ساخت ناقل بیانی pFUM003 دارای خاصیت ترشح خارج سلولی

بهاره پاک‌باطن (M.Sc)، رضا مجیدزاده هروی*(Ph.D)، حسن کرمانشاهی (Ph.D)، محمدهادی سخاوتی (Ph.D)، علی جوادمنش (Ph.D)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که در طی قرن‌ها در بهبود مواد غذایی و هم‌چنین ارتقاء سلامت استفاده می‌شوند. امروزه پروبیوتیک‌های نوترکیب به‌عنوان وسیله انتقال برای بیان و انتقال هدفمند مولکول‌های بومی یا نوترکیب به سطوح مخاطی دستگاه گوارش در تغذیه و سلامت استفاده می‌شوند. لاکتوکوکوس لاکتیس یک کاندیدای بالقوه برای تولید پروتئین‌های زیستی مفید است. ازآن‌جا که برای این باکتری ناقل مناسبی که دارای توالی سیگنال برای ترشح خارج سلولی باشد وجود ندارد لذا هدف ما از این مطالعه افزایش راندمان بیان پروتئین‌های نوترکیب در خارج از سلول با استفاده از واردکردن توالی سیگنال پپتید usp45 به ناقل پلاسمیدی pBU003 است.

مواد و روش‌ها: usp45 سیگنال پپتیدی دارای ۸۱ باز است که در مطالعات زیادی به‌عنوان افزایش‌دهنده بیان نیز معرفی شده است. در این مطالعه توالی سیگنال usp45 ساخته شد و سپس با استفاده از واکنش لیگاسیون به پلاسمید pBU003 انتقال یافت. پس از آن به باکتری اشریشیاکلی سویه MC1061 منتقل شد. پلاسمید نوترکیب به pFUM003 نام‌گذاری شد.

یافته‌ها: تعیین توالی پلاسمید حاوی usp45 نشان داد که دارای ساختار پلاسمیدی و توالی سیگنال صحیح است و تطابق کامل با توالی‌های الگو (EU382094.1) گزارش شده در بانک ژنی NCBI دارد.

نتیجه‌گیری: پلاسمید نوترکیب ساخته شده به pFUM003 نام‌گذاری شد. این پلاسمید نوترکیب به لحاظ ساختاری صحیح و جهت انتقال به پروبیوتیک‌ها مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توالی سیگنال، وکتورهای ژنتیکی، *لاکتوکوکوس لاکتیس*

مقدمه

امروزه نقش پروبیوتیک‌ها برای همگان مشخص است. سازمان خواروبار جهانی (فائو) تعریفی به این مضمون دارد که پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی به مقدار کافی مصرف می‌شود باعث حفظ سلامتی میزبان می‌شود که در این تعریف تمام ویژگی‌های یک باکتری پروبیوتیک ذکر شده است [۲،۱]. انواع باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل گونه‌های لاکتوباسیلوس، گونه‌های بیفیدوباکتریوم، گونه‌های انتروکوکوس فاسیوم، لاکتوکوکوس لاکتیس، لوکونوستوک مزانتروئیدس، پدیوکوکوس اسیدیلاکتی، استرپتوکوکوس ترموفیلوس از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشند. باکتری‌های اسیدلاکتیک توانایی تولید اسیدلاکتیک از قندها در طی مرحله تخمیر را دارند [۳]. سویه‌های لاکتوکوکوس از تولیدکننده‌های اسیدلاکتیک می‌باشند که در شیرترش وجود دارند و چندین سویه از آن‌ها پروبیوتیک می‌باشند. از این میان لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل داشتن مزایایی از قبیل

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۷۴ Email: rmajidzadeh@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۳

