www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1391، جلد 1، شماره 4، صفحات 282-273
DOI: 10.22101/JRIFST.2013.03.15.144

JRIFST

کلون کردن ژن پروکیموزین در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس

لادن امین لاری[1*]، ارسلان حسینی[2]، محمد هادی اسکندری[3]

1- دانشجوی دکتری گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

* نویسنده مسئول (l.aminlari@gmail.com)

2- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

3- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

چکیده

در سال‌های اخیر از یک طرف به دلیل افزایش حجم تولید شیر در جهان و از طرف دیگر به خاطر کاهش منابع طبیعی آنزیم رنین، تولید پنیر با استفاده از این آنزیم کاهش چشمگیری داشته است. تلاش‌های زیادی برای تولید این آنزیم به شکل نوترکیب صورت گرفته است. باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس استارتر طبیعی پنیر محسوب می‌شود و تولید پروکیموزین توسط این باکتری تحول بزرگی در صنعت شیر ایجاد خواهد کرد. در این پژوهش تلاش بر این بوده است که ژن تولید کننده‌ی پروکیموزین بزی در باکتری لاکتوکوکس لاکتیس کلون گردد. برای این کار ژن پروکیموزین که قبلاً در پلاسمید pET- 28 و در باکتری E. coli سویه BL21(DE3) کلون شده بود، توسط واکنش PCR تکثیر و پس از جداسازی ژن در پلاسمید واسط pTZ57R کلون و برای نگهداری بهتر به باکتری *E. coli GM2163* منتقل شد. سپس ژن پروکیموزین از پلاسمید pTZ57R بریده، در پلاسمید لاکتوباکتریایی pNG-410 کلون و برای تکثیر پلاسمید کلون شده به باکتری *E.coli MC1061* منتقل شد. بعد از تکثیر، پلاسمید pNG-410 حامل ژن پروکیموزین از باکتری *E. coli MC1061* جدا و به باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NZ9000 منتقل گردید. کلون‌های به دست آمده توالی یابی و از صحت ژن مورد نظر اطمینان حاصل شد.

تاریخ دریافت: 90/12/22
تاریخ پذیرش: 91/07/29

واژه‌های کلیدی

پروکیموزین
کلون کردن
لاکتوکوکوس لاکتیس

مقدمه

بخش بزرگی از شیر تولیدی در جهان به محصولات و فرآورده‌های لبنی تبدیل می‌شود و در این میان پنیر یکی از پرطرفدارترین محصولات لبنی در سراسر جهان است. در مرحله‌ی تولید پنیر ابتدا باکتری‌های استارتر به شیر افزوده می‌شوند و پس از مدت کوتاهی که در اثر فعالیت آن ها pH شیر کاهش پیدا کرد، آنزیم رنین به آن افزوده می‌شود (Anema et al., 2007؛ فرهنودی، 1377؛ Chitpinityol et al., 1998) به طور سنتی آنزیم مورد استفاده برای کلوخه کردن شیر، رنین (کیموزین) است (Mohanty et al., 1999). کیموزین جزء خانواده‌ی پپسین می‌باشد و یک پروتئاز آسپارتیک تک اسیدی است و عمدتاً از ساختار β-sheet تشکیل شده است. کیموزین حاوی 323 اسید آمینه و وزن مولکولی 35/6 kDa می‌باشد. لایه‌ی مخاطی شیردان نشخوارکنندگان در مراحل اول

زندگی، به طور طبیعی این آنزیم را به صورت پیش‌ساز (پروکیموزین) (365 اسید آمینه و وزن مولکولی 40/8 kDa) ترشح می‌کند و در محیط اسیدی شیردان با جدا شدن خود بخودی یک قطعه‌ی پپتیدی از انتهای آن، رنین فعال به دست می‌آید. مقدار این آنزیم در روزهای اول بعد از تولد بسیار بالا است و به تدریج با آنزیم پپسین جایگزین می‌گردد. آنزیم کیموزین با شکستن پیوند پپتیدی بین Phe105 و Met106 در زنجیره کاپا کازئین موجب ایجاد لخته می‌گردد. (Chitpinityol et al., 1998; Mohanty et al., 1999).

