیم های صنعتی را به خود اختصاص داده است (Kieliszek et al., 2019; Sharma et al., 2021). طیف گسترده ای از موجودات زنده پروتئازهای قلیایی تولید می کنند، با این حال پروتئازهای میکروبی در بیوتکنولوژی مدرن از اهمیت فوق العاده ای برخوردارند و اکثر آنزیم های صنعتی از باکتری ها و قارچ ها مشتق شده اند (Singh et al., 2019). پروتئازهای میکروبی به دلیل رشد سریع



شکل ۶- مقایسه فعالیت آنزیمی آلکالین سرین پروتئاز (U/ml) استخراج شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس، اشریشیا کلی سویه BL21 (DH5) و اشریشیا کلی ترانسفورمه شده با پلاسمید حاوی ژن آلکالین سرین پروتئاز.

تأثیر دما و pH بر فعالیت آنزیم پروتئاز

نتایج این بررسی نشان داد که این آنزیم بیش از ۷۰٪ فعالیت را در pH برابر ۸-۱۱ دارد و بیشترین فعالیت را

باکتری، دست کاری ژنتیکی آسان و تنوع بیوشیمیایی گسترده آنزیمی بر پروتئازهای حیوانی و گیاهی ترجیح داده می‌شوند (Mahmoud et al., 2021). باسیلوس لیکنی فورمیس در مقایسه با تمام باکتری های تولید کننده پروتئاز، به دلیل مزایایی متعدد از جمله؛ غیر بیماری‌زا بودن و دست کاری ژنتیکی آسان، به عنوان یک بیوراکتور مناسب با توانایی تولید ۲۵-۲۰ گرم در لیتر پروتئین برای تولید آنزیم های صنعتی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Reddy et al., 2022). از طرفی ترشحاتی کردن آنزیم پروتئاز از نظر صنعتی صرفه اقتصادی دارد زیرا انتقال پروتئین‌ها به محیط کشت در اغلب موارد تاخوردگی و پایداری آن را تسهیل می‌کند و باعث تسهیل و ارزان‌تر شدن فرآیندهای پایین دست در بیوتکنولوژی می‌شود (Singh Zhou et al., 2021; et al., 2019).

در مطالعه حاضر، ژن آلکالین سرین پروتئاز (*sap*) باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس مورد شناسایی و تخلیص قرار گرفت. اندازه محصول PCR با اندازه مورد انتظار یعنی ۱۱۲۵ جفت باز مطابقت داشت. نتایج حاصل از هضم محصول PCR با آنزیم های محدود کننده صحت تکثیر ژن را تأیید کرد. سپس ژن تکثیر شده تخلیص و در پلاسمید بیانی pMAL-c2X قرار گرفت و در نهایت وکتور نو ترکیب به سویه باکتری /شریشیا کلی DH5 که یک سویه بیانی است منتقل گردید و بعد از رشد باکتری حامل پلاسمید نو ترکیب، فعالیت آنزیمی ژن کلون شده نسبت به آنزیم استخراج شده از باکتری

طبیعی و تأثیر دما و pH بر فعالیت این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات زیادی بر روی کلونینگ ژن پروتئاز قلیایی از گونه‌های باسیلوس انجام شده است. Jacob و همکاران در سال ۱۹۸۵ ژن کد کننده سابیلین کارلزبرگ (*subtilisin Carlsberg*) از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس را در وکتور pBR322 که دارای یک قاب خواندن باز (ORF) ۱۱۳۷ جفت بازی است، کلون کردند (Jacobs et al., 1985). همچنین Peng و همکاران در سال ۲۰۰۴، ژن *subtilisin* DFE را از *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 پلاسمید pGEM-T که دارای یک قاب خواندن باز (ORF) ۱۱۴۶ جفت بازی است را کلون کردند (Peng et al., 2004). از آنجا که تولید بالای انواع پروتئازها توسط سویه های مختلف باکتری کلون شده موجب هضم بخش عظیمی از آنزیم های نو ترکیب مورد نظر می‌گردد، در این مطالعه از باکتری /شریشیا کلی سویه DH5 استفاده گردید. این سویه فاقد پروتئازهای Lon و OmpT است و این امر موجب افزایش پایداری پروتئین نو ترکیب می‌شود. از این رو در بسیاری از پژوهش ها، این سویه از اولویت کاربری بالایی برخوردار است (Jia and Jeon, 2016).