تولید باکتریوسین نایسین (Nisin) مورد توجه در درمان بیماری‌هایی از قبیل ناراحتی‌های روده‌ای و متعادل‌کننده میکروفلور روده است [۴]. نایسین، پپتید ضد میکروبی طبیعی که توسط سویه‌هایی از لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود و به‌طور مؤثر باعث مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و تا حدودی گرم منفی می‌شود. علاوه بر آن به‌عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی و عامل بالقوه ضد میکروبی در داروسازی، دامپزشکی و محصولات بهداشتی کاربرد دارد. نایسین با ایجاد شکاف‌هایی در غشاء پلاسمایی، باعث از بین رفتن باکتری‌ها می‌شود [۵]. هم‌چنین لاکتوکوکوس لاکتیس قادر به بیان پروتئین‌هایی با وزن بین ۱۰ تا ۱۶۰ کیلودالتون می‌باشد [۶]. پلاسمید pBU003 استفاده شده در این مطالعه که در لاکتوکوکوس لاکتیس بیان می‌گردد فاقد توانایی ترشح پروتئین به خارج از سلول است. پلاسمید مذکور از جایگزین کردن جایگاه کلونینگ پلاسمید pPET21(b+) در پلاسمید pNZ3004ساخته شده است [۷]. pNZ3004 از جایگزین کردن یک قطعه bp512 که شامل پروموتور و توالی سیگنال لاکتاز A است در پلاسمید PGKV210 در جایگاه Sal I-EcoR I ساخته شده است. پلاسمید PGKV210 خود از تلفیق pWVO1 وcop-6 pE194 که حامل ژن مقاوم به اریترومایسین است و سایت کلونینگ پلاسمید M13mp11 و در نهایت بخشی از پلاسمید pPL603 که حامل ژن مقاوم به کلرامفنیکل است ساخته شده [۸] که قدرت تکثیر در باکتری‌های گرم مثبت و بعضی از سویه‌های اشرشیاکلی را دارند و مکانیسم تکثیر آن‌ها به‌صورت کپی‌برداری دایره‌ای (Rolling circle replication) است [۹].

منشأ پلاسمید pBU003 لاکتوکوکوس لاکتیس بوده لذا مشکلات مربوط به تجزیه توسط نوکلئازهای سلولی را در لاکتوکوکوس و هم‌چنین لاکتوباسیل‌ها را ندارد.

یکی از مشکلاتی که در وکتور pBU003 وجود دارد این است که پروتئین تولید شده از طریق این پلاسمید قادر به انتقال به خارج سلول نیست و این مشکل از آن‌جا ناشی می‌شود که سیگنال پپتیدی برای این پلاسمید طراحی نشده است. از آن‌جا که هدف از تولید یک پروبیوتیک نوترکیب می‌تواند ترشح یک آنزیم یا یک آنتی‌ژن در محیط دستگاه گوارش باشد، توانایی ترشح خارج سلولی اهمیت زیادی پیدا می‌کند. در موارد فوق پروتئین نوترکیب باید به خارج سلول هدایت گردد تا اثربخش باشد؛ بنابراین به نظر می‌رسد با قرارگیری یک سیگنال پپتید که قادر به انتقال پروتئین نوترکیب به خارج از سلول میزبان باشد بتوان کارایی پروتئین نوترکیب را افزایش داد. برای حل این مشکل از پروتئین هدایت‌کننده usp45 استفاده شد که هم‌زمان باعث افزایش بیان و نیز ترشح خارج سلولی می‌شود [۴]. در مطالعات انجام شده نشان داده شد که از میان چندین پروتئین هدایت‌کننده (Signal peptide) وکتورهای دارای پروتئین هدایت‌کننده‌ی usp45 قابل استفاده در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس است و هم‌چنین موجب ترشح خارج سلولی پروتئین مورد نظر می‌شود [۱۲،۱۱،۱۰].

لوئرسی و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که usp45 یکی از معدود سیگنال پپتیدهای مخصوص لاکتوکوکوس لاکتیس است و تنها سیگنال پپتیدی است که پروتئین را به مقدار کافی در ژل رنگ‌آمیزی شده با کوماسی بلو شناسایی می‌کند [۱۳].

شیگموری و همکاران (۲۰۱۴) نیز از سیگنال پپتیدusp45 در pNZ8148 استفاده و بیان بالایی را مشاهده کردند [۱۴].

بررو و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که استفاده از usp45 به‌عنوان سیگنال پپتید در وکتور بیانی توانسته تا بیان لاکتاسین A کلون شده در وکتور مزبور را در لاکتوکوکوس لاکتیس افزایش و هم‌چنین بیان خارج سلول پروتئین را تایید کردند [۴].

نیف و همکاران (۲۰۱۵) با جایگزین کردن سیگنال پپتید usp45 در پلاسمیدهای pNG4110, pNG4111 و pNG4210موفق به ساخت وکتوری با قابلیت ترشح خارج سلولی شدند و گزارش کردند وکتورهای حاضر در ترکیب با لاکتوکوکوس لاکتیس ابزار قدرتمندی در زمینه بیان، خالص‌سازی و ترشح خارج سلولی در باکتری‌ها است [۱۵].

