SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

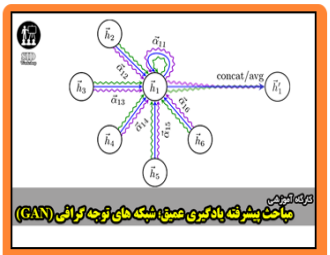
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)

کلونینگ و تعیین خصوصیات آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز از یک گونه ترموفیل ایرانی به عنوان آنزیم کلیدی در تولید 1و2- پروپان دی ال

محمد پاژنگ[1]، سید محسن اصغری[2]، ارسطو بدویی دلفارد[3]، خسرو خواجه[4]

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

pajang@modares.ac.ir

چکیده :

در آمریکا سالیانه حدود پانصد هزار تن 1و2- پروپان دی ال (پروپیلن گلیکول) در صنایعی همچون شوینده، داروسازی، آرایشی و همچنین به عنوان ضد یخ مصرف می شود. در روش های معمول 1و2- پروپان دی ال از طریق آبدهی پروپیلن اکسید تولید می شود، اما تخمیر میکروبی یکی از روش های سودمند در تولید این ماده از مواد ارزان قیمت و تجدید پذیر است. امروزه برای افزایش تولید میکروبی 1و2- پروپان دی ال از روش های مهندسی متابولیک استفاده می کنند. آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز در مسیر تولید این ماده در باکتری ها، نقش کلیدی داشته و باعث جهت یابی متابولیسم باکتری به طرف تولید 1و2- پروپان دی ال می شود. در این مطالعه آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز از یک گونه ترموفیل ایرانی تعیین توالی شد. ژن مورد نظر حاوی 399 نوکلئوتید بوده و پلی پپتید 132 آمینواسیدی را رمزدهی می کند. این ژن به وکتور بیانی pET 28a (+) منتقل و در میزبان *E.coli* BL21 (DE3) بیان گردید. آنزیم بیان شده با شوک حرارتی و به دنبال آن با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی خالص شد و خصوصیات سینتیکی آنزیم با استفاده از دی هیدروکسی استون فسفات به عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت. با بررسی خصوصیات سینتیکی آنزیم، K_m و V_{max} آنزیم به ترتیب 0/36 mM و 0/4 $\mu mol\ min^{-1}\ \mu g^{-1}$ و با تعیین فعالیت آنزیم در دماهای مختلف، دمای بهینه فعالیت آنزیم 75 °C به دست آمد. این آنزیم در مقایسه با آنزیم هایی که قبلا گزارش شده از پایداری حرارتی بالاتری برخوردار است.

---

[1] - دانشجوي دكتري بيوشيمي، گروه بيوشيمي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه تربيت مدرس

[2] - دانشجوي دكتري بيوشيمي، گروه بيوشيمي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه تربيت مدرس

[3] - دانشجوي دكتري بيوشيمي، گروه بيوشيمي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه تربيت مدرس

[4] - دانشيار گروه بيوشيمي، گروه بيوشيمي، دانشكده علوم پايه، دانشگاه تربيت مدرس

Archive of SID

www.SID.ir

واژه های کلیدی: 1و2- پروپان دی ال ، متیل گلی اکسال سنتاز، کلونینگ، خصوصیات سینتیکی

1- مقدمه:

