بهینه‌سازی توالی ژن رنین گاوی و تهیه سازه ژنی مناسب برای تولید کیموزین در مخمر *پیچیا پاستوریس*

سهیلا محب زاده[۱]، ناصر زارع[۲*]، رسول اصغری زکریا[۲]، بهرام فتحی آچاچلوئی[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
۳- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی
٤- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۹٦/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰٦/۰٤)

چکیده

کیموزین حیوانی بـه عنـوان موثرترین آنزیم برای تولید پنیر مطرح است که این امر به دلیل کیفیت بسیار مناسب بافت و عطر و طعم پنیر تولید شده می‌باشد. با توجه به تقاضای روز افزون نسبت به این آنزیم نیاز است در کنار سایر منابع گیاهی و میکروبی از منابع نوترکیب نیز برای تولید این آنزیم استفاده گردد. در این پژوهش به منظور تولید نوترکیب کیموزین، و نیز بهبود بیان ژن کیموزین گاوی در مخمر، ابتدا توالی ژن کیموزین بر اساس کاربرد کدونی مخمر *پیچیا پاستوریس* بهینه‌سازی و سنتز گردید. پس از بهینه‌سازی توالی نوکلئوتیدی، شاخص انطباق کدونی (CAI) از ۰/۵۹ به ۰/۷۲ افزایش پیدا کرد در حالی‌که، توالی ژنی ۸۳٪ با توالی بهینه شده مطابقت داشت. تعداد کدون‌های نادر با فراوانی کم‌تر از ۱۰٪ قبل از بهینه‌سازی ٤۱ عدد بود که پس از بهینه‌سازی هیچ کدونی با فراوانی کم‌تر از ۱۰٪ یافت نشد. به منظور انتقال ژن کیموزین A به وکتور بیانی pPIC9 مخمری، ژن سنتز شده کیموزین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و در وکتور PTG-19 همسانه‌سازی گردید. کلونی‌های نوترکیب از طریق روش غربالگری کلونی‌های سفید-آبی گزینش شدند. ژن کیموزین با استفاده از آنزیم‌های *Not*I و *Eco*RI از وکتور PTG19-chymA برش داده شده و در وکتور pPIC9 برش یافته با همان آنزیم‌ها همسانه گردید. کلونی‌های نوترکیب pPIC9-chymA با استفاده از تکنیک کلونی PCR شناسایی و انتخاب شدند. ماهیت نوترکیبی و درج صحیح ژن کیموزین در وکتور بیانی مخمری pPIC9 از طریق استخراج پلاسمید و برش با آنزیم برشی *Bam*HI مورد تایید قرار گرفت.

کلید واژه‌گان: کیموزین نوترکیب، همسانه‌سازی ژن، آنزیم لخته‌کننده شیر

*مسئول مکاتبات: nzare@uma.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

۱- مقدمه

بخش بزرگی از شیر تولیدی در جهان به فرآورده‌های لبنی تبدیل می‌شود و در این میان پنیر یکی از پرطرفدارترین محصولات لبنی در جهان است. کیموزین[1]، یک آنزیم پیچیده از گروه آسپارتیک پروتئازها است که در شیردان پستانداران تولید می‌شود که در ایجاد لخته در شیر نقش ایفا می‌کند و در صنایع غذایی کاربرد فراوانی دارد. این آنزیم با اثر هیدرولیتیک بر پیوند پپتیدی میان اسید آمینه‌های شماره Met105-Phe106 کاپاکازئین، باعث تشکیل لخته شیر می‌شود. کیموزین به صورت پری‌پروکیموزین دارای ۳۸۱ اسیدآمینه است. ۱۶ اسید آمینه ابتدایی نقش سیگنال آب‌گریز را دارد که هنگام ترشح به فضای معده از پروتئین جدا می‌شود و پروکیموزین با ۳۶۵ اسیدآمینه تولید می‌گردد [۱]. این پروتئین تحت تاثیر pH معده دچار تغییراتی شده و به صورت خودبخود فعال می‌شود [۲]. در این حالت ۴۲ اسید آمینه از انتهای آمینی آن جدا شده و یک زنجیره پروتئینی با ۳۲۳ اسید آمینه تولید می‌گردد [۳].

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش میزان تولید پنیر در جهان و نیز کاهش منابع طبیعی آن، تولید پنیر با استفاده از این آنزیم کیموزین گاوی کاهش شدیدی یافته است و صنایع شیر جهت تولید پنیر به ناچار از آنزیم‌های گیاهی و قارچی استفاده می‌کنند [٤]. آنزیم‌های استخراج شده از منابع گیاهی به دلیل عمل غیر اختصاصی آن‌ها منجر به ایجاد عطر و طعم تلخ در پنیرهای تولیدی می‌گردد [۵]. به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی زیاد، شدت پروتئولیز افزایش می‌یابد که در نتیجه آن ماتریکس پروتئین در پنیرهای تولید شده نیز متحمل هیدرولیز بیش‌تر ساختار نرم‌تر دارد و در نتیجه احساس چربی پنیر نیز بیش‌تر می‌گردد [٦]. منابع میکروبی شامل برخی از قارچ‌ها می‌باشند که قادر به تولید آنزیم پروتئولیتیک هستند، این قارچ‌ها در فرمانتور کشت و سپس تغلیظ و پالایش می‌گردند. میکروارگانیسم‌های مختلفی به عنوان جایگزین تولیدکننده کیموزین مانند *آسپرژیلوس اوریزا* (*Aspergillus oryzae*)، *اندوتیا پارازیتیکا* (*Endothia parasitica*)، *موکور سیرسنلویدز* (*Mucor circinelloides*)، *رایزوموکور میهی* (*Rhizomucor miehei*) و *رایزوموکور پوسیلوس* (*Rhizomucor pusillus*) شناخته شده‌اند [۷]. از مزایای این میزبان‌ها می‌توان به قیمت کم‌تر، تنوع بیولوژیکی بیش‌تر و روش اصلاح ژنتیکی آسان‌تر اشاره کرد. اما در برخی موارد استفاده از این منابع به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی بالای آن‌ها نسبت به کیموزین حیوانی با محدودیت‌هایی روبرو می‌شود که این امر باعث بروز مشکلات ثانویه در محصول تولیدی (مانند از دست رفتن قابل توجه چربی و پروتئین‌ها از لخته و ورود آن‌ها به آب پنیر) می‌شود، در نتیجه بازده تولید پنیر کاهش یافته و در بعضی از موارد می‌تواند منجر به ایجاد عطر و طعم نامطلوب و ایجاد مزه تلخ در پنیر تولیدی گردد [٤،۸،۹].