در مطالعه‌ای دو سیگنال پپتید P (EntP) و hiracin JM79 (HirJM79) با سیگنال پپتید usp45 در داخل وکتور بیانی pNZ8048 جایگزین شد که بهبود شش برابری بیان باکتریوسین و در نتیجه فعالیت ضد میکروبی برای لاکتوکوکوس لاکتیس با ورود سیگنال پپتید usp45 به‌جای P و بهبود نزدیک به دو برابری در عمل‌کرد ضد میکروبی لاکتوکوکوس لاکتیس هنگامی‌که usp45 جایگزین سیگنال پپتید HirJM79 نشان داده شد [۱۱].

در مطالعه‌ای دیگر ترشح پروتئین بین دو سیگنال پپتید Nuc signal peptide (SPNuc) و usp45 (SPUsp) مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج حاصل بهبود چشمگیری در عمل‌کرد سیگنال پپتید usp45 (SPUsp) در مقابل Nuc signal peptide (SPNuc) را نشان داد [۱۲].

از آن‌جا که پلاسمیدهای قابل بیان در باکتری‌های لاکتیک اسید مثل pNZ8148، pNZ8149 و pNZ8008 فاقد قابلیت انتقال پروتئین به خارج از سلول هستند و دو نمونه پلاسمید با قابلیت ترشح خارج سلولی (pNZ8123, pNZ8124) از پلاسمیدهایی با منشاء pSH71 بوده که نسبت به نوکلئازهای سلولی حساس بوده و پایداری مناسبی ندارند لذا دست‌ورزی این پلاسمیدها در آزمایشگاه به دلیل این حساسیت همواره با مشکلات همراه بوده است در مطالعه حاضر سعی شده تا با ساخت یک پلاسمید بیانی با امکان ترشح خارج سلولی پروتئین در لاکتوکوکوس لاکتیس، امکان تولید پروتئین نوترکیب در باکتری‌های اسید لاکتیک فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

باکتری و پلاسمیدهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

توالی سیگنال usp45 با شماره ژن بانک EU382094.1 که اندازه آن 81bp بود برای سنتز به‌صورت دو زنجیره جداگانه پیرو و پیشرو به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. دو جایگاه آنزیمی Sal I و Xho I در دو انتهای توالی سیگنال نیز طراحی شد. توالی سیگنال سنتز شده به میزان ۱۰۰pmol/µl رقیق گردید و سپس زنجیره پیرو و پیشرو به نسبت مساوی با بافر R (شرکت– Thermo شماره کاتالوگBR5) مخلوط شد و مطابق برنامه زیر داخل ترموسایکلر (T-Personal Germany) قرار گرفت: ۱ دقیقه ۹۵°C، ۳۰ ثانیه ۸۰°C، ۳۰ ثانیه ۷۰°C، ۳۰ ثانیه ۵۰°C، ۳۰ ثانیه ۲۵°C این روش (Annealed Oligo Cloning) زنجیره پیرو و پیشرو را به هم جفت می‌کند [۱۵]. سپس این مخلوط به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق گردید و با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای usp45 تحت PCR قرار گرفت پرایمر رفت شامل ACAGTCGACCATGAAAAAAAAGATTATC دارای جایگاه آنزیمی Sal I و پرایمر برگشت شامل ATCTCTCGAGAGCGTAAACACCTGACA دارای جایگاه آنزیمی Xho I می‌باشد. مراحل اول واکنش با ۹۴° C در ۱۰ دقیقه شروع و با ۳۵ سیکل شامل۹۴° C در ۳۰ ثانیه ۵۹°C در ۳۰ ثانیه ۷۲° C در ۳۰ ثانیه و با ۵ دقیقه در۷۲° C خاتمه یافت. محصول واکنش روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

برش آنزیمی: در ادامه برش آنزیمی پلاسمید و قطعه Usp45با آنزیم‌های Sal I و Xho I انجام گرفت و صحت قطعات برش خورده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ تایید شد.

لیگاسیون: پس از استخراج پلاسمید برش‌خورده از ژل، واکنش لایگیشن پلاسمید و قطعه به‌وسیله آنزیم T4 DNA ligas (شرکت – Thermo شماره کاتالوگ EL0014) انجام شد.