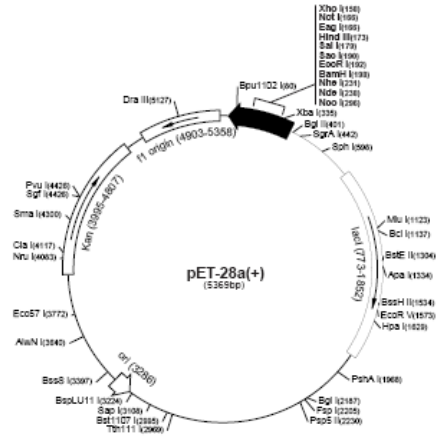
1و2 پروپان دی ال (پروپیلن گلیکول) یک دی ال سه کربنه بوده و کربن شماره 2 آن نا متقارن است. 1و2 پروپان دی ال، ترکیب شیمیایی تجاری بوده و سالیانه به میزان نیم میلیون تن در ایالات متحده تولید می شود (1). روش تجاری برای تولید 1و2 پروپان دی ال راسمیک، آبدهی پروپیلن اکسید (از مشتقات پروپیلن) می باشد (2). 1و2 پروپان دی ال راسمیک در صنایعی همچون شوینده و آرایشی کاربرد دارد (2). ایزومر فضایی این ترکیب (R- 1و2 پروپان دی ال) بطور خالص از طریق تخمیر میکروبی ساخته می شود. مسیر تولید 1و2 پروپان دی ال از طریق تبدیل گلوکز به متیل گلی اکسال می باشد. در این مسیر آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز نقش کلیدی داشته و باعث جهت گیری متابولیسم گلوکز در باکتری به طرف تولید 1و2 پروپان دی ال می شود (1). در این مطالعه متیل گلی اکسال سنتاز از یک گونه ترموفیل ایرانی تعیین توالی شد و سپس جهت تعیین خصوصیات در وکتور بیانی (+) pET 28a کلون و در میزبان *E.coli* BL21 منتقل و آنزیم بیان شده مورد بررسی قرار گرفت.

2- مواد و روش ها:

2-1 - تعیین توالی ژن: بر اساس توالی ژن متیل گلی اکسال سنتاز در گونه های مشابه، پرایمر طراحی و سپس ژن مورد نظر از روی ژنوم باکتری PCR گردید، قطعه مورد نظر توسط کیت TA clone PCR cloning (شرکت Bioneer) در وکتور pTZ57R/T کلون و سپس تعیین توالی شد.

2-2- کلون کردن ژن:

برای کلون کردن ژن پرایمر های کلونینگ حاوی جایگاه های برش با آنزیم های Nde I و Hind III طراحی و سپس ژن مورد نظر در وکتور بیانی pET 28a(+) با استفاده از آنزیم T4 لیگاز کلون شد.



Archive of SID

www.SID.ir

شکل 1) نقشه وکتور بیانی (+) pET 28a

2-3- انتقال وکتور:

عمل انتقال وکتور به باکتری با استفاده از روش شیمیایی انجام گرفت.

2-4- بیان پروتئین:

باکتری حاوی وکتور بیانی وارد محیط کشت مایع حاوی آنتی بیوتیک مناسب شده و در انکوباتور با دمای 37 ° C و با دور 200 rpm قرار گرفت تا $OD_{600\ nm}$ محیط کشت به 0/4 تا 0/7 برسد، سپس IPTG به مقداری به محیط کشت اضافه شد تا غلظت IPTG در محیط کشت به 1mM برسد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت 19 ساعت در دمای 30 °C و با دور 200 rpm انکوبه شد.

2-5- استخراج عصاره سلولی:

بعد از 19 ساعت انکوبه شدن، محیط کشت سانتریفوژ گردید. رسوب باکتری در بافر لیز حل شده و پس از افزودن 1mM PMSF توسط امواج ماورای صوت (سونیکاتور) لیز شد. محتوای سلولی حاصل از سونیکاسیون سانتریفوژ و محلول رویی جمع آوری شد.

2-6- تخلیص پروتئین:

تخلیص آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز از طریق کروماتوگرافی تمایلی و با استفاده ستون نیکل آگارز انجام گرفت. بدین منظور محتوای پروتئینی حاصل از لیز سلولی (مایع رویی حاصل از ساتریفوژ) بعد از شوک حرارتی، از ستون نیکل آگارز عبور داده شد. برای جدا نمودن پروتئین متیل گلی اکسال سنتاز که از طریق دنباله هیستیدینی با رزین میانکش برقرار کرده، از گرادیانت ایمیدازول استفاده شد. ایمیدازول با هیستیدین رقابت کرده و باعث جداسازی پروتئین از رزین و خروج از ستون می شود.

2-7- کنترل مقدار بیان و خلوص پروتئین:

Archive of SID

www.SID.ir

از روش SDS-PAGE برای تعیین مقدار بیان و درجه خلوص پروتئین استفاده شد. الکتروفورز در شرایط احیـایی انجام شد.