به دلیل افزایش تقاضا برای پنیر، صنایع شیر همواره به دنبال جایگزین مناسبی برای آنزیم رنین بوده است و اکنون بیشتر پنیرهای موجود در بازار با رنین قارچی تهیه می‌شوند، اما طعم، مزه و عملکرد تولید پنیرهایی که با استفاده از رنین حیوانی تولید می‌شوند بهتر است (Anema et al., 2007; Le Loir et al., 2005 ; Beresfoed et al.,2001). آنزیم رنین حیوانی نسبت به قارچی خاصیت پروتئولیتیک کمتر و محدودتری دارد و در نتیجه مشکلاتی همچون سخت شدن لخته‌ی پنیر، از دست رفتن مقادیر زیادی از پروتئین و چربی در آب پنیر و طعم تلخ ایجاد نمی‌کند. از همین رو پژوهشگران از حدود دو دهه‌ی پیش تلاش‌های گسترده‌ای را در جهت تولید رنین حیوانی نوترکیب با استفاده از فن‌آوری مهندسی ژنتیک آغاز کرده‌اند. فن‌آوری تولید این آنزیم به شکل نوترکیب در دنیا منحصر به چند شرکت اروپایی و آمریکایی می‌باشد. در صورت تولید این آنزیم در داخل کشور، علاوه بر بهبود و تنوع بخشیدن به کیفیت پنیرهای تولیدی در داخل کشور، سالیانه از خروج مقادیر زیادی ارز از کشور جلوگیری خواهد شد. cDNA کد کننده‌ی تولید پروکیموزین گاوی در سیستم‌های بیان ژن مختلفی کلون و بیان شده است، اما هر یک از این سیستم‌ها دارای معایب و محاسنی هستند. اولین تلاش‌ها برای کلون کردن این ژن با کاربرد باکتری *اشریشیا کلی* صورت پذیرفته است. اما پروتئین تولیدی در این باکتری عمدتاً به شکل توده‌های نامحلول در سیتوپلاسم سلول رسوب می‌کند و نیاز به فعال‌سازی مجدد دارد (Chitpinityol et al., 1998). دیگر سیستم‌های بیان ژن نیز هریک دارای معایبی هستند. در سال‌های اخیر کاربرد باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* به عنوان میزبان بیان ژن برای پروتئین‌های نوترکیب به ویژه پروتئین‌های خوراکی مورد توجه قرار گرفته است. باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* یک باکتری گرم مثبت، هموفرمنتاتیو و از خانواده‌ی باکتری‌های GRAS (Generally Recognized As Safe) است که به طور سنتی در تخمیر مواد غذایی کاربرد داشته است و برای تولید مواد غذایی تخمیری شیری از جمله ماست، پنیر، کره‌ی تخمیری، کفیر، انواع پنیرهای نرم و سخت به کار می‌رود (Mierau et al., 2005; Zhou et al., 2006). تاکنون گزارشی از کلون کردن و بیان این پروکیموزین در این سیستم بیان ژن موجود نیست. (Emtage et al.,1983 ; Mierau et al., 2005; Le Loir et al., 2005; Rai et al., 2001). در این تحقیق تلاش شده است که cDNA کد کننده‌ی آنزیم پروکیموزین بزهای بومی ایران در باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* کلون گردد (Eskandari et al., 2008 Mierau et al., 2005 ; Terpe et al., 2006).

مواد وروش ها

طراحی پرایمر

از آنجا که ژن پروکیموزین می‌بایست در حد فاصل جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدود برش NheI و MluI در پلاسمید لاکتوباکتریایی کلون شود، پرایمرهای بالا دست (با نام ReNhelac و توالی 5'CGCAGGCTAGCGCTGAGATCACCA GGATC3') و پایین دست (با نام ReMlulac و توالی CAGCTACGCGTTCAGATGGCTTTGGC CAG3') طوری طراحی شدند که محصول PCR تولیدی توسط آن‌ها در انتهای 5' دارای جایگاه برش برای آنزیم NheI و در انتهای 3' دارای جایگاه برش برای آنزیم MluI باشند. واکنش PCR با این پرایمرها محصولی با اندازه 1120 bp تولید می‌کند.