پس از انتقال ژن مورد نظر به باکتری /شریشیا کلی سویه DH5 توان تولید آنزیم آلکالین سرین پروتئاز توسط سویه کلون شده و باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که باکتری /شریشیا کلی ترانسفورمه شده با پلاسمید



ژن مورد نظر، دارای توان تولید آنزیمی (U/ml) (۲۲۴/۴۵۲) حدود ۳۴۳ درصد بیشتر در مقایسه با باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* (۵۰/۶۴۲ U/ml) است. این نتایج به خوبی نشان می‌دهد که تکنیک کلونینگ ژن آلکالین سرین پروتئاز در باکتری *شریشیا کالی منجر* به تولید آنزیم پروتئازی با فعالیت بیشتر نسبت به سویه طبیعی (*باسیلوس لیکنی فورمیس*) شده است. در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۳، ژن پروتئاز قلیایی باکتری *Bacillus clausii* به صورت تک کپی در سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* BL10 با استفاده از محیط بهینه برای دستیابی به فعالیت آنزیمی ۱۵۴۳۵/۱ U/mL بیان شد. پس از بیان بیش از حد ژن *aprE* توسط پلاسمید اپیزومی، فعالیت آنزیم تا ۱۵۴ درصد افزایش یافت و به ۳۹۲۳۳/۶ U/mL رسید (Zhang et al., 2023). همچنین در مطالعه ای که توسط Tang و همکاران در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، یک ژن پروتئاز قلیایی باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* در وکتور *باسیلوسی* به نام PHL ترانسفورمه و توسط باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* بیان شد. نتایج این پژوهش نشان داد که کلونینگ ژن مورد نظر سبب افزایش ۶۵ درصدی بیان ژن پروتئازی در باکتری نوترکیب در مقایسه با باکتری طبیعی شده بود (Tang et al., 2004). مقایسه این مطالعات به خوبی نشان می‌دهد که سویه مورد استفاده در این پژوهش پتانسیل بالایی برای توانایی آنزیم های نوترکیب به ویژه پروتئازهای قلیایی جهت استفاده در مصارف صنعتی را دارا می‌باشد. از آنجا که پایداری و فعال بودن آنزیم ها در شرایط دمایی و pH های متفاوت در بیوتکنولوژی سنتزی و

مصارف صنعتی اهمیت زیادی دارد. به منظور بررسی اثر pH و دما بر فعالیت پروتئاز قلیایی نوترکیب، فعالیت این آنزیم در محدوده pH برابر ۱۱-۴ و دمای ۷۰-۲۰ درجه سانتی گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد این آنزیم در طیف وسیع pH از ۸ تا ۱۱ فعال بوده و در pH برابر ۹ فعالیت بهینه دارد. نتایج فوق نشان داد که این پروتئاز قلیایی نوترکیب می‌تواند در شرایط قلیایی زیاد پایدار بوده، و بیش از ۷۰ درصد فعالیت در pH برابر ۱۱-۸ را پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون حفظ کند. پروتئازها با طیف فعالیت گسترده به ویژه در محدوده قلیایی از اهمیت صنعتی بیشتری مانند مواد شوینده برخوردار هستند. این ویژگی برای استفاده از پروتئاز قلیایی به عنوان افزودنی مواد شوینده مهم می‌باشد، زیرا مواد شوینده رخت شویی به طور کلی در محدوده pH برابر ۱۲-۸ فعالیت دارند (Olajuyigbe and Ehiosun, 2013). مشابه با این مطالعه، Fu و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که یک پروتئاز نوترکیب از *Bacillus stearothermophilus* در محدوده وسیعی از pH از ۸ تا ۱۰ فعال بوده و فعالیت بهینه را در pH برابر ۹ نشان می‌دهد (Fu et al., 2003). همچنین Esakkiraj و همکاران در سال ۲۰۱۶، یک ژن پروتئاز *باسیلوس* سرئوس PMW8 جدا شده از نمونه شیر گاو را در *شریشیا کالی DH5a* کلون کردند. این پژوهشگران نشان دادند که آنزیم پروتئاز نوترکیب در طیف وسیعی از pH از ۷ تا ۱۰ فعال است، و فعالیت بهینه را در pH برابر ۹ نشان داده است. همچنین، ۸۰ درصد فعالیت در pH برابر ۱۱-۷ پس از ۲ ساعت انکوباسیون حفظ شده است