آنزیم کیموزین گاوی نسبت به انواع دیگر خاصیت پروتئولیز کم‌تر و کنترل شده‌تری دارد و در نتیجه طعم، مزه و کیفیت خوراکی پنیرهایی که با استفاده از آن تولید می‌شوند بهتر است. [۱۰]. با توجه به این که این نوع کیموزین حاصل از معده چهارم پستانداران جوان جوابگوی تقاضاهای مورد نیاز برای تولید پنیر نمی‌باشد و هزینه تولید کیموزین به دست آمده از منابع حیوانی زیاد می‌باشد. درنتیجه، امکان استفاده از این منابع برای تامین کیموزین با کیفیت مناسب محدود شده و نیاز به منابع جدید که بتواند علاوه بر تامین کیموزین مورد نیاز، خواص حسی مطلوبی را در محصول نهایی ایجاد کند، ضروری به نظر می‌رسد [۱۱]. همچنین جداسازی و خالص‌سازی کیموزین حیوانی وقت‌گیر و نیاز به کروماتوگرافی میل ترکیبی و تبادل یونی است. خلوص پایین و آلودگی کیموزین با عوامل عفونی نیز می‌تواند نگران‌کننده باشد، بنابراین تولید نوترکیب آن یک روش جایگزین جهت به دست آوردن آنزیم برای تولید پنیر در سطح جهانی مطرح می‌گردد [۱۲]. کیموزین نوترکیب به صورت بسیار خالص در تخمیر در مقیاس بزرگ و با هزینه کم تولید می‌شود [۱۳]. به همین منظور پژوهشگران تلاش‌های فراوانی را برای تولید کیموزین نوترکیب حیوانی با استفاده از فنآوری DNA نوترکیب آغاز کرده‌اند. امروزه در بسیاری از کشورها کیموزین نوترکیب گاو در مخمر، *اشرشیا کلای*، سلول‌های قارچی به طور گسترده تولید می‌گردد، اخیرا این ژن به صورت نوترکیب در گیاهان توتون بیان شده است[١٤].

1. Chymosin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

کیموزین میکروارگانیسم‌های اصلاح ژنتیکی شده رفتاری دقیقا شبیه کیموزین گاو، بره یا بز دارد. علاوه بر این، بیان و فعالیت کیموزین می‌تواند از طریق بهره برداری از ابزارهای پیشرفته ژنتیکی و مهندسی پروتئین افزایش یابد [۱۵]. بعضی از گونه‌های مخمر مانند *ساکارومایسز سرویزیه* (*Saccharomyces cereviseae*) و *پیچیا پاستوریس* (*pichia pastoris*) و گونه‌های باکتریایی مانند *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) و *اشرشیا کلای* (*Escherichia coli*) به عنوان جایگزین‌های مناسب برای تولید کیموزین نوترکیب پیشنهاد گردیده است [۱۱].

روش کلی برای همسانه‌سازی این ژن در یک میزبان سنتز cDNA از طریق رونویسی معکوس از روی mRNA می‌باشد که سپس در حامل‌های (وکتور) مناسب همسانه شده و در میزبان‌های باکتریایی یا مخمری مشخصی بیان می‌گردد [۱۶]. در هنگام انتقال یک ژن از یک گونه به گونه دیگر، تفاوت در کاربرد کدونی[1] باعث کاهش سطح بیان پروتئین‌های نوترکیب می‌شود. برای جلوگیری از این مشکل، توالی DNA ژن اصلاح گردیده و با کدون‌های گونه‌ی میزبان مطابقت داده می‌شود که به آن بهینه‌سازی کدون[2] می‌گویند [۱۷]. میزان بیان پروتئین نوترکیب می‌تواند با بهینه‌سازی کدون‌ها افزایش یابد چرا که در این فرآیند کدون مطلوب با کدون نادر در توالی کد کننده تعویض می‌گردد. بهینه‌سازی کدون یک تکنیک مفید برای به حداکثر رساندن بیان پروتئین در میزبان از طریق افزایش کارایی ترجمه ژن مورد نظر است [۱۸]. بهینه‌سازی کدون‌ها به طور عمده جهت طراحی ژن‌های سنتزی به منظور بهبود بیان در میزبان‌های میکروارگانیسمی استفاده می‌شود [۱۹]. هدف از این تحقیق بهینه‌سازی ژن کیموزین براساس کدون‌های ترجیحی مخمر *پیچیا پاستوریس* و همسانه‌سازی آن در وکتور مخمری pPIC9 و تولید کیموزین نوترکیب در باکتری *اشرشیا کلای* سویه DH5α 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.

1. Codon Usag
2. Codon Optimization

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- بهینه‌سازی توالی ژن کیموزین

توالی ژن کیموزین A گوساله (*Bos taurus*) به شماره ژنی ۱۶۲۸۵۸ از مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) به دست آمد. ناحیه سیگنالی حذف و و ناحیه کدکننده[3] از ژن کیموزین جهت بهینه‌سازی انتخاب گردید. این توالی شامل ۳۶۵ اسیدآمینه با ۱۰۹۵ نوکلئوتید می‌باشد. در این تحقیق توالی ژن کیموزین قبل و بعد از بهینه‌سازی در پایگاه BiologicsCorp و با استفاده از ابزار تحت وب Codon Adaptation Index Calculator و همچنین پایگاه GenScript و نرم افزار تحت وب Rare Codon Analysis Report مورد مطالعه قرار گرفته و میزان GC و همچنین شاخص انطباق کدونی[4] (CAI) و مقدار توزیع فراوانی کدونی[5] (CFD) این توالی‌ها قبل و بعد از بهینه‌سازی برآورد گردید. جهت بررسی وجود کدون‌های نادر این توالی در پایگاه Graphical Codon Usage Analyser تجزیه و تحلیل شد و سپس به صورت توالی اولیه و توالی بهینه شده مورد همردیفی قرار گرفت و میزان مشابهت توالی قبل و بعد از بهینه‌سازی محاسبه گردید. همچنین جهت ترجمه توالی ژن کیموزین و اطمینان از تغییر نیافتن توالی اسیدآمینه‌ای قبل و بعد از بهینه‌سازی این توالی در پایگاه‌های Expasy و GenScript بررسی شد تا با سنتز مجدد این ژن، بتوان زمینه را برای بیان و تولید نوترکیب این آنزیم مهم برای صنایع غذایی را مهیا نمود. توالی بهینه‌شده توسط شرکت Bioneer Corp (کره جنوبی) سنتز و به صورت همسانه شده در وکتور pBHA تحویل داده شد.

۲-۲- طراحی آغازگرهای الیگودئوکسی نوکلئوتیدی

با استفاده از نرم افزار اولیگو ۷ (Oligo 7)، آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر توالی کد کننده یا CDS ژن کیموزین با رعایت اصول اساسی در طراحی آغازگر انجام پذیرفت. به منظور تسهیل همسانه‌سازی ژن در وکتور pPIC9، جایگاه‌های آنزیمی

3. coding sequences
4. Codon Adaptation Index
5. Codon Frequency Distribution

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

برشی مناسب به انتهای ′۵ آغازگرها اضافه گردید. محل آنزیم‌های برشی در توالی بهینه‌سازی شده کیموزین با خط تیره در جدول مشخص شده است. آنزیم برشی آغازگر رفت برای پلاسمید pPIC9 (شکل ۱)، *Eco*RI و آنزیم برشی آغازگر برگشت *Not*I می‌باشد. مشخصات این آغازگرها در جدول زیر آورده شده‌اند (جدول ۱).