کلون کردن قطعه ژنی پروکیموزین در پلاسمید واسط pTZ57R/T

در تحقیق پیشین ژن پری پروکیموزین بزی به صورت cDNA در پلاسمید pET28 کلون شده بود (Eskandari et al., 2008). این پلاسمید نوترکیب به روش لیز قلیایی با استفاده از کیت جداسازی پلاسمید (AccuPrep Plasmid Mini Extraction ساخت شرکت Bioneer کره جنوبی) از باکتری *E. coli* سویه BL21(DE3) جداسازی شد و به عنوان الگو در واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی (واجد محل های برش برای آنزیم‌های NheI و MluI) مورد استفاده قرار گرفت (Eskandari et al., 2008). برای تکثیر ژن از مخلوط آنزیم‌های Taq DNA polymerase و Pfu DNA polymerase استفاده شد. برای کلون سازی محصول PCR در پلاسمید واسط pTZ57R/T ، با توجه به این که طول پلاسمید 2886 جفت باز و قطعه پروکیموزین حدود 1100 جفت باز بود، نسبت بین پلاسمید با قطعه ژن در واکنش Ligation در حدود 1 به 3 (غلظت مولی) تنظیم شد. جهت انجام واکنش از آنزیم T4 DNA Ligase ساخت شرکت Fermentas به همراه بافر مخصوص آن استفاده شد(Chitpinityol et al., 1988).

انتقال (Transformation) پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T حامل ژن پروکیموزین به باکتری *E. coli* GM2163

برای انتقال محصول Ligation به باکتری *E. coli* GM2163 از محلول کلرید کلسیم و شوک حرارتی استفاده شد و برای رشد بهتر باکتری از محیط کشت SOC (5 میلی لیتر محیط کشت TSB استریل، 100 میکرولیتر محلول گلوکز 20٪ استریل شده با فیلتر،50 میکرولیتر $MgSO_4$ 1 مولار استریل،50 میکرولیتر $MgCl_2$ 1 مولار استریل) استفاده شد. برای انتخاب کلون‌های مثبت از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در محیط کشت TSA استفاده شد. برای ارزیابی انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *E. coli*، از واکنش PCR با آنزیم Taq DNA polymerase و پرایمرهای اختصاصی ReMlulac و ReNhelac استفاده شد (Rai et al., 2001 ; Terpe et al., 2006). برای اطمینان از حفظ توالی در طی مراحل کار، چند کلونی با واسطه شرکت ژن فن آوران و توسط شرکت Macrogen (کره جنوبی) توالی یابی شد.

کلون کردن قطعه ژنی پروکیموزین درپلاسمید لاکتوکوکوسی pNG-410

ابتدا هضم آنزیمی پلاسمید pTZ57R/T حامل ژن پروکیموزین و پلاسمید pNG-410 با استفاده از آنزیم محدود برش NheI انجام گرفت و پس از خالص‌سازی، هضم آنزیمی دوم توسط آنزیم محدود برش MluI (Fermentas) صورت گرفت. در نهایت قطعه ژنی پروکیموزین با جایگاه‌های برش NheI و MluI در جایگاه‌های برش مشابه در پلاسمید pNG-410 کلون شد (Mierau et al., 2005). از آنجا که طول پلاسمید pNG-410 3950 جفت باز و قطعه پروکیموزین حدود 1100 جفت باز است، نسبت بین پلاسمید با قطعه ژن در واکنش Ligation در حدود 1 به 3 (غلظت مولی) تنظیم و جهت انجام واکنش از آنزیم T4 DNA Ligase (Fermentas) استفاده شد. واکنش Ligation ابتدا با استفاده از محلول کلرید کلسیم و شوک حرارتی به باکتری *E. Coli* MC1061 منتقل شد (Chitpinityol et al., 1988) و برای ارزیابی وجود قطعه پروکیموزین درپلاسمیدهای pNG-410 وارد شده به باکتری *E. coli* MC1061 از دو روش PCR با آنزیم Taq DNA polymerase و نیز برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب استفاده شد.

انتقال (Transformation) پلاسمید نوترکیب pNG-410 حامل ژن پروکیموزین به باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NZ9000

برای تهیه سلول‌پذیرا از باکتری گرم مثبت لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NZ9000 استفاده شد. باکتری در محیط‌های کشت حاوی سوکرز M 2/5، گلیسین 20٪ و گلوکز 40٪ کشت داده شد و یک شبانه روز در 30 درجه سانتی‌گراد اینکوبه شد. روز بعد باکتری به محیط SMGG (محیط M17 حاوی M 0/5 سوکروز و M 0/5 گلوکز و گلایسین 1٪) منتقل شد تا OD به 660 نانومتر رسید. باکتری سانتریفیوژ و با محلول شستشو (M 0/5 سوکروز و گلیسین 10%)