نو ترکیب در محدوده دمایی و pH مختلف، نشان از ویژگی قلیایی و گرما دوست بودن این آنزیم دارد که این موضوع در بیوتکنولوژی قابل توجه است و نشان دهنده ارزش کاربردی مهم این تکنیک برای تولید آنزیم در صنعت و تولید در مقیاس بزرگ است.

منابع

1. Al-Dhuayan, I., Kotb, E., Alqosaibi, A. and Mahmoud, A., 2021. Histological studies on a newly isolated *Bacillus subtilis* D10 protease in the debridement of burn wound eschars using a mouse model. *Pharmaceutics*, **13**(7), p.923.
2. Bhatt, H.B. and Singh, S.P., 2020. Cloning, expression, and structural elucidation of a biotechnologically potential alkaline serine protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus lehensis* JO-26. *Frontiers in Microbiology*, **11**, p.941.
3. Brahmachari, G., 2023. Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis, and industrial applications—an overview. In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*, pp.1–10.
4. Chatterjee, S., 2015. Production and estimation of alkaline protease by immobilized *Bacillus licheniformis* isolated from poultry farm soil of 24 Parganas and its reusability. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **6**(1), p.2.
5. Cheng, Q., Xu, F., Hu, N., Liu, X. and Liu, Z., 2015. A novel Ca^{2+} -dependent alkaline serine-protease (Bvsp) from *Bacillus* sp. with high fibrinolytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **117**, pp.69–74.

(Esakkiraj *et al.*, 2016). در بررسی تأثیر دما بر آنزیم نو ترکیب نشان داده شده که، این آنزیم در دماهای ۷۰-۴۰ درجه سانتی گراد بیش از ۷۰ درصد فعالیت دارد و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به عنوان دمای بهینه دارای فعالیتی بیش از ۹۹ درصد است که ماهیت گرما دوست بودن آنزیم را به خوبی نشان می دهد. همسو با این پژوهش، Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۵، نشان دادند یک سرین پروتئاز نو ترکیب جدید (Bvsp) از *Bacillus vallismortis* در pH برابر ۱۰-۶ و دمای ۴۰-۶۰ درجه سانتی گراد پایدار بوده و فعالیت بهینه را در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد نشان می دهد (Cheng *et al.*, 2015). در مطالعه ای که توسط Bhatt و Singh در سال ۲۰۲۰ انجام شد، یک ژن پروتئاز قلیایی (APrBL) از *Bacillus lehensis* JO-26 در اشریشیا کلی BL21 کلون و بیان شد. پروتئاز قلیایی نو ترکیب، در pH برابر ۱۱-۸ و دمای ۷۰-۳۰ درجه سانتی گراد و به طور مطلوب در pH برابر ۱۰ و دمای ۵۰ درجه سانتی گراد فعال بود. آنزیم در برابر حرارت زیاد پایدار بود و ۷۳ درصد فعالیت را در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد تا ۳ ساعت حفظ کرد (Bhatt and Singh, 2020).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کلونینگ ژن آلکالین سرین پروتئاز در باکتری اشریشیا کلی با موفقیت منجر به تولید این پروتئاز قلیایی در حجم بالا شد. همچنین آنزیم تولیدی پایداری و فعالیت بالایی در شرایط مختلف دمایی و pH نشان داد. فعال بودن آنزیم پروتئاز قلیایی



14. Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K. and Kot, A.M., 2021. Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, **26**(7), p.1858.
15. Li, Y., Liu, X., Zhang, L., Ding, Z., Xu, S., Gu, Z. et al., 2019. Transcriptional changes in the xylose operon in *Bacillus licheniformis* and their use in fermentation optimization. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(18), p.4615.
16. Mahmoud, A., Kotb, E., Alqosaibi, A.I., Al-Karmalawy, A.A., Al-Dhuayan, I.S. and Alabkari, H., 2021. In vitro and in silico characterization of alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* D9 recovered from Saudi Arabia. *Heliyon*, **7**(10), e08133.
17. Nannipieri, P., Trasar-Cepeda, C. and Dick, R.P., 2018. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biology and Fertility of Soils*, **54**, pp.11–19.
18. Olajuyigbe, F.M. and Ehiosun, K.I., 2013. Production of thermostable and organic solvent-tolerant alkaline protease from *Bacillus coagulans* PSB-07 under different submerged fermentation conditions. *African Journal of Biotechnology*, **12**(21), pp.3249–3257.
19. Pant, G., Prakash, A., Pavani, J., Bera, S., Deviram, G., Kumar, A. et al., 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, **9**(1), pp.50–55.
20. Peng, Y., Yang, X.J., Xiao, L. and Zhang, Y.Z., 2004. Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus*
6. England, N., 1991. pMAL™ Protein Fusion and Purification System. New England Biolabs.
7. Esakkiraj, P., Meleppat, B., Lakra, A.K., Ayyanna, R. and Arul, V., 2016. Cloning, expression, characterization and application of protease produced by *Bacillus cereus* PMW8. *RSC Advances*, **6**(45), pp.38611–38616.
8. Fu, Z., Ab Hamid, S.B., Razak, C.N.A., Basri, M., Salleh, A.B. and Abd Rahman, R.N.Z., 2003. Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of a heat-stable alkaline protease. *Protein Expression and Purification*, **28**(1), pp.63–68.
9. Garibyan, L. and Avashia, N., 2013. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, **133**(3), p.e6.
10. Harish, B. and Uppuluri, K.B., 2018. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, **107**, pp.1373–1387.
11. Jacobs, M., Eliasson, M., Uhlén, M. and Flock, J.I., 1985. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Research*, **13**(24), pp.8913–8926.
12. Jia, B. and Jeon, C.O., 2016. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology*, **6**(8), p.160196.
13. Karray, A., Alonazi, M., Horchani, H. and Ben Bacha, A., 2021. A novel thermostable and alkaline protease produced from *Bacillus stearothermophilus* isolated from olive oil mill soils suitable for industrial biotechnology. *Molecules*, **26**(4), p.1139.