2-8- تعیین فعالیت آنزیم

آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز با استفاده از سوبسترای دی هیدروکسی استون فسفات و معرف 2و4 دی نیتروفنیل هیدرازین تعیین فعالیت شد (3).

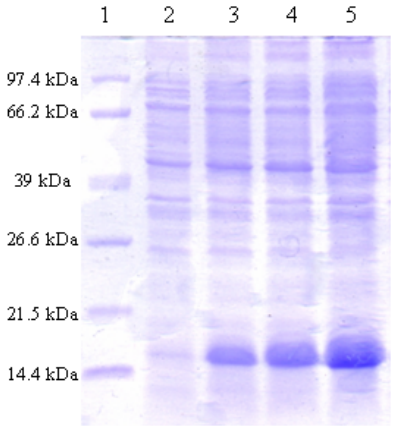
3- نتایج

3-1- توالی ژن

با تعیین توالی ژن مشخص شد، ژن آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز دارای 399 نوکلئوتید بوده و ایـن تـوالی، پلـی پپتید 132 آمینواسیدی را رمزدهی می کند. با توجه به توالی آمینواسـیدی آنـزیم (وزن مولکـولی بـر اسـاس تـوالی آمینواسیدی 14346 دالتون است) و با در نظر گرفتن افزوده شدن دم هیستیدینی به انتهـای N آنـزیم، وزن مولکـولی پروتئین بیان شده در این تحقیق در حدود 16467 دالتون است. البته بایستی متذکر شد، ساختار گزارش شـده بـرای آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز در گونه های باکتریایی دیگر همچون *Eescherichia Coli* ساختار هومو هگزامر می باشد (4).

3-2- ارزیابی بیان و خلوص آنزیم متیل گلی اکسال سنتاز

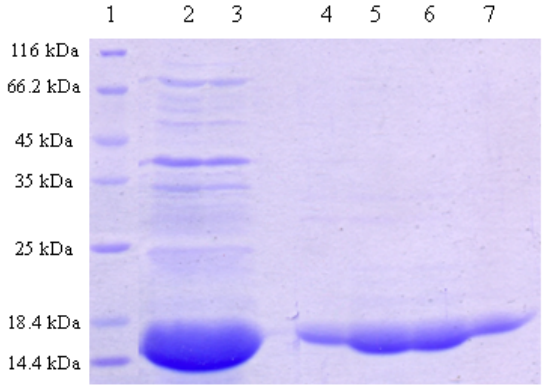
جهت ارزیابی مقدار بیان پروتئین، به ترتیب قبل از القا و 3، 7 و 19 ساعت بعد از القا از محیط گشت باکتری نمونه برداری شده و با انجام الکتروفورز روی این نمونه ها باند مربـوط بـه پـروتئین در نمونـه هـای بعـد از القـا مشـاهده گردید(شکل2). با در نظر گرفتن شدت باند، زمان مناسب برای بیان پروتئین 19 ساعت بعد از القا به دست آمد. بـرای خالص نمودن آنزیم، عصاره سلولی تحت شوک حرارتی قرار گرفته و توسط ستون نیکل آگارز خالص شد (شکل 3). بـا بررسی ژل الکتروفورز دیده می شود، پروتئین خالص شده از مقدار خلوص بالایی برخوردار است (خروجی ستون بعـد از اضافه نمودن ایمیدازول در چند فراکشن جمع آوری شد).



Archive of SID

www.SID.ir

شکل 2) ارزیابی بیان متیل گلی اکسال سنتاز: 1- مارکر وزن مولکولی، 2- قبل از االقا با IPTG، 3، 4، 5- به ترتیب 3، 7 و 19 ساعت بعد از القا.