ترانسفورماسیون: محصول لایگیشن به اشرشیاکلی سویه MC1061 به روش سمبروک و همکاران (۲۰۰۱) ترانسفرم گردید [۱۷] و سپس جهت انتخاب کلنی مناسب به محیط کشت حاوی اریترومایسین (۴۰۰ µg/µl) منتقل شد. بعد از ۱۶ ساعت کلنی‌ها روی محیط پدیدار شدند. جهت شناسایی کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب، ۱۲کلنی انتخاب و به محیط جامد حاوی اریترومایسین منتقل گردید.

Colony PCR: به دلیل ماهیت پلاسمید مورد نظر امکان استفاده از روش‌های معمول هم‌چون روش القا و انتخاب کلنی‌های آبی و سفید وجود نداشت لذا جهت انتخاب باکتری نوترکیب مناسب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پلاسمید، کلنی PCR بر روی ۱۲ کلنی‌های انجام گرفت. سپس محصول PCR به لحاظ طول قطعه روی ژل آگارز ۱٪ کنترل گردید. ۴ کلنی از ۱۲ کلنی تایید شد و به‌منظور استخراج پلاسمید نوترکیب به محیط مایع حاوی اریترومایسین منتقل شدند. باکتری‌های کشت شده در محیط مایع بعد از ۱۸ ساعت رشد کرده و بلافاصله استخراج پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید (شرکت Thermo- شماره کاتالوگ K0502) از آن انجام شد.

آنالیز آنزیمی: جهت تایید وجود قطعه جایگزین در پلاسمید مورد نظر، برش آنزیمی توسط آنزیم‌های Xho I و Sal I انجام گرفت و صحت واکنش با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ تعیین گردید.

تعیین توالی: برای تایید صحت توالی قطعه داخل وکتور، تعیین توالی به روش سنگر (شرکت Bioneer کره جنوبی) انجام شد. نتیجه تعیین توالی با استفاده از رویه BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) بررسی شد.

جدول۱. باکتری و پلاسمید های استفاده شد در این مطالعه

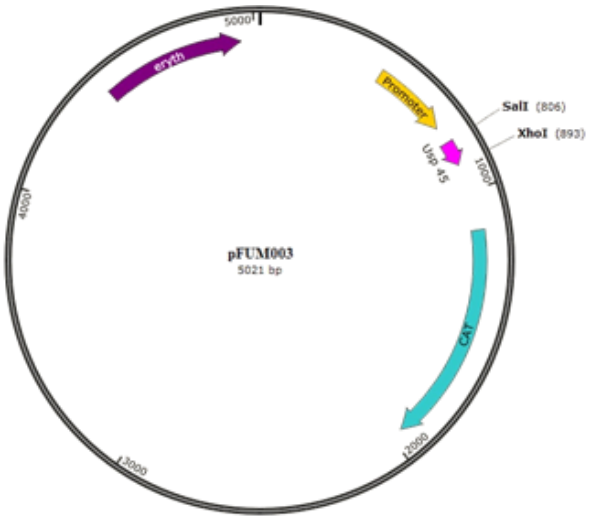
باکتری ها و پلاسمیدها		ویژگی ها	منبع
باکتری	*Escherichia coli* MC1061	araD139, Δ(ara, leu)7697, ΔlacX74, galU, galK, hsr, hsm+, strA	MoBiTec GmbH, Germany
پلاسمید	pbu003	$Cm^r Em^r$; *Escherichia coli-lactobacillus* shuttle vector; 4.947 kb	منتشر نشده
	pFUM003	$Cm^r Em^r$; pBU003 containing Usp45; 5.028 kb	در این مطالعه

نتایج

در این مطالعه به‌جای ساخت یک‌پارچه قطعه usp45 که بسیار هزینه‌بر بود از روش معمول اتصال زنجیره پیرو و پیشرو استفاده شد که هزینه‌ها حدود ۶ برابر کاهش پیدا کرد. در روش کلونینگ الیگومرهای مکمل شده قطعه مورد نظر به‌صورت دو قطعه پیرو و پیشرو طراحی و سپس با توجه به مکمل بودن دو قطعه به هم متصل شدند. جایگزینی قطعه usp45 به‌صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شد.