شسته شد و در نهایت در دمای 80- درجه سانتی‌گراد فریز شد. 3 میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pNG-410 حامل ژن پروکیموزین با استفاده از دستگاه الکتروپوریتور و با ولتاژ2500 ولت، آمپر 25 میکروفاراد و مقاومت 200 اهم به 40 میکرولیتر سلول پذیرای باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس سویه NZ9000 منتقل شدند (Mierau et al., 2005; Zhou et al., 2006). برای انتخاب کلون‌های مثبت از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در محیط کشت M17 استفاده شد. در هر مرحله برای ارزیابی انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری، از واکنش PCR با آنزیم Taq DNA polymerase و یا برش آنزیمی با آنزیم‌های NheI و MluI استفاده شد و در نهایت مجدداً برای اطمینان از حفظ توالی در طی مراحل کار، چند کلونی با پرایمرهای اختصاصی پلاسمید pNG-410 که به دو طرف محل کلونینگ متصل می‌شوند (SeqF2 و SeqR2) نیز استفاده شد. با واسطه‌ی شرکت ژن فن آوران و توسط شرکت Macrogen (کره جنوبی) تعیین توالی شدند.

نتایج

کلون کردن ژن پروکیموزین در پلاسمیدpTZ57R/T

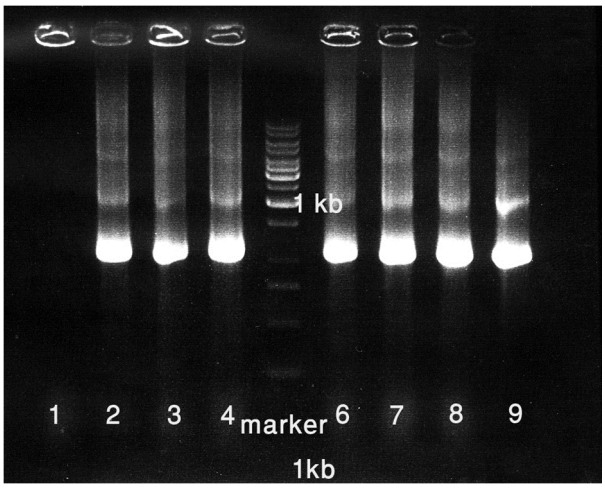
پس از کلون کردن ژن پروکیموزین در پلاسمید pTZ57R/T و انتقال پلاسمید به دست آمده به سلول پذیرای *E. coli* GM2163 و کشت سلول‌های فوق بر روی محیط کشت TSA حاوی مقدار مناسب آمپی‌سیلین، تعدادی کلونی بر روی محیط کشت رشد کرد که برای تأیید کلونینگ و وجود قطعه ژن مورد نظر (ژن پروکیموزین) بر روی آن‌ها PCR انجام شد (شکل 1).

کلون کردن ژن پروکیموزین در پلاسمید pNG-410

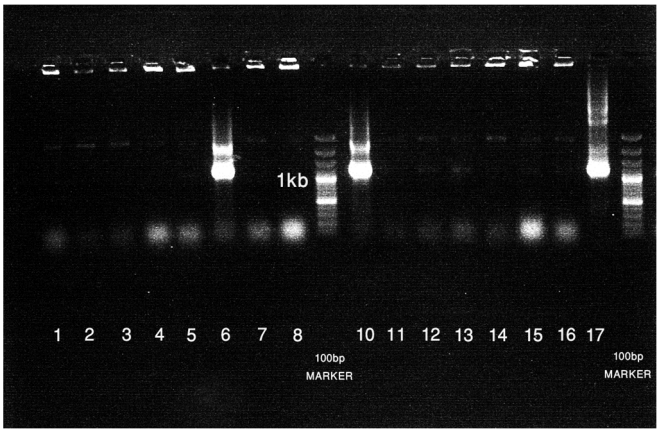
برای تأیید کلونینگ، از واکنش PCR بر روی کلونی‌های به دست آمده *E. coli* MC1061 استفاده شد. نتایج الکتروفورز محصولات PCR در شکل 2 نشان داده شده است.

پس از استخراج پلاسمید pNG-410 حامل ژن پروکیموزین از کشت کلونی‌های واجد ژن، برش آنزیمی آن‌ها توسط آنزیم‌های MluI و سپس NheI نیز انجام شد. باند ژن پروکیموزین با اندازه 1120 جفت باز و باند مربوط به پلاسمید pNG-410 به اندازه حدود 3950 جفت باز به دست آمد.