Table 1 Chymosin A specific primers used for PCR amplification of synthetic cyhmosin gene

PCR Product length	Primers	sequence (5′ - 3)′	annealing temperature
1109bp	Forward	CGGAATTCGCTGAGATTACCAGG *Eco*RI	64.6 ˚C
	Reverse	ATGCGGCCGCTCTAGAGATG *Not*I	62.5 ˚C

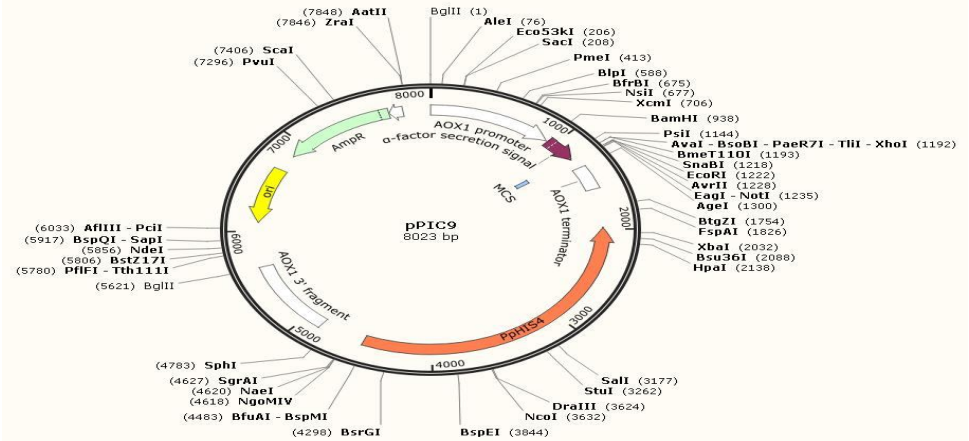


Fig1 Circular plasmid map of the pPIC9 vector [20]. The sequence encoding chymosin A was inserted between the *Eco*RI and *Not*I sites.

۲-۳- همسانه‌سازی ژن کیموزین از وکتور pBHA در وکتور PTG-19

قطعه ژن مورد نظر در وکتور pBHA از طریق PCR تکثیر و سپس خالص‌سازی گردید. کیموزین خالص‌سازی شده و وکتور کلونینگ PTG-19 در شرایط اتصال[1] قرار داده شدند و ژن کیموزین به وکتور PTG-19 منتقل گردید. کلونی‌های مثبت سلول‌های باکتریایی پس از ترانسفورم روی محیط LBی جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب (آمپی‌سیلین) و X-Gal و IPTG کشت شدند و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷°C رشد کردند. گزینش سلول‌های تراریخت و وکتورهای نوترکیب از طریق آزمون سفید/آبی (White/Blue test) انجام گرفت. کلونی‌های سفید حاوی وکتور نوترکیب بودند.

۲-٤- محیط کشت و سویه‌های باکتریایی

در این تحقیق از باکتری *اشرشیا کلای* (*Escherichia coli*) سویه‌ی DH5α به منظور تهیه‌ی سلول‌های مستعد، تکثیر و نگه‌داری وکتورهای اصلی و نوترکیب استفاده گردید. کشت باکتری روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب در دمای ۳۷°C انجام گرفت. کشت‌های مایع با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه در شیکر انکوباتور نگه‌داری شدند. محیط‌های کشت در تمامی آزمایش‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C در فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. آماده‌سازی سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* و تراریختی آن‌ها با استفاده از روش روش سمبروک[2] و راسل (۲۰۰۱) انجام گرفت [۲۱].

۲-۵- همسانه‌سازی ژن کیموزین از وکتور PTG-19 در وکتور مخمری pPIC9

1. Ligation

2. Sambrook and Russell

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

برش DNAی پلاسمید pPIC9 و محصول PCR ژن کیموزین توسط اندونوکلئازهای *Not*I و *Eco*RI و با استفاده از بافرهای توصیه شده توسط شرکت سازنده‌ی آنزیم انجام گرفت. واکنش هضم به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. مخلوط واکنش روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شده و توالی مورد نظر از ژل خالص‌سازی شد. برای خالص‌سازی قطعات DNA از روی ژل، از کیت GF-1 GEL DNA RECOVERY شرکت Vivantis استفاده گردید. بخشی از ژل حاوی DNA مورد نظر با اسکالپل استریل برش و داخل میکروتیوپ منتقل شد. هم وزن ژل برداشته شده بافر GB به تیوپ اضافه و سانتریفیوژ گردید تا ژل ته‌نشین شود. سپس تیوپ داخل حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵۰ °C قرار داده شد تا کاملاً ذوب و حل گردد. مخلوط حاصل روی ستون خالص-سازی اسیدهای نوکلئیک اضافه شده و به مدت ۱/۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. مایع زیری دور ریخته شد. ۷۵۰ میکرولیتر بافر شستشو ریخته شد و با شرایط فوق سانتریفیوژ گردید. دوباره مایع زیری دور ریخته شد. ستون داخل تیوپ جدید قرار داده شد و ۳۰ میکرولیتر بافر Elution به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول زیری حاصل از سانتریفوژ که حاوی DNA خالص‌سازی شده است، جهت واکنش اتصال استفاده گردید. با استفاده از آنزیم T4 DNA ligase جهت اتصال دو قطعه‌ی DNA (ژن کیموزین و وکتور pPIC9)، واکنش اتصال در دستگاه ترموسایکلر با حجم ۲۰ میکرولیتر و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C، سپس به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ١٤°C در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

۲-٦- تأیید اولیه کلونی‌های نوترکیب توسط روش کلونیPCR و استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری *E. coli*

سلول‌های باکتریایی پس از تراریختی روی محیط LBی جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷°C رشد کردند. به منظور تأیید اولیه کلونی‌های تراریخت، از کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کیموزین استفاده شد. به منظور تایید درج صحیح ژن از روش استخراج پلاسمید به روش miniperp (سمبروک و راسل۲۰۰۱) انجام گرفت. سپس DNA پلاسمیدی با آنزیم برشی *Bam*HI برش داده شده و محصول هضم روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بهینه‌سازی ژن کیموزین