الکتروفورز قطعه مکمل شده usp45 روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه به طول ۸۱ جفت باز، به‌خوبی جفت شده است (شکل ۲). سپس هضم آنزیمی قطعه usp45 با Sal I و Xho I انجام شد.

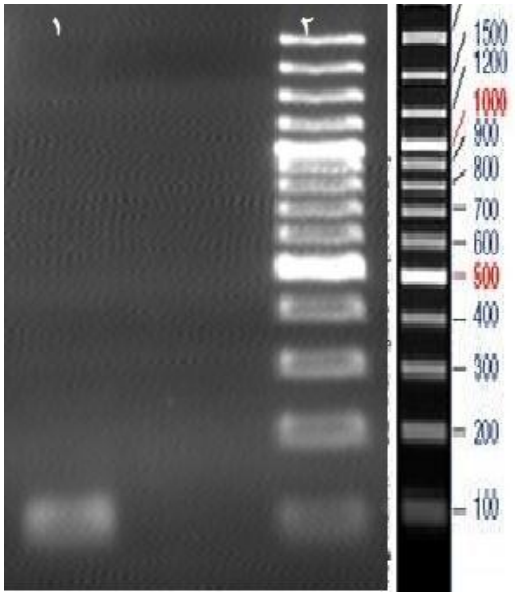
هضم آنزیمی پلاسمید pBU003 با Sal I و Xho I بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده و تایید شد (شکل ۳ الف). وزن مولکولی پلاسمید برش خورده برابر با 4950 bp می‌باشد و غلظتی برابر با ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر برای آن تعیین شد.



شکل ۱. محل قرار گیری سایت کلونینگ usp45 (فلش صورتی) و ساخت پلاسمید نوترکیب

سپس واکنش لیگاسیون برای اتصال قطعه usp45 و پلاسمید برش خورده انجام گرفت. پس از ترانسفرم، از کلنی‌های رشدیافته ۱۲ کلنی انتخاب شده و با روش Colony

PCR بررسی گردید. از میان کلنی‌های مثبت ۴ کلنی انتخاب و پس از کشت شبانه در دمای ۳۷ درجه استخراج پلاسمید شد.



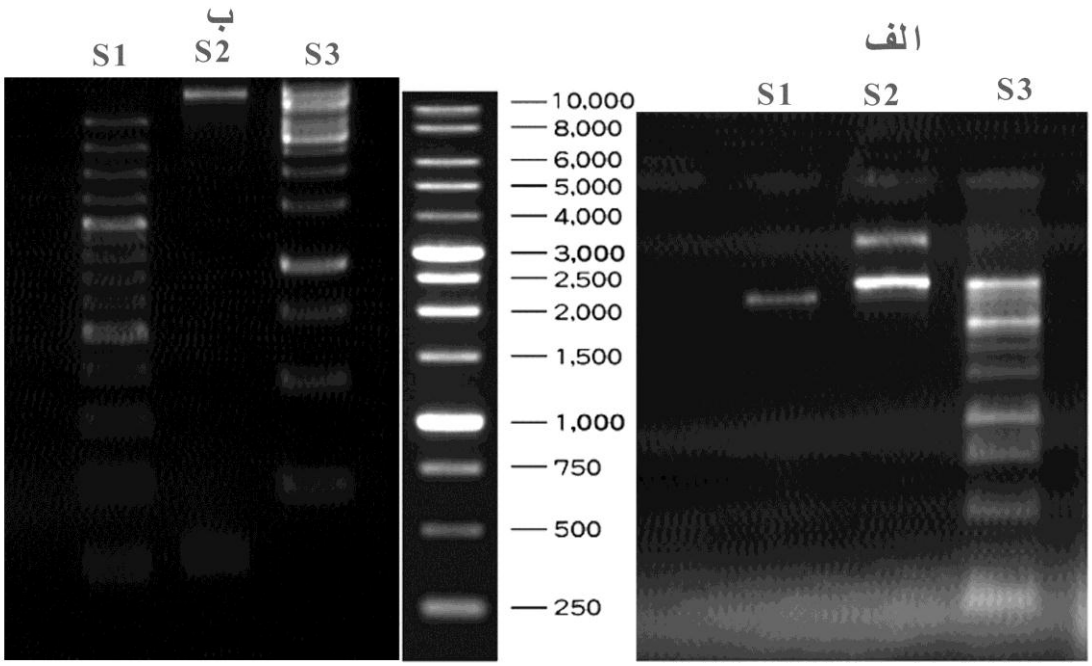
شکل ۲. نتیجه مکمل کردن قطعات پیرو و پیشرو 81bp بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: قطعه usp45. ستون ۲: نشانگر وزنی 100 bp

الکتروفورز پلاسمیدهای تخلیص شده بر روی ژل آگـارز ۱٪ نشان داد که هر چهار پلاسمید سایز یکسان و مورد انتظار را داشتند.