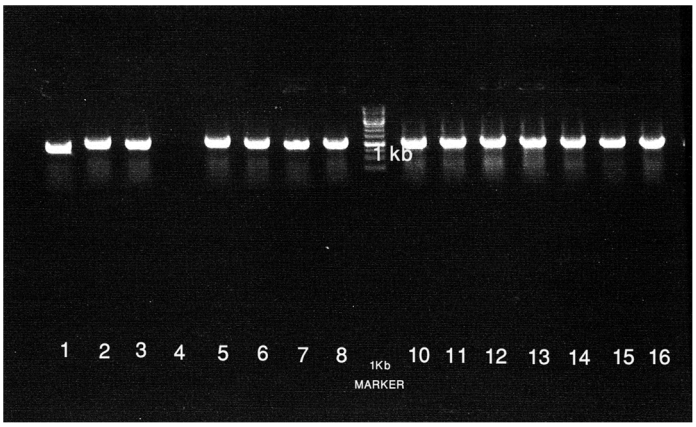
نتایج تعیین توالی پلاسمید pNG-410 حامل ژن پروکیموزین از کشت کلونی‌های *E. coli* MC1061 واجد ژن نشان داد که توالی ژن پروکیموزین در این کلون‌ها کاملاً مشابه ژن پروکیموزین در حامل واسط (pTZ57R/T) بود. نتایج همچنین نشان داد که ژن پروکیموزین به طور صحیح در جایگاه آنزیمی کلون شده است و در جایگاه درست ترجمه قرار گرفته است. برای اطمینان از وجود پلاسمید pNG-410 نوترکیب حامل ژن پروکیموزین در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس, از سه روش الف- PCR بر روی کلونی‌های لاکتوکوکوس لاکتیس با پرایمرهای اختصاصی، ب- برش آنزیمی پلاسمیدها و ج- PCR با پرایمرهایی که به حامل pNG-410 متصل می‌شوند، استفاده شد (Mierau et al., 2005; Zhou et al., 2006). شکل 3 نتایج PCR (روش الف) با پرایمرهای اختصاصی حامل (SeqF2 و SeqR2) را بر روی کلونی‌های به دست آمده از ترانسفورماسیون نشان می‌دهد.



شکل 1- نتیجه PCR بر روی کلونی‌های *E. coli* GM2163 حاصل از ترانسفورماسیون واکنش ligation پلاسمید pTZ57R/T و ژن پروکیموزین. ستون های 8-2: هفت نمونه از کلونی‌ها. ستون 1: کنترل منفی(باکتری بدون پلاسمید). ستون 9: پلاسمید pET28 حامل ژن پروکیموزین به عنوان کنترل.



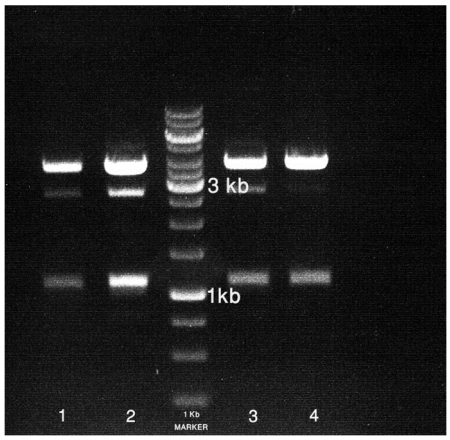
شکل 2- نتایج حاصل از PCR جهت تأیید صحت انتقال پلاسمیدهای pNG-410 حامل ژن پروکیموزین به باکتری *E. coli* MC1061. ستون‌های شماره 1 تا 8 و 10 تا 16: کلونی‌های باکتری *E. coli* MC1061 ستون شماره 17: پلاسمید pTZ57R/T حامل ژن پروکیموزین به عنوان کنترل استفاده شد. کلونی‌های شماره 6 و 10 پلاسمید حامل ژن پروکیموزین را گرفته‌اند.



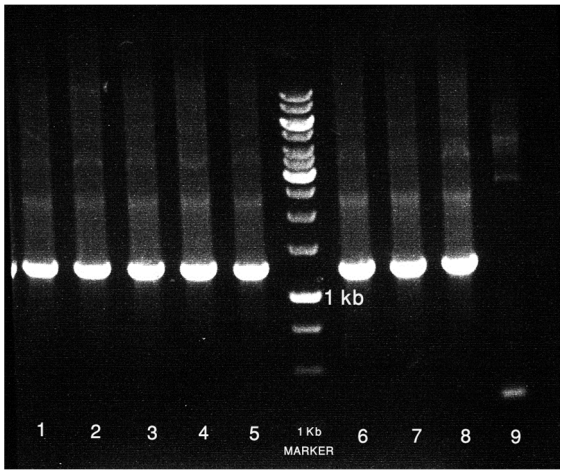
شکل 3- محصول PCR بر روی کلونی‌های لاکتوکوکس لاکتیس به دست آمده از transformation. ستون‌های شماره 1 تا 7: 7 نمونه از کلونی‌های لاکتوکوکس لاکتیس رشد کرده در محیط کشت M17 و ستون‌های شماره 8 و 10 تا 16 : 8 نمونه از کلونی‌های لاکتوکوکس لاکتیس رشد کرده در محیط TSB. به غیر از کلونی لاکتوکوکس لاکتیس شماره 4 از محیطM17 همه کلونی‌ها پلاسمید pNG-410 حاوی ژن پروکیموزین را دریافت کرده بودند.