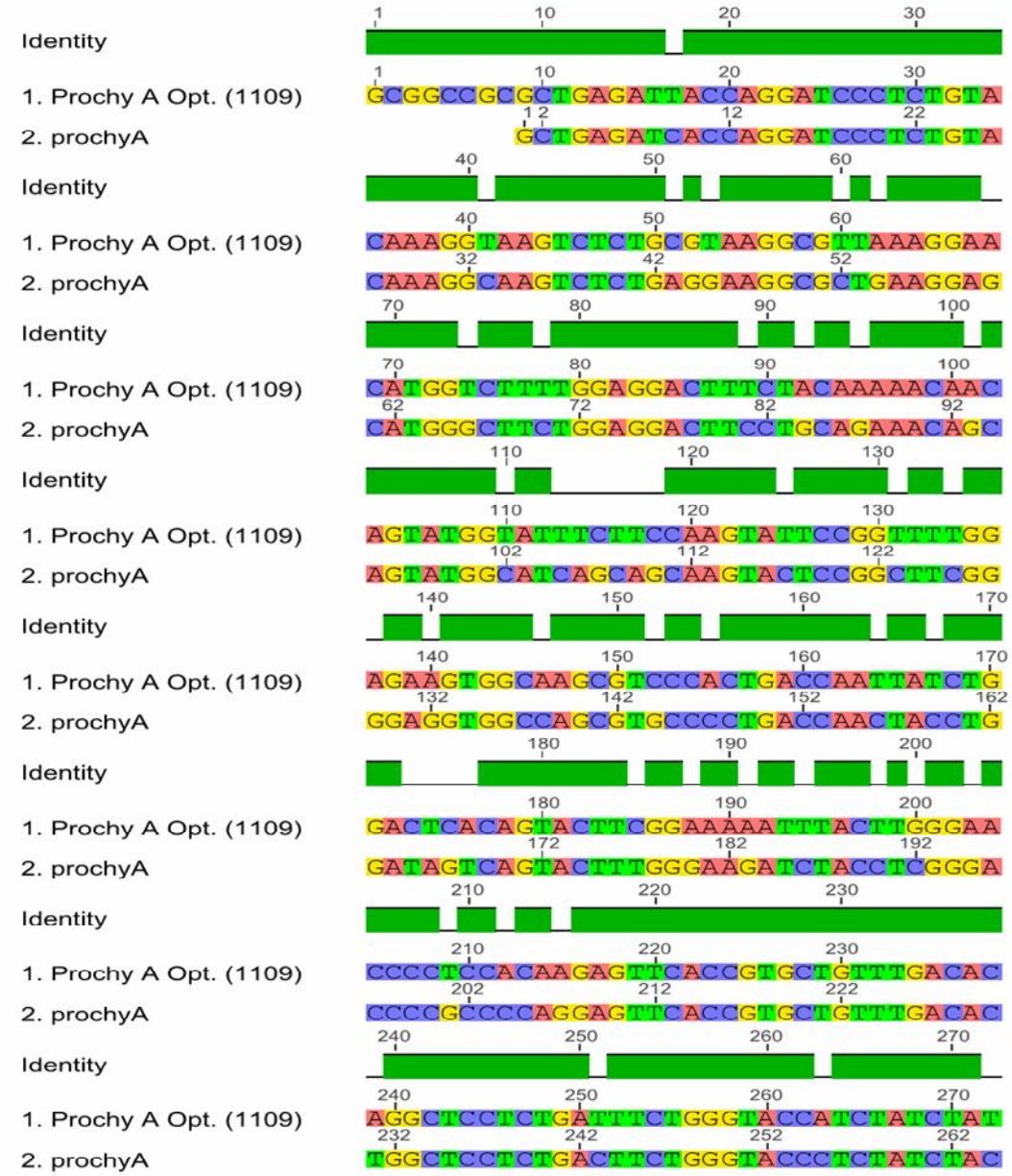
در این بررسی ١٦٨ نوکلئوتید از ۱۰۹۵ نوکلئوتید ژن کیموزین گوساله بر اساس کدون‌های ترجیحی *پیچیا پاستوریس* بهینه گشت و توالی مورد همردیفی قرار گرفت (شکل ۲). نتایج ترجمه ژن کیموزین در پایگاه‌های Expasy و GenScript قبل و بعد از بهینه‌سازی توالی نشان داد که هیچ گونه تغییر و جایگزینی در توالی اسیدآمینه‌ای در اثر بهینه‌سازی توالی ژن کیموزین ایجاد نشده است. عملیات بهینه‌سازی با توجه به توالی نوکلئوتیدی DNA و از طریق شکستن ساختار سه‌تایی کدونی و جایگزینی یک نوع نوکلئوتید جدید در توالی موردنظر انجام می‌گیرد. در این فرآیند با توجه به جدول توزیع فراوانی کدون‌های مطلوب گونه-ها، اسیدآمینه همان خواهد بود اما کدون با فراوانی پایین با کدون با فراوانی بالا جایگزین می‌گردد. این تغییر در بازها ممکن است از نوع پورین به پورین یا پیریمیدین به پیریمیدین (Transition change) و یا پورین به پیریمیدین و برعکس (Transversion change) باشد. از جمله اهداف بهینه‌سازی کاربرد کدونی می-توان به تطابق فراوانی کدون در موجود میزبان جهت اطمینان از تاخوردگی‌های[1] مناسب، محتوای GC ترجیحی جهت افزایش ثبات mRNA یا کاهش ساختارهای ثانویه، کاهش توالی‌های تکراری کدون‌ها یا ترتیب‌های بنیادی که ساختار یا بیان ژن را ممکن است تضعیف کند، سفارشی نمودن مناطق رونویسی و ترجمه شونده، حذف یا اضافه کردن جایگاه تغییرات پس از ترجمه در پلی‌پپتید کد شده (به عنوان مثال جایگاه گلیکوزیلاسیون)، حذف یا اضافه نمودن دومین‌های پروتئینی یا جایگاه آنزیم برشی، تصحیح جایگاه اتصال ریبوزوم و جایگاه تخریب mRNA، تنظیم نرخ ترجمه پروتئین برای تاشدگی مناسب و کاهش یا حذف تاب خوردگی mRNA اشاره نمود [۲۲].

نتایج آنالیز توالی ژن کیموزین با استفاده از ابزارهای تحت وب نشان داد که که پس از بهینه‌سازی شاخص انطباق کدونی ژن کیموزین افزایش یافته است، هر دو نرم افزار Codon

1. folding

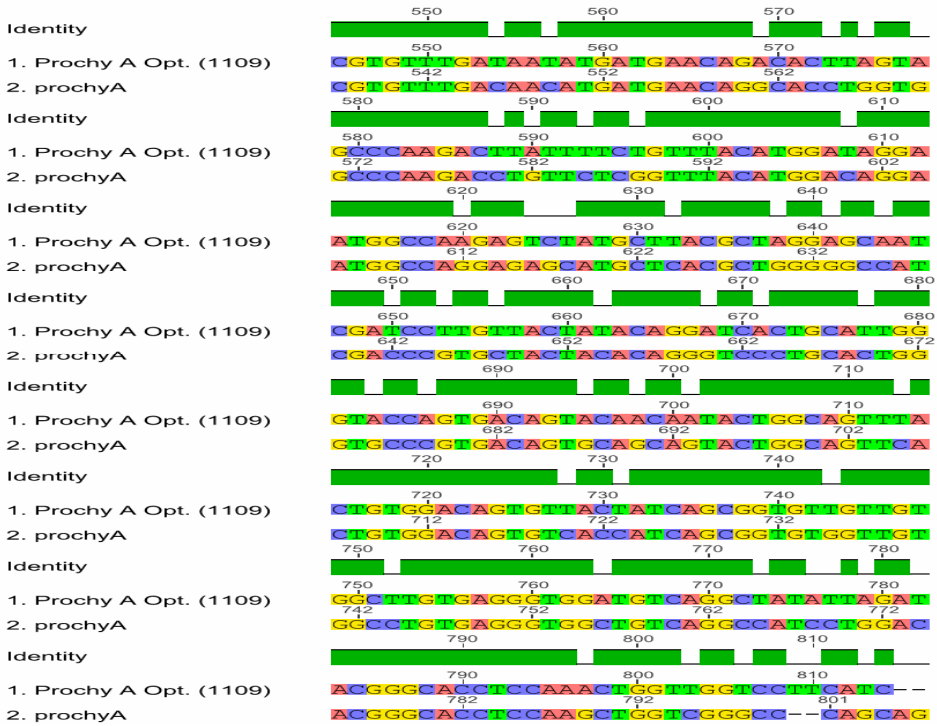
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

(Rare Codon و Adaptation Index Calculator) Analysis Report جهت تعیین میزان شاخص انطباق کدونی، مقدار یکسانی در رابطه با این شاخص نشان دادند. در این راستا هرچه میزان شاخص انطباق کدونی به عدد یک نزدیک‌تر باشد، نشان دهنده مطلوب‌تر بودن توالی بهینه‌سازی شده و کارآیی بالای بهینه‌سازی است. همچنین مقدار GC توالی پس از بهینه‌سازی کاهش یافت که هرچه این میزان کم‌تر شود نشان‌دهنده مطلوب بودن عملیات بهینه‌سازی توالی جهت همسانه‌سازی و بیان در *پیچیا پاستوریس* است. مقدار توزیع فراوانی کدونی (CFD) ۱۰۰ برای کدون‌هایی با بالاترین میزان کاربرد درمیزبان موردنظر، جهت بیان اسیدآمینه‌های یک ژن درجی تعیین شده است. کدون‌های با میزان CFD کمتر از ۳۰٪، بازده بیان را کاهش می‌دهند. در این تحقیق درصد کدون‌هایی با بازده بیان پایین‌تر از مقدار یاد شده، در اثر بهینه‌سازی توالی از ۰/۷ به ۰/۳ کاهش پیدا کرد. این نتایج با تحقیقات احمدپور و همکاران [۲۳] مطابقت دارد (جدول۲).