در آنالیز آنزیمی جهت تایید انتقـال ژن usp45 برشـی در ناحیه Sal I و Xho I انجام شد که منجر به خروج قطعه کلون شده از پلاسمید pBU003 شد که می‌تواند شاهدی بر صـحت انتقال توالی سیگنال usp45 باشد (شکل ۳- ب).

قطعه جایگزین شده تعیین توالی گردید. نتیجه تعیین توالی با استفاده از برنامه n-blast (vr XML2) جهت تطـابق بـا ژن usp45 گزارش شده به شماره EU382094.1 در بانـک ژنـی بررسی شد و ۱۰۰٪ هم‌پوشانی نشان داد.

پس از اثبات انتقال قطعه جدید در پلاسمید pBU003 نام آن به pFUM003 تغییـر یافـت (FUM برگرفتـه از دانشـگاه فردوسی مشهد است که محل انجام آزمایش است).



شکل ۳: الف: هضم آنزیمی pbu003 در ناحیه Sal I-Xho I ستون S3: نشانگر وزنی 1kb ستون S2: پلاسمید برش نخورده ستون S1: پلاسمید برش خورده با Sal I و Xho I . ب: هضم آنزیمی با Sal I-Xho I برای خروج قطعه usp45 ستون S3: نشانگر وزنی 1kb. ستون S2: پلاسمید هضم شده ستون S1: نشانگر وزنی 100bp

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه انتقال سیگنال سکونس usp45 در پلاسمید pBU003 با موفقیت انجام شد که بر اساس مطالعات گذشته پیش‌بینی می‌شود افزودن usp45 به این پلاسمید باعث افزایش بیان و هم‌چنین افزایش ترشح خارج سلولی پروتئین‌های نوترکیب در آزمایشات بیان پروتئین شود [۱۸،۱۲،۱۱]. در نتایج به‌دست آمده حاصل از مقایسه سیگنال پپتیدهای مختلف از قبیل SpNuc usp45, SP310, و E7 در باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس مشخص شد که usp45 دارای بهترین بازده برای ترشح پروتئین می‌باشد [۶].

این مطالعه یک گام بنیادین برای بهبود بیان پروتئین در تحقیقات مربوط به تولید پروبیوتیک‌های نوترکیب است به‌طوریکه این پلاسمید احتمالاً سلول را قادر به ترشح خارج سلول خواهد کرد که یکی از اهداف ساخت این نوع پروبیوتیک‌ها است. پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات بعدی کارآیی پلاسمید ساخته شده در ترشح خارج سلولی پروتئین بیان شده، با پلاسمید فاقد توالی سیگنال و پلاسمیدهایی با توالی سیگنال غیر از usp45 مقایسه گردد که توسط نویسندگان در حال انجام می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بخاطر حمایتهای مالی از طرح و همچنین از مدیریت آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد بخاطر همکاری صمیمانه کمال تشکر و سپاسگذاری را دارند.

منابع

[1] Craford JS. Probiotic in animal nutrition. Proceeding of Arcansas Nutrition Conference 1979; PP;45-55

[2] Afshar Mazandaran N, Rajab A. Probiotics and their application in animal nutrition. Noorbakhsh publish 2002. (Persian).

[3] Deirde PL, Elke KA. The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity myocotoxins and gushig: A Review. J Inst Brew 2004; 110: 163-180.

[4] Borerro J, jimenez J. Protein expression vector and secretion signal peptide optimization to drive the production, secretion, and functional expression of the bacteriocin enterocin A in lactic acid bacteria. J Biotenol 2011; 156: 76-86.

[5] Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. J Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 705-717.

[6] Le Loire Y, Azevedo V, Oliveira S, Freitas A, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán A, et al. Protein secretion in Lactococcus lactis : an efficient way to increase the overall heterologous protein production, 2005. Microbiol Cell Factories 2005, 4: 2.