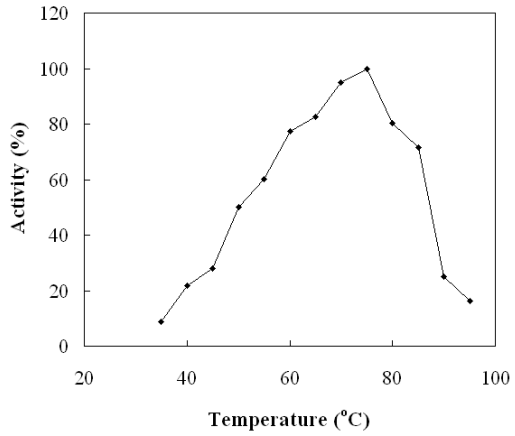
شکل 3) ارزیابی خلوص متیل گلی اکسال سنتاز: 1- مارکر وزن مولکولی، 2- عصاره سلولی، 3- بعد از شوک حرارتی، 7-4- فراکشن های حاصل از افزودن بافر ایمیدازول 250 mM

3-3- خصوصیات سینتیکی آنزیم

با بررسی فعالیت آنزیم در غلظت های متفاوت از دی هیدروکسی استون فسفات، K_M و V_{Max} آنزیم به ترتیب mM 0/36 و $0/4\ \mu mol\ min^{-1}\ \mu g^{-1}$ به دست آمد.

3-4- دمای بهینه فعالیت آنزیمی

با اندازه گیری فعالیت آنزیم در دماهای مختلف، دمای بهینه فعالیت آنزیم 75 °C به دست آمد. در ایـن آزمـایش محیط واکنش آنزیم در دمای مورد نظر به مدت 5 دقیقه قرار داده شده، سپس فعالیت اندازه گیری شد. (شکل 4).



Archive of SID

www.SID.ir

شکل 4) نمودار فعالیت آنزیم در دماهای مختلف.

4- نتیجه گیری و بحث:

با مقایسه دمای عملکرد آنزیم با آنزیم های مشابه در سایر گونه های باکتریایی (3، 5)، این آنزیم دمای فعالیت بهینه (75 °C) و پایداری حرارتی بالاتری دارد. در ضمن تعیین خصوصیات آنزیمی از یک گونه ترموفیل برای اولین بار در جهان در این تحقیق گزارش می شود. همچنین با توجه به اینکه تا به حال از آنزیم های مزوفیل برای تولید 1و2 پروپان دی ال استفاده شده (1، 2، 5، 6، 7)، می توان با به کار بردن این آنزیم و کلون نمودن آن در میزبان مناسب کارایی تولید 1و2 پروپان دی ال را توسط این آنزیم ترموفیل مورد بررسی قرار داد.

5- منابع

1- Bennett, G.N. San, K. –Y., (2001). Microbial formation, biotechnological production and applications of 1,2- propanediol. Applied Microbial Biotechnology, 55: 1- 9

Archive of SID

www.SID.ir

2- Cameron, D.C. Altaras, N.E. Hoffman, M.L. Shaw, A.J., (1998). Metabolic engineering of propandiol pathways. Biotechnology Progress, 14, 116- 125.

3- Hopper, D.J. Cooper, R.A., (1972). The purification of *Eescherichia Coli* methylglyoxal synthase . Biochemical Journal. 128, 321-329

4- Saadat, D. Harrison, D.H.T., (1999). The crystal structure of methylglyoxal synthase from *Eescherichia Coli*. Structure, 7, 309- 317

5- Huang, K.- Y. Rudolph, F.B. Bennett, G.N., (1999) Characterization of methylglyoxal synthase from *clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its use in the formation of 1,2-propanediol. Applied and Envirinmental Microbiology, 65, 3244- 3247

6- Altaras, N. E. Cameron, D. C., (1999). Metabolic engineering of a 1,2- propanediol pathway in *Eescherichia Coli*. Applied and Envirinmental Microbiology, 65, 1180- 1185

7- Lee, W. DaSilva, N. A., (2006). Application of sequential integration for metabolic engineering of 1,2-propanediol production in yeast. Metabolic Engineering, 8, 58-65

Archive of SID

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

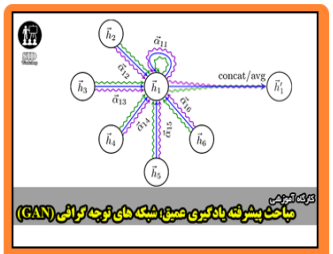
سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین مکالمه روزمره انگلیسی

کارگاه آنلاین آموزش استفاده از وب آو ساینس



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی

(Graph Attention Networks)