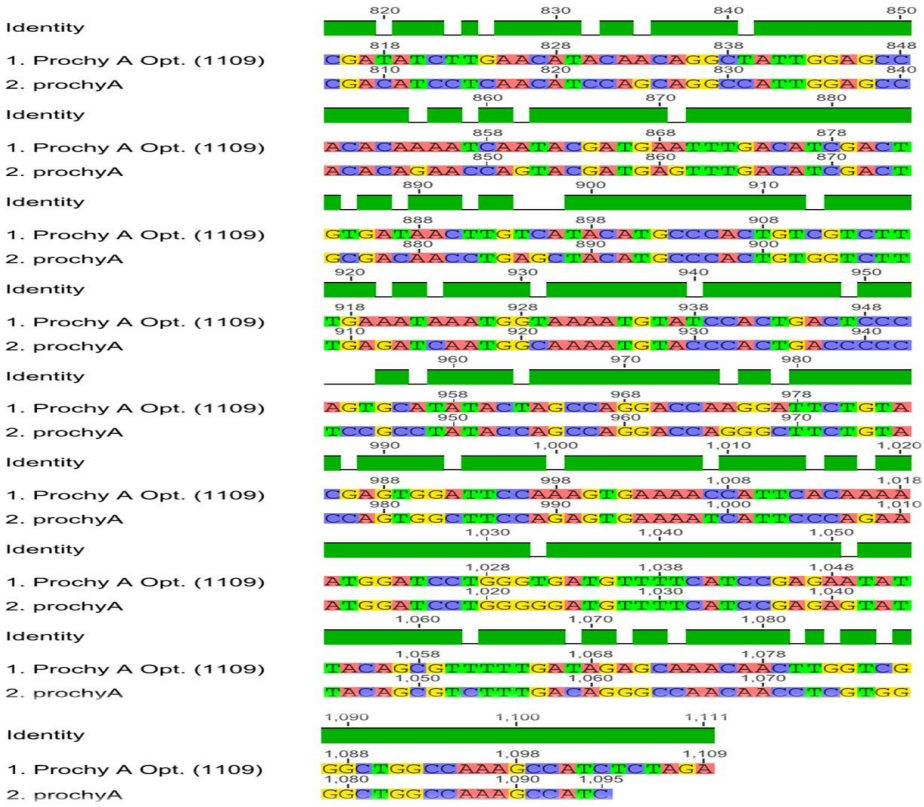


Continued Fig 2

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]



Continued Fig 2



Continued Fig 2

Fig 2 Sequence comparison between the original (prochy A) and the optimized (prochy A -opt) genes

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

Table 2 The Results of chymosin A gene sequence analysis before and after optimization with web based Rare Codon Analysis Report and Codon Adaptation Index Calculator software

CAI		GC content		CFD (The percentage of low frequency (<30%)	
before	after	before	after	before	after
0/59	0/72	57/37	0/43	7%	3%

نتایج حاصل از همردیفی توالی ژن کیموزین A قبل و بعد از بهینه‌سازی کدونی در سایت NCBI نشان داد که توالی ژن بهینه شده حدود ۸۳٪ با توالی ژن اولیه همسانی دارد. همچنین ارزش E (احتمال همردیفی تصادفی توالی‌ها) نیز در بهترین حالت ممکن قرار داشت (جدول ۳)، مقدار همپوشانی توالی مورد نظر با توالی‌های موجود نیز محاسبه گردید [۲٤].

Table 3 The results of alignment of the optimized and non-optimized sequences of the chymosin A gene.

Accession	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max identity
30221	1148	1148	100%	0.0	83%

نرم افزار Graphical Codon Usage Analyzer یک توزیع فراوانی از کدون‌ها را ارائه می‌کند. نتایج حاصل از تجزیه توالی با این نرم افزار نشان داد که پس از بهینه‌سازی، کدون‌های با فراوانی بالا در میزبان هدف بر اساس ترجیح کدونی مخمر *پیچیا پاستوریس* موجود انتخاب گردیده است. به طوری که قبل از بهینه‌سازی ٤١ کدون با فراوانی کمتر از ۱۰٪ در مخمر *پیچیا پاستوریس* وجود داشت که بعد از بهینه‌سازی هیچ کدونی با فراوانی کمتر از ۱۰٪ مشاهده نگردید. کدون‌های نادر با رنگ قرمز در شکل مشخص شده‌اند این نتایج با تحقیقات نژاوند و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد [۲۵] (شکل ۳).

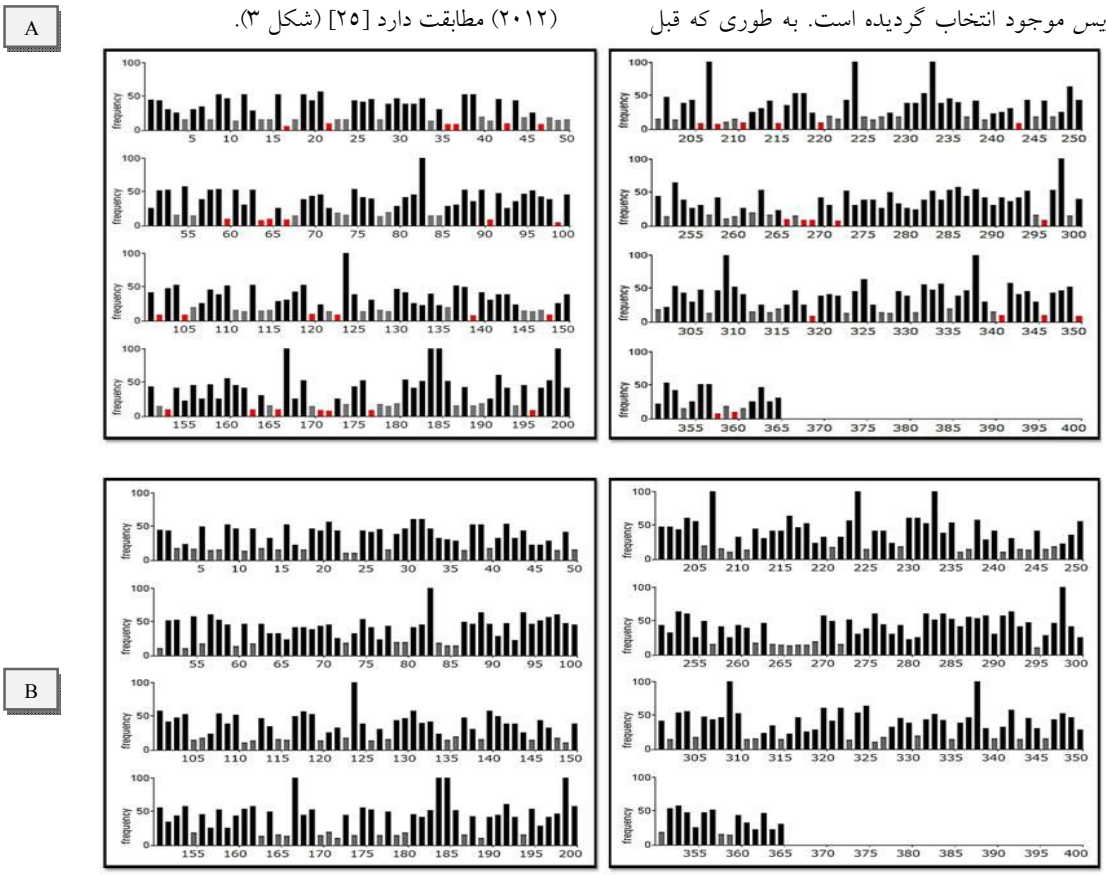


Fig 3 Analysis of codon usage frequency in the optimized and non-optimized sequences of the chymosin A gene by software. A:non-optimized, B; optimized chymosin A gene.Graphical Codon Usage Analyserweb based

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

۳-۲- جداسازی ژن و تکثیر و تایید نوترکیبی ژن کیموزین در وکتور کلونینگ

ژن کیموزین از طریق برش با استفاده از آنزیم *Eco*RI جهت تایید، از وکتور pBHA جدا شد. نتایج ژل آگارز ۰/۸ درصد وجود ژن کیموزین با اندازه حدود ۱۱۰۹ bp را تایید نمود (شکل ٤).