[7] Majidzadeh R. Investigate the possibility of producing recombinant probiotic strains with the ability to degradation plant phytate in broiler chickens [dissertation]. Anim Sci Ferdowsi Univ 2010. (Persian).

[8] van der Vossen JM, van der Lelie D, Venema G. Isolation and characterization of streptococcus cremoris Wg2-Specific Promoters. Appl Environ Microbiol 1978; 53: 2452-2457.

[9] Lutful Kabir SM. The role of probiotics in the poultry industry. Int Mol science 2009; 10: 3531-3546.

[10] van Rooijen JR, Gasson MJ, de Vos WM. Characterization of the Lactococcus lactis lactose operon promoter: contribution of flanking sequences and LacR repressor to promoter activity. J Bacteriol 1992; 174: 2273-2280.

[11] Borerro J, Jimenez J. Use of the usp45 lactococcal secretion signal sequence to drive the secretion and functional expression of enterococcal bacteriocins in Lactococcus lactis. J Appl Genet Mol Biotechnol 2011; 89: 131-143.

[12] Leiloir Y, Nouaille S, Commissaire J, Brétigny L, Gruss A, Langella P. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in lactococcus lactis. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 4119-4127.

[13] Luerce TD, Azevedo MS, Leblance JG, Azevedo V, Miyoshi A, Pontes DS. Recombinant lactococcus lactis fails to secrete bovine chymosine. Bioengineered 2014; 5: 363-370.

[14] Shigemori S, Oshiro K, Wang P, Yamamoto Y, Wang Y, Sato T, et al. Generation of dipeptidyl peptidase-IV-inhibiting peptides from β-Lactoglobulin secreted by lactococcus lactis. Biomed Res Intern 2014; 393598.

[15] Neef J, Milder JF, Koedijk D, Klaassense M, Heeziuse E, van Strijp J, et al. Versatile vector suite for the extracytoplasmic production and purification of heterologous His-tagged proteins in Lactococcus lactis. Appl Microbiol Biotechnol 2015; 99: 9037-9048.

[16] Higuchi R, Krummel B, Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions". Nucleic Acids Res 1988; 16: 7351-7367.

[17] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

[18] van Asseldonk M, Rutten G, Oteman M, Siezen RJ, de Vos WM, Simons G. Cloning of usp45, a gene encoding a secreted protein from Lactococcus lactis subsp, lactis. Gene 1990; 95: 155-160.

Construction of pFUM003 expression vector with extracellular secretion properties

Bahareh Pakbaten (M.Sc), Reza Majidzadeh Heravi (Ph.D)*, Hassan Kermanshahi (Ph.D), Mohammad Hadi Sekhavati (Ph.D), Ali Javadmanesh (Ph.D)
1 – Dept. of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: 23 Oct 2015; Accepted: 22 Feb 2016)

***Introduction**:* Probiotics are beneficial microorganisms that have been used in food production as well as health promotion over the centuries. Recombinant probiotics are used to express and transfer native or recombinant molecules to mucosal surface of digestive tract to promote efficiency in nutrition and health. Lactococcus lactis is a potential candidate for the production of useful biological proteins. Since there is not any vector nominated for this bacterium to show the extracellular protein secrition properties, therefore the aim of this study was to increase the efficiency of expression and secretion of recombinant proteins by adding transmission signal peptide usp45 to pBU003.

***Materials and Methods**:* usp45 signal peptide has 81 nucleotides and previous studies indicated that it can also cause increase in the gene expression. In this study, after synthesising usp45 signal sequence, it was ligated into pBU003. Then the vector was transformed to Ecoli (MC1061). The recombinant plasmid named pFUM003 after “plasmid Ferdowsi University of Mashhad 003”.

***Results**:* Sequencing of recombinant plasmid containing usp45 showed that the plasmid had correct construction and the inserted sequence had exact match with the reference sequence (EU382094.1) reported in NCBI's GenBank.

***Conclusion**:* The recombinant plasmid was named pFUM003. This recombinant plasmid structurally was correct and can be used to transmit into probiotics make them to benefit from extracellular protein production properties.

***Keywords**:* Protein Sorting Signals, *lactococos lactis*, Genetic vectors

* Corresponding author. Tel: +98 51 38805747
rmajidzadeh@um.ac.ir