برای بررسی سالم بودن محل برش آنزیم‌های MluI و NheI در ژن کلون شده، عمل برش آنزیمی توسط این دو آنزیم برروی پلاسمید کلون‌های مزبور انجام شد. برش ابتدا با آنزیم MluI و پس از خالص‌سازی پلاسمیدها، با آنزیم NheI انجام گرفت (شکل 4).

نتایج واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی پلاسمید حامل (SeqF2 و SeqR2) در شکل 5 نشان داده شده است.



شکل 4- نتایج برش آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pNG-410 حامل ژن پروکیموزین از کلون‌های لاکتوکوکوس لاکتیس با آنزیم‌های NheI و MluI. قطعه ژنی پروکیموزین (حدود 1100 bp) از هر 4 کلون آزاد شده است.



شکل 5- نتایج واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی پلاسمید حامل (SeqF2 و SeqR2) بر روی پلاسمید کلون‌ها، ستون‌های 8-1: محصولات واکنش PCR بر روی پلاسمید کلون‌های واجد ژن. ستون شماره 9: محصول واکنش PCR بر روی پلاسمید pNG-410 بدون ژن هدف به عنوان کنترل.

نتایج تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب pNG-410 حامل cDNA ژن پروکیموزین از کلون‌های لاکتوکوکوس لاکتیس نشان داد که توالی مذکور از 1098 نوکلئوتید ساخته شده است (شکل 6). توالی به دست آمده با توالی دیگر پروکیموزین بزی موجود در بانک ژنی در چهار نوکلئوتید تفاوت دارد که در سه نوکلئوتید آخر منجر به تغییر در اسید آمینه کد داده شده می‌گردند.

بحث

کیموزین جزء خانواده پپسین می‌باشد و عمدتاً از ساختار β-sheet تشکیل شده است. این آنزیم حاوی 323 اسید آمینه و وزن مولکولی 35/6 kDa می‌باشد که با شکستن پیوند پپتیدی بین Phe 105 و Met 106 در زنجیره کاپا کازئین موجب ایجاد لخته می‌گردد. لایه‌ی مخاطی شیردان نشخوارکنندگان در مراحل اول زندگی، به طور طبیعی این آنزیم را به

صورت پیش‌ساز (پروکیموزین) (365 اسید آمینه و وزن مولکولی 40/8 kDa) ترشح می‌کند و در محیط اسیدی شیردان با جدا شدن خود بخودی یک قطعه‌ی پپتیدی از انتهای آن، رنین فعال به دست می‌آید (hitpinityol et al., 1998; Mohanty et al., 1999). به دلیل کافی نبودن آنزیم‌های استخراجی از شیردان گوساله‌ها برای تولید پنیر در کل دنیا، تحقیقات برای یافتن جانشین مناسب کیموزین حیوانی ادامه دارد. در این مطالعه از باکتری لاکتوکوس لاکتیس که استارتر اصلی پنیر محسوب می‌شود به عنوان میزبان برای انتقال ژن تولید کننده‌ی پروکیموزین استفاده شد. سیستم انتقال و بیان ژن استفاده شده در این مطالعه به اختصار NICE نامیده می‌شود که جهت بیان پروتئین‌های ارزشمند در این باکتری طراحی شده است. در سال 2008 اسکندری و همکاران موفق به ساخت cDNA از روی mRNA ژن پروکیموزین بزی و کلون‌سازی آن در باکتری *E. coli* شدند ولی از آنجا که بیان در باکتری *E. coli* به صورت توده سلولی است، نیاز به عملیات refolding دارد تا آنزیم فعال به دست آید (Eskandari et al., 2008). از طرف دیگر باکتری *E. coli* می‌تواند در حین بیان پروتئین مورد نظر ترکیبات اگزوپلی ساکاریدی سمی هم تولید کند که در این حالت خالص سازی پروتئین بیان شده را با مشکل رو به رو می‌کند و همچنین نمی‌توان از این باکتری به طور مستقیم در محصول لبنی استفاده کرد. ولی باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* علاوه بر GRAS بودن، نیازی به refolding پروتئین بیان شده ندارد و پروتئین بیان شده را به صورت فعال در می‌آورد (hitpinityol et al., 1998; Eskandari et al., 2008). تا به حال ژن‌های متفاوتی توسط محققین مختلف در این باکتری کلون شده است. با توجه به سویه انتخابی این باکتری دارای توانایی‌های متفاوتی می‌باشد (Le Loir et al., 2005). سویه‌ای از باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* که در این تحقیق جهت کلون کردن استفاده شد (NZ9000)، قادر است مستقیماً پروتئین بیان شده را به محیط بیرون ترشح کند. از این رو می‌توان از این باکتری مستقیماً در شیر برای تهیه پنیر استفاده کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *لاکتوکوس لاکتیس* می‌تواند cDNA کد کننده ژن پروکیموزین بزی را حمل کند و در حین تکثیر باکتری پلاسمید حاوی این ژن پایدار باقی بماند.