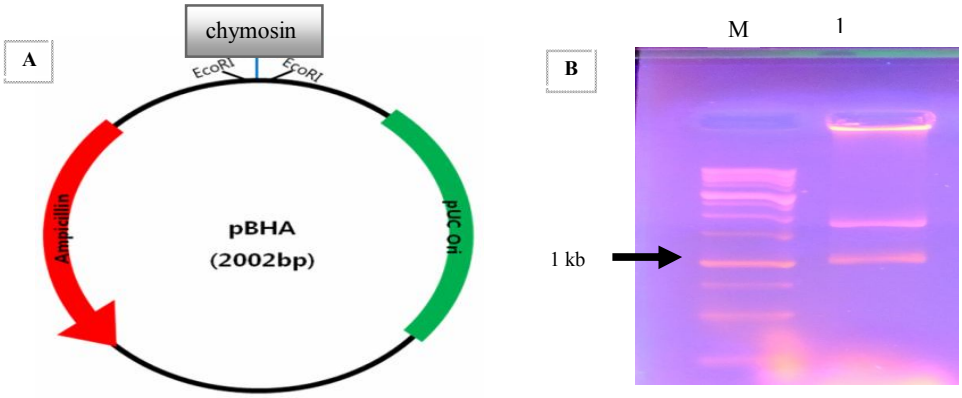


Figure 4. A) The schematic presentation of chymosin A synthetic gene in the pBHA vector (Bioneer). B) Isolation of the synthetic chymosin gene by *Eco*RI restriction enzyme and its fragments with the expected size on agarose gel; lane M: 1 kb DNA Ladder, lane 1**:** pBHA-chymosin vector digested with *Eco*RI enzyme

با توجه به جایگاه‌های برشی موجود در ژن کیموزین و وکتورهای pBHA و pPIC9، امکان همسانه‌سازی مستقیم ژن کیموزین از pBHA به pPIC9 وجود نداشت، بنابراین این ژن ابتدا از وکتور pBHA از طریق T/A کلونینگ در وکتور PTG-19 همسانه گردید. جهت تایید نوترکیبی ژن در وکتور PTG-19، از کلونی PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی ژن کیموزین استفاده شد. نتایج الکتروفورز محصولات کلونی PCR باندی به اندازه ۱۱۰۹ جفت بازی را روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داد که با اندازه‌ی مورد انتظار برای ژن کیموزین مطابقت داشت (شکل ٥).

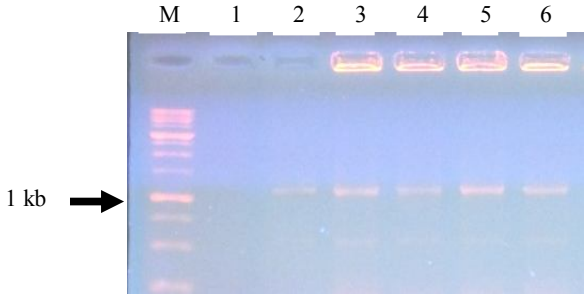


Fig 5 Colony PCR amplification of chymosin A gene in *E. coli* transformed with PTG-chymosin recombinant vector. Lane M: 1 kb DNA Ladder, lane1: negative control, lane 2: positive control. Lanes 3-6: colony PCR of different recombinant colonies with chymosin A specific primers

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

۳-۳- برش و تلخیص پلاسمید pPIC9 و ژن کیموزین از وکتور PTG-19 و اتصال ژن کیموزین با وکتور pPIC9

ژن کیموزین همسانه شده در وکتور PTG-19 و همچنین پلاسمید pPIC9 با استفاده از آنزیم‌های *Eco*RI و *Not*I برش داده شدند و ژن کیموزین و پلاسمید خطی‌شده pPIC9، از روی ژل آگارز خالص سازی گردیدند که نتایج حاصل از الکتروفورز وجود باندهای مورد نظر را تایید نمود (شکل ٦). ژن کیموزین خالص‌سازی شده و پلاسمید pPIC9 در شرایط اتصال قرار گرفته و سپس محصول اتصال به باکتری *اشرشیا کلای* انتقال داده شدند.

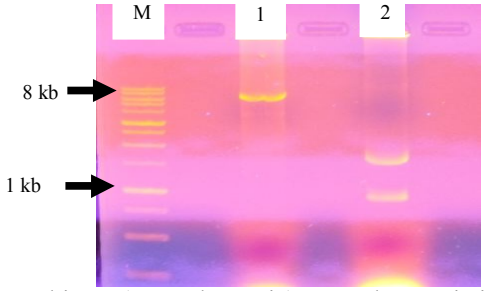


Figure 6. Confirmation of recombinant (PTG-chymosin) vector by restriction enzyme digestion. The plasmids were extracted and digested with *Eco*RI and *Not*I enzymes. Lane M: 1 kb DNA ladder, lane 1: recombinant vector digested with *Eco*RI, lane 2: recombinant vector double- digested with *Eco*RI and *Not*I.

۳-٤- تکثیر و تایید درج ژن کیموزین در وکتور pPIC9 با استفاده کلنی PCR و برش آنزیمی

گزینش کلونی‌های تراریخت شده از طریق کشت در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و غربال کلونی‌های نوترکیب با استفاده کلونی PCR صورت گرفت. کلونی‌های شماره ۱، ۳، ٦، ۸، ۹ و ۱۰ باند مربوط به ژن کیموزین را نشان دادند (شکل ۷). جهت تایید نهایی تراریختی استخراج پلاسمید از کلونی‌های نوترکیب انجام گرفت و با آنزیم *Bam*HI برش داده شد. و نتایج حاصل از ژل آگارز وجود باند مربوط به ژن کیموزین را تایید نمود. با توجه به وجود ۳ جایگاه برشی برای آنزیم *Bam*HI در سازه ژنی، باند مربوط به قطعه برش‌یافته کمی پایین‌تر از محدوده ۱ kb و با اندازه مورد انتظار حدود ۷۵۰ bp قرار گرفت (شکل ۸).