- the general use of type IIs restriction enzymes for cloning. PLoS ONE, **9**(3), e90896.
27. Wong, T.Y., Preston, L.A. and Schiller, N.L., 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure–function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review of Microbiology*, **54**(1), pp.289–340.
 28. Yimer, D. and Tilahun, A., 2018. Microbial biotechnology review in microbial enzyme production methods, assay techniques and protein separation and purification. *Journal of Nutrition, Health and Food Engineering*, **8**(1), pp.1–7.
 29. Zhang, Y., Hu, J., Zhang, Q., Cai, D., Chen, S. and Wang, Y., 2023. Enhancement of alkaline protease production in recombinant *Bacillus licheniformis* by response surface methodology. *Bioresources and Bioprocessing*, **10**(1), p.11.
 30. Zhou, C., Zhang, H., Fang, H., Sun, Y., Zhou, H., Yang, G. et al., 2021. Transcriptome-based functional identification and application of regulator AbrB on alkaline protease synthesis in *Bacillus licheniformis* 2709. *International Journal of Biological Macromolecules*, **166**, pp.1491–1508.
 31. Zhou, C., Zhou, H., Li, D., Zhang, H., Wang, H. and Lu, F., 2020. Optimized expression and enhanced production of alkaline protease by genetically modified *Bacillus licheniformis* 2709. *Microbial Cell Factories*, **19**, p.13.
 - subtilis. *Research in Microbiology*, **155**(3), pp.167–173.
 21. Reddy, N., Deekonda, V., Seshagiri, S., Reddy, R. and Gangula, A.K., 2022. Production, characterization and applications of proteases produced by *Bacillus licheniformis*, *Acinetobacter pittii* and *Aspergillus niger* using neem seed oil cake as substrate. *Industrial Crops and Products*, **187**, p.115403.
 22. Sharma, K.M., Kumar, R., Panwar, S. and Kumar, A., 2017. Microbial alkaline proteases: optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **15**(1), pp.115–126.
 23. Sharma, M., Gat, Y., Arya, S., Kumar, V., Panghal, A. and Kumar, A., 2019. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. *Industrial Biotechnology*, **15**(2), pp.69–78.
 24. Singh, R., Singh, T. and Pandey, A., 2019. Microbial enzymes: an overview. In: *Advances in Enzyme Technology: Biomass, Biofuels and Biochemicals*, pp.1–40.
 25. Tang, X.M., Shen, W., Lakay, F., Shao, W.L., Wang, Z.X., Prior, B. et al., 2004. Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, **26**, pp.975–979.
 26. Tóth, E., Huszár, K., Bencsura, P., Kulcsár, P.I., Vodicska, B., Nyeste, A. et al., 2014. Restriction enzyme body doubles and PCR cloning: on



Construction of alkaline serine-protease recombinant protein resistant to alkaline conditions: homogenization and expression of *Bacillus licheniformis* gene in pMAL-c2X plasmid and optimization of its enzyme activity

Shahin Khubani¹ Reza Naghiha^{*2} Ahmad Oryan³ Elham Moazzamian⁴

1. PhD student in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Agriculture and Modern Sciences, Shiraz Branch Azad University, Shiraz, Iran.
2. Associate Professor of Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Professor of clinical pathology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4. Assistant Professor of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Agriculture and Modern Sciences, Shiraz Branch Azad University, Shiraz, Iran.

Received: 20 February 2025 Accepted: 13 November 2025

Extended Abstract

Introduction: In recent years, microbial alkaline proteases have become an important industrial and commercial biotechnology product. Alkaline protease is widely used in food, detergent and pharmaceutical industries due to its relatively high hydrolysis ability and tolerance in alkaline conditions. *Bacillus licheniformis* has attracted the attention of researchers due to the production of heat-resistant alkaline protease enzymes. Therefore, the aim of this study was to clone the alkaline serine protease gene of *Bacillus licheniformis* into *Escherichia coli* in order to produce this enzyme and to investigate the effect of temperature and pH on the activity of the recombinant enzyme. **Materials and methods:** In this study, the alkaline serine protease gene of *Bacillus licheniformis* was amplified using specific primers and polymerase chain reaction (PCR). The alkaline serine protease gene was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DH5) by plasmid pMAL-c2X. Gene transfer was investigated using PCR, and the cloned products' nucleotide sequence was confirmed by determining the nucleotide sequence. Then the enzymatic capacity of recombinant alkaline serine protease was investigated at different pH and temperatures with the modified method of Folin and Ciocalteu. **Results:** The present study showed that cloning the alkaline serine protease gene in *Escherichia coli* led to a 343% increase in the production of the alkaline protease enzyme. Polymerase chain reaction confirmed the cloning of the 1125 bp gene. Also, the produced enzyme showed high stability and activity at high temperatures and alkaline pH. **Conclusion:** Protease enzyme production with relatively high stability in different conditions shows the important application value of this technique for enzyme production in industry and large-scale production.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, Alkaline serine protease, pMAL-c2X plasmid, Cloning

* Corresponding Author: Shahin Khubani

Address: Associate Professor of Microbiology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Email: naghiha@gmail.com