نتایج تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن پروکیموزین کلون شده در پلاسمیدهای نوترکیب pNG-410 نشان داد که توالی به دست آمده با توالی cDNA پروکیموزین بزی به شماره AY 3898343 در چهار نوکلئوتید تفاوت دارد که منجر به تغییر اسید آمینه کد داده شده در سه کدون آخر می‌شود (شکل 6). کدون اول سبب ایجاد تغییر در اسید آمینه ی کد داده شده نمی‌شود و هر دو کدون سبب تولید اسید آمینه‌ی پرولین در این جایگاه می‌شوند. اما تغییر در سه کدون دیگر به ترتیب سبب جایگزینی اسید آمینه‌های هیستیدین، پرولین و سرین (در توالی بدست آمده در این مطالعه) با اسید آمینه‌های آرژنین، لوسین و آسپارژین می‌گردد. با توجه به این که هیچ یک از این جایگزینی‌ها در نقاط حساس آنزیم همانند جایگاه فعال آن روی نداده است، به نظر نمی‌رسد که تغییر قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم ایجاد شود.

کلون به دست آمده در این تحقیق برای بیان پروتئین پروکیموزین با کمک سیستم NICE استفاده می‌گردد. این سیستم که مختص باکتری *لاکتوکوکوس* است، قادر است با القای مقدار کم نایسین در محیط پروتئین مورد نظر را به محیط بیرون ترشح کند.

```
1     GCTGAGATCA CCAGGATCCC ACTGTACAAA GGCAAGCCTC TGAGGAAGGC   60
61    ACTGAAGGAG CATGGGCTTC TGGAGGACTT CCTGCAGAAA CAGCAATATG  120
121   GCGTCAGCAG CGAGTACTCC GGCTTTGGGG AGGTGGCCAG TGTGCCCTTG  180
181   ACCAACTACC TGGATAGTCA GTACTTTGGG AAGATCTACC TCGGGACACC  240
241   GCCCCAGGAG TTCACCGTGC TGTTTGACAC CGGCTCCTCT GACTTCTGGG  300
301   TACCCTCTAT CTACTGCAAG AGCAATGCCT GCAAAAATCA CCAGCGCTTC  360
361   GACCCAAGAA AGTCGTCCAC CTTCCAGAAC CTGGGCAAGC CCCTGTCTAT  420
421   CCGCTATGGG ACGGGCAGCA TGCAGGGCAT CCTGGGCTAC GACACCGTCA  480
481   CTGTCTCCAA CATTGTGGAC ACCCAGCAGA CAGTAGGCCT GAGCACCCAG  540
541   GAGCCTGGGG ATGTCTTCAC CTATGCCGAG TTCGACGGGA TCCTGGGGAT  600
601   GGCCTACCCC TCGCTCGCCT CAGAGTACTC GGTGCCCGTG TTTGACAGCA  660
661   TGATGGACAG GCGCCTGGTG GCCCAGGACC TGTTCTCGGT TTACATGGAC  720
721   AGGAATGGCC AGGGGAGCAT GCTCACGCTG GGGGCCATCG ACCCGTCCTA  780
781   CTACACAGGG TCCCTCCACT GGGTGCCCGT GACGCTGCAG AAGTACTGGC  840
841   AGTTCACCGT GGACAGTGTC ACCATCAGCG GTGCGGTGGT GGCCTGTGAG  900
901   GGTGGCTGTC AGGCCATCCT GGACACGGGC ACCTCCAAGC TGGTCGGGCC  960
961   CAGCAGCGAC ATCCTCAACA TCCAGCAGGC CATTGGAGCC ACACAGAACC 1020
1021  AGTATGGCGA GTTTGACATC GACTGCGACA GCTTGAGCAG CATGCCCACT 1080
1081  GTGGTCTTTG AGATCAATGG CAAAATGTAC CCACTGACCC CCTACGCCTA 1140
1141  TACCAGCCAG GAGGAGGGCT TCTGTACCAG TGGCTTCCAG GGTGAAAATC 1200
1201  ATTCCCATCA ATGGATCCTG GGGGATGTTT TCATCCGAGA GTATTACAGT 1260
1261  GTCTTTGACA GGGCCAACAA CCTCGTGGGG CTGGCCAAAG CCATCTGA   1318
```