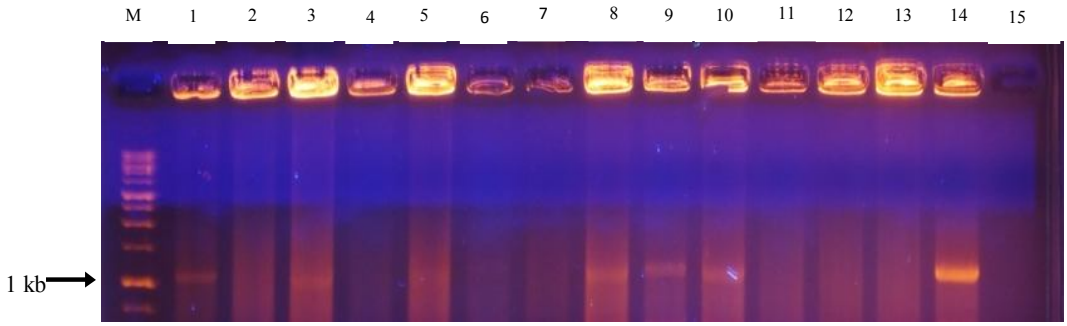


Fig 7 Colony PCR amplification of chymosin A gene in *E. coli* transformed with pPIC9-chymosin recombinant vector. Lane M: 1 kb DNA Ladder, lanes 1-10: colony PCR of different transformed *E. coli* colonies with chymosin A specific primers

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

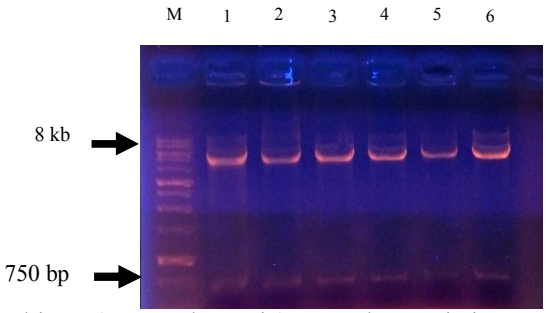


Fig 8 Confirmation of recombinant (pPIC9-chymosin) vector by restriction enzyme digestion. The plasmids were extracted and digested with *Eco*RI and *Not*I enzymes. Lane M: 1 kb DNA ladder, lanes 1-6: recombinant vector digested with *Bam*HI

اولین کاربرد تجاری بیوتکنولوژی کشاورزی تایید شده توسط FDA در سال ۱۹۹۰، توسعه کیموزین نوترکیب مشتق شده از تخمیر بود. امروزه با توجه به توانایی‌های تکنولوژی DNA نوترکیب، ژن عامل تولید کیموزین گاوی درون میکروارگانیسم‌های مشخصی کلون گردیده که این امر توانایی تولید کیموزین نوترکیب به وسیله ی میکروارگانیسم‌های نوترکیب را به ما می دهد [۹]. با توجه به اهمیت بهینه‌سازی توالی ژن، امروزه نرم افزارهای متعددی با قابلیت‌های متفاوت برای این منظور طراحی و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در سال‌های گذشته تحقیقات زیادی با بهره‌گیری از بهینه‌سازی کدون‌ها انجام گرفته است زیرا با بهینه‌سازی کدونی، میزان بیان پروتئین‌ها افزایش می‌یابد. در رابطه با ژن کیموزین که رنین نیز نامیده می‌شود، پژوهش‌هایی در این راستا صورت گرفته است. در پژوهشی کاردوزا و همکاران (۲۰۰۳)، آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی کپی ژن کیموزین گاوی بهینه‌سازی شده بر اساس کدون‌های ترجیحی *آسپرژیلوس آواموری* طراحی کردند. به منظور بررسی توانایی این قارچ‌های رشته‌ای برای ترشح پروکیموزین گاوی دو پلاسمید ساخته شد. سنجش ایمونولوژیکی نشان داد که مقدار کیموزین زیادی پس از بهینه‌سازی به محیط خارج سلولی ترشح شد[۲۶]. بدیعی‌فر و همکاران (۲۰۰۹)، در مطالعه خود یک گونه پروکیموزین پیرایش شده فاقد اگزون ٦ را در *اشرشیا کلای* همسانه‌سازی و بیان نمودند. بیان ژن مورد نظر با تغییر پارامترهای مختلف بهینه‌سازی گردید. حداکثر مقدار پروتئین بیان شده توسط این روش ٤١/٦٦٪ از کل پروتئین سلولی بود [۲۷]. اولسو و گوکس (۲۰۱۲)، در پژوهش خود کیموزین گاوی را بهینه‌سازی کرده و درسیستم *E.coli pTOLT* همسانه نمودند. قطعه DNA کدکننده کیموزین گاوی با استفاده از دو الیگونوکلئوتید تکثیر شد [۲۸]. نوسدا و همکاران (۲۰۱۳)، در تحقیقات خود توالی کدونی ژن پروکیموزین B گاوی، که تحت پروموتر الکل اکسیداز۱ (AOX1) بود را بهینه‌سازی کرده و در وکتور pPIC9k همسانه نمودند و سپس به ژنوم مخمر متیلوتروفیک *پیچیاپاستوریس GS115* انتقال دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که *پیچیاپاستوریس* یک سیستم بیانی مناسب برای رآکتور، براساس فرایند تخمیر fed-batch به منظور تولید کارآمد کیموزین نوترکیب گاوی تحت کنترل پروموتر القائی AOX1 است [۱۲]. لو و همکاران (۲۰۱٦)، در پژوهشی ژن کیموزین گاومیش را به مخمر *پیچیا پاستوریس* سویه X33 انتقال و بیان نمودند. آن‌ها ژن پری‌پروکیموزین، پروکیموزین و کیموزین را با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از RNA کل گاومیش شیرخوار را استخراج کرده و الگوی بیان آن را با استفاده از Real -PCR timeبررسی کردند. این ژن در وکتور pPICZαA همسانه شد و هر سه فرم شکل فعال کیموزین نوترکیب را نشان دادند [۲۹]. اسپینوزا مولینا و همکاران (۲۰۱٦) توالی ژن کیموزین را پس از بهینه‌سازی در وکتور pPICZαA همسانه و در مخمر پیچیا پاستوریس سویه KM71H بیان نمودند. در مطالعه آن‌ها ۲۸۹ نوکلئوتید از ۳۳۲ نوکلئوتید کل پس از بهینه‌سازی تغییر یافت [۳۰].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

٤- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اهمیت ژن رنین در صنایع غذایی و محدودیت‌های استفاده از منابع حیوانی، میکروبی و گیاهی، با تولید نوترکیب آن می‌توان بر مشکلات تولید این آنزیم اقتصادی غلبه کرد. در این پژوهش توالی ژن کیموزین A گاوی بر اساس کدون‌های ترجیحی مخمر *پیچیا پاستوریس* بهینه‌سازی و سنتز گردید. ژن سنتز شده با موفقیت در وکتور pPIC9 که یک وکتور بیانی مخمر *P.pastoris* تحت کنترل پروموتور و ترمیناتور AOX 1 است، همسانه گردید. با توجه به اینکه کارایی مخمر *P.pastoris* به عنوان یک سیستم یوکاریوتی مناسب جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و با توجه به نیاز صنایع لبنی کشور برای تولید رنین مورد نیاز و ضرورت خودکفایی کشور برای تولید رنین مورد نیاز، انتقال و بیان این سازه ژنی آماده شده در مخمر پتانسیل بسیار مناسبی را برای تولید و فراهم کردن رنین مورد نیاز کشور فراهم می‌کند. لازم به ذکر است ژن کیموزین A در وکتور pPIC9 به صورت ادغام با فاکتور ترشحی α-factor بیان می‌شود که به راحتی می‌توان آن را از محیط کشت مخمر خالص‌سازی نمود.

٥- منابع

[1] Attallah, A.G. 2007. Characters of Chymosin gene isolated from different animal sources at molecular level. *Journal of applied sciences research*, (3): 904-907.

[2] Foltman, B. 1993. General and molecular aspects of rennets. In: Fox PF, Editor. Cheese: *Chemistry, Physics and Microbiology*, (1): 37-68.