شکل 6- توالی نوکلئوتیدی و cDNA کد کننده پروکیموزین بزی. زیر قسمت کد کننده پروآنزیم خط کشیده شده است. توالی پروکیموزین بزی استفاده شده در این مطالعه با دیگر توالی پروکیموزین بزی به شماره AY 3898343 در چهار کدون تفاوت دارد که در تصویر با سایه مشخص شده است.

منابع

1- فرهنودی، ف. 1377. صنعت شیر. چاپ اول. انتشارات جهاد تحقیقات و آموزش تهران.

2- Anema, S G., Kim Lee, S. & Klostermeyer, H., 2007. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of k-casein and the gelation of skim milk by chymosin, LWT, 40: 99–106.

3- Beresford, Tom P., Fitzsimons, A., Brennan, L. & Cogan, M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11: 259–274.

4- Chitpinityol, C. & Crabb, M., 1998. Chymosin and aspartic proteinases. Food Chemistry, 61: 395-418.

5- Eskandari, M., Hosseini, A. & Aminlari. M., 2008. Nucleotide sequence of cDNA encoding for preprochymosin in native goat. Iranian Journal of Veterinary Research, 9: 262-265.

6- Emtage, J. S., Angal, S., Doel, M. T., Harris, T. J. R., Jenkins,B., Lilley, G. & Lowe, P. A., 1983. Synthesis of calf pro chymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 80: 3671-3675.

7- Le loir, Y., Nouallie, S., Commissari, J., Bretigney, L., Gruss, A. & Langella, P., 2001. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 67: 4119–4127.

8- Mierau, I. & Kleerebezem, M., 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 68: 705-717.

9- Mierau, I., Leij, P., Swam, V., Blommestein, B. & Floris Esther, M., 2005. Industral scale production and purification of heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin

controlled gene expression system *NICE:* The case of lysostaphin. Microbial Cell Factories, 1-9.

10- Mohanty, A.K., 1999. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. Biotechnology Advances, 17: 205 – 217.

11- Rai, M. & Padh, H., 2001. Expression systems for production of heterologous proteins. Current Science, 80: 1121-1128.

12- Terpe, K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterogonous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbial Biotechnology, 72: 211–222.

13- Zhou, X., Fen Li, W., Xia Ma, G. & Jiang Pan, Y., 2006. The nisin-controlled gene expression system: Construction, Application and Improvements. Biotechnology Advances, 24: 285–295.

Cloning of prochymosin gene in *lactococcus lactis* bacteria

L. Aminlari*[1], A. Hosseini[2], M.H. Eskandari[3]

1- PhD student, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University
*Corresponding author (l.aminlari@gmail.com)
2- Associated professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University
3- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shiraz University

Abstract

In recent years the increase in milk production worldwide on one hand and reduction in natural sources of "rennin" on the other, has resulted in significant decrease in rennin-produced cheese. In this research, it was attempted to clone the caprin prochymosin gene in the *lactococcus lactis*. If succeeded, the results of this work would allow production of cheese without the need for adding exogenous rennin or low quality fungal enzymes. The prochymosin gene which had been previously cloned in pET plasmid in *E .coli BL21* was amplified by PCR and was then isolated from the agar gel, ligated to plasmid PTZ and cloned in *E. coli GM*. The prochymosin gene was cut by enzyme and ligated *to L. lactis* plasmid PNG and cloned in *E. coli MC1061*. The plasmid then isolated from *E. coli MC1061* and transferred to *L. lactis* NZ9000 and recombinant cloned were sequenced..

Keywords: Cloning; *Lactococcus lactis*; Prochymosin