[3] Chitpinityol, S., and Crabbe, M. J. C. 1998. Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61(4): 395-418.

[4] Çelik, E., & Çalık, P. 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology advances*, 30(5): 1108-8111.

[5] Egito, A., Girardet, J.M., Laguna, L., Poirson, C., Molle, D., Miclo, L., Humbert, G., & Gaillard, J. L. 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine K-casein. *International Dairy Journal*, 17(7): 816-825.

[6] Esteves, C. L., Lucey, J. A. and Pires, E. M. 2002. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and Chymosin. *International Dairy Journal*, 12(5): 427-434.

[7] Vishwanta, K.S., Rao, A.G.A. and Singh, S.A. 2010. Production and characterization of milk-clotting enzyme from Asperigillus oryzae MTCC 5341. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, 85(6): 1849-1859.

[8] Ahmed, S., & Helmy, W. 2012. Comparative evaluation of *Bacillus licheniformis* 5A5 and *Aloe variegata* milk-clotting enzymes. *Brazilian Journal of Chemical Engineering, 29*(1): 69-76.

[9] Demain, A. L., & Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances,* 27(3): 297-306.

[10] Hellmuth, K. 2006. Industrial scale production of Chymosin with Aspergillus niger. *Microbial Cell Factories*, 5(1): s31.

[11] Starovoitova, V., Velichko, T., Baratova, L., Filippova, I. Y., & Lavrenova, G. 2006. A comparative study of functional properties of calf Chymosin and its recombinant forms. *Biochemistry (Moscow)*, 71(3): 320-423.

[12] Noseda, D.G., Recúpero, M.N., Blasco, M., Ortiz, G.E., and Galvagno, M.A. 2013. Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine Chymosin B in Pichia (Komagataella) pastoris under AOX1 promoter. *Protein expression and purification*, 92(2): 235-244.

[13] Repelius, K. 1998. Coagulants produced by fermentation technology.Aust. *Journal of Dairy Technology*, (53):124.

[14] Wei, Z.Y., Zhang, Y.Y., Wang, Y.P., Fan, M.X., Zhong, X.F., Xu, N., Lin, F. and Xing, S.C. 2016. Production of Bioactive Recombinant Bovine Chymosin in Tobacco Plants. *International journal of molecular sciences*, *17*(5): 624.

[15] Kumar, A., Grover, S., Sharma, J., Batish, V.K. 2010. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4): 243–258.

[16] El-Sohaimy, S.A. and El-Saadani, M.A. 2010. Cloning and In Vitro-Transcription of Chymosin Gene in E. coli. *The Open Nutraceuticals Journal*, 3(1): 63-68.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

2012. Expression and characterization of bacterial organophosphorus hydrolase in Pichia pastoris with the intent to degrade organophosphate neurotoxins. Modares journal of medical sciences (pathobiology), 15: 61-72.

[26] Cardoza, R.E., Gutiérrez, S., Ortega, N., Colina, A., Casqueiro, J. and Martín, J.F. 2003. Expression of a synthetic copy of the bovine Chymosin gene in Aspergillus awamori from constitutive and pH□regulated promoters and secretion using two different pre□pro sequences. Biotechnology and bioengineering, 83(3): 249-259.

[27] Badiefar, L. Ahmadian, G. Asgarani, E. GhandilI, S. Salek Esfahani, M. Khodabandeh, M. 2009. Optimization of conditions for expression and activation of a splice variant of proChymosin lacking exon 6 in Escherichia coli. *International Journal of Dairy Technology*, (62): 265-271.

[28] Ulusu, Y. Gokce, I. 2012. Codon Optimization and Cloning of Bovine Chymosin Gene into Ptolt Expression Plasmid of Escherichia coli. *Journal of New Results in Science*, 1(1).

[29] Luo, F., Jiang, W.H., Yang, Y.X., Li, J. and Jiang, M.F. 2016. Cloning and Expression of Yak Active Chymosin in Pichia pastoris. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, *29*(9): 1363.

[30] Espinoza-Molina, J.A., Acosta-Muñiz, C.H., Sepulveda, D.R., Zamudio-Flores, P.B. and Rios-Velasco, C. 2016. Codon Optimization of the "Bos Taurus Chymosin" Gene for the Production of Recombinant Chymosin in Pichia pastoris. *Molecular biotechnology*, *58*(10): 657-664.

[17] Menzella, H. G. 2011. Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. M*icrobial Cell Factories*, 10(1): 15.

[18] Baev, D. Lil, X.W. Edgerton, M. 2001. Genetically engineered human salivary histatin genesare functional in Candida albicans: development of a new system for studying histatincandidacidal activity. *Microbiology Society Journals-Microbiology*, (147): 3323-3334.

[19] Chin J. X. Chung, B.K.S. Lee, D.Y. 2014. Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design. *Bioinformatics*, 30(15): 2210-2212.

[20] www.snapgene.com/.

[21] Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. third. *Cold pring Harbor Laboratory Press, New York*.

[22] Gupta, S. and Joshi, L. 2003. Codon optimization. *Computational Bioscience. Arizona State University*.

[23] Ahmadpour, F., Yakhchali, B., Fatemi, S.S.A., Karkhane, A.A. and Talebi, S. 2016. Cloning and Expression of an Indigenous Mesophile lipase and Evaluation of Bacillus Codon Translation in Pichia Pastoris under Control of Two Different Promoters. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, *3*(2): 413-418.

[24] Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, *7*(1-2): 203-214.

[25] Najavand, S., Sahebghadam, L.A., Mohsenifar, A., Arjmand, S. and Mota, A.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]

Optimization of calf rennin gene and construction of gene construct for the recombinant chymosin production in *Pichia pastoris*

Mohebzadeh, S. [1], Zare, N. [2*], Asghari Zakaria, R. [2], Fathi Achachlouei, B. [3]

1. M.Sc Graduated, Agricultural Engineering Biotechnology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

(Received: 2018/01/01 Accepted: 2018/08/26)

Animal chymosin due to the high quality of cheese texture and flavor is the most effective enzyme for cheese production. Due to the increasing demand for this enzyme, in addition to the plant and microbial sources, recombinant sources should be considered for chymosin production. In this study, in order to produce recombinant chymosin, as well as improving the expression of bovine chymosin gene in yeast, the sequence of the chymosin A gene was optimized and synthesized based on the codon usage of the *Pichia pastoris* and was cloned in an appropriate expression vector. The codon adaptation index (CAI) increased from 0.59 to 0.72 after codon optimization. There were 41 yeast rare codons (with frequency of less than 10%) in the bovine chymosin A gene, whereas no rare codons in the codon optimized sequence. In order to transfer the resynthesized chymosin A gene to the yeast expression vector pPIC9, this gene was proliferated using the specific primers and was cloned in the PTG-19 vector. Recombinant (PTG19-chymA) colonies were selected by the screening of white-blue colonies method. The resynthesized chymosin A gene was then cut from PTG19-chymA vector using the restriction enzymes *Not*I and *Eco*RI, cloned into the pPIC9 vector and was transformed into DH5α strain of *E. coli*. Colonies containing recombinant vector (pPIC9-chymA) were identified and selected using colony-PCR technique. The recombinant nature and correct insertion of resynthesized chymosin A gene in the yeast expression vector pPIC9 were confirmed by plasmid extraction and its digestion with *Bam*HI enzyme.

Key words: Recombinant chymosin, Gene cloning, Milk- clotting enzymes

* Corresponding Author E-Mail Address: zaren@uma.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-08-02]