کومش- جلد ۱۳، شماره ۲ (پیاپی ۴۲)، زمستان ۱۳۹۰

کلونینگ و بیان ژن آنزیم ضد قارچ نوترکیب کیتیناز *باسیلوس پومیلوس* در *باسیلوس سوبتیلیس* ۱۶۸

مصطفی کشاورز (M.Sc)، میثم احمدی زیدآبادی (M.Sc)، غلامرضا احمدیان [*] (Ph.D)
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک مولکولی

چکیده

سابقه و هدف: کیتین، پلی ساکارید خطی و یکی از فراوان‌ترین پلی ساکاریدهای طبیعی است که جزء اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از موجودات است. کیتینازها، آنزیم‌های اصلی کاتالیزکننده کیتین به اجزاء مونومری و الیگومری آن هستند و می‌توانند به عنوان یک عامل ضد قارچ طبیعی استفاده شوند. هدف از این تحقیق کلونینگ و بیان ژن نوترکیب کیتیناز در باکتری باسیلوس سوبتیلیس در درمان عفونت‌های قارچی و جای‌گزینی آن با محصولات سنتزی و سرطان‌زا بود.

مواد و روش‌ها: ژن کیتیناز باسیلوس پومیلوس با طراحی پرایمرهای مناسب در وکتور الحاقی به ژنوم pDHAFB کلون گردید. سازه ساخته شده با استفاده از کراسینگ اور دوگانه به درون ژن آمیلاز کروموزوم باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸ منتقل و بیان آن توسط IPTG القا گردید و عمل‌کرد آن بررسی گردید.

یافته‌ها: سازه نوترکیب حاوی ژن کیتیناز تولید گردید. بیان ژن با ایجاد هاله در اطراف کلونی‌های باکتری نوترکیب روی محیط حداقل شامل کیتین به عنوان منبع کربن مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: ایجاد هاله در محیط حداقل حاوی کیتین نشان‌دهنده عمل‌کرد آنزیم کیتیناز نوترکیب و تجزیه کیتین می‌باشد که با توجه به این خاصیت ضد قارچی می‌تواند به عنوان ماده موثر درمان عفونت‌های قارچی انسان و ماده ایمن در دفع آفات و آلاینده‌های زیستی استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: کیتین، کیتیناز، کراسینگ اور، ژنتیک، بیماری‌های قارچی پوست، درمان

مقدمه

وکتورهای الحاقی ابزارهای مهمی در زیست‌شناسی مولکولی باسیلوس سوبتیلیس هستند. فرایند الحاق، نواحی خاصی در کروموزوم را به‌وسیله توالی‌های هم‌سان بر روی پلاسمید، مورد هدف قرار می‌دهد. اگر یک توالی همسان وجود داشته باشد، یک کراس اوور یگانه کل کروموزوم را به ناحیه هدف، الحاق می‌کند. اگر دو توالی همسان وجود داشته باشد؛ و آن‌ها روی نقاط مرتبط نزدیک به هم روی کروموزوم قرار گیرند؛ در نتیجه کراس اوور دوگانه کاست‌های الحاقی بین هدف‌های کروموزومی ایجاد می‌شود. الحاق وکتورهای کلونینگ از طریق نوترکیبی هم‌سان (همولوگوس) برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ در آزمایشگاه فرانک.ای.یانگ در دانشگاه روچستر انجام گرفت [۱].

Shimotsu و Henner این متد را با الحاق کاست‌های ژنی به نواحی معینی از باسیلوس سوبتیلیس گسترش دادند. آن‌ها ژن ادغامی trp-lacZ را ساختند و سپس آن را همراه با مارکر انتخابی در بین نواحی بالادست و پایین‌دست ژن آلفا-آمیلاز باسیلوس سوبتیلیس، در روی وکتور الحاقی، وارد کردند. پس از ترانسفورماسیون در باسیلوس سوبتیلیس، ناحیه مرکزی از

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۱۸۷۶۰۸ نمابر: ۴۴۵۸۰۳۹۵ - ۰۲۱
Email: gholamrezaahmadian@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۵

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

ژن آمیلاز (amyE) با کاست‌هایی که حاوی ژن ادغامی و مارکر انتخابی بودند، جای‌گزین گردید. بعد از آن استفاده از وکتورهای الحاقی در زیست‌شناسی مولکولی و مهارت‌های آزمایش بر روی باسیلوس سوبتیلیس به طور وسیعی گسترش یافت [۲].

کیتین، پلی‌ساکارید خطی مرتبط بتا [۱-۴] ان-استیل گلوکز امین GlcNAc جزء اصلی ساختار دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت‌های بی‌مهرگان، مانند حشرات و سخت‌پوستان است [۴-۷]. کیتینازها، آنزیم‌های اصلی کاتالیزکننده کیتین به اجزاء مونومری و الیگومریش هستند؛ که در طیف وسیعی از ارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، گیاهان، قارچ‌ها و حشرات یافت می‌شود. گیاهان کیتینازها را به عنوان دفاعی بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا تولید می‌کنند. به علت این‌که کیتین در مهره‌داران یافت نمی‌شود، پیشنهاد گردید که از خاصیت مهارکنندگی کیتیناز در درمان عفونت‌های قارچی استفاده شود. خطر بالقوه بیماری‌های همه‌گیر محصولات زراعی امروزه نیز وجود دارد. بنابراین آن‌چه در روش‌های جدید مهندسی ژنتیک نیاز است، ارائه ژن‌های جدید کدکننده ضد میکروبی و قارچی است. کیتینازها یکی از چنین کلاس ژن‌هایی می‌باشد. این ژن‌ها کدکننده آنزیم‌های هیدرولیزکننده زنجیره بتا ۱-۴ در کیتین دیواره سلولی قارچ‌ها و اسکلت خارجی در حشرات، نماتودها و بعضی دیگر از ارگانیسم‌ها است [۱۳،۱۲]. در نتیجه، کیتینازها دارای عمل‌کرد ضد قارچی بر علیه چنین ارگانیسم‌هایی هستند، که انواعی از آن‌ها پاتوژن هستند. مواد طبیعی قارچ‌کش عوارض جانبی زیست محیطی مانند خطرات بهداشتی و سرطان‌زایی برای انسان و دیگر موجودات غیر هدف ندارد [۱۵،۱۴]. بررسی‌ها نشان می‌دهند که با ایجاد جهش در دمین اتصال کیتین به کیتیناز، فعالیت آنزیم می‌تواند افزایش یابد، مثال با جای‌گزینی Trp687 با Phe ، کیتیناز می‌تواند با اتصال قوی‌تری به کیتین در محلول حاوی نمک زیاد (۲M نمک طعام) متصل شود و این می‌تواند در ساخت ستون کروماتوگرافی برای خالص‌سازی آنزیم استفاده گردد. نشان داده شده است که تغییرات دیگر از جمله جهش‌زایی در عناصر تنظیمی و یا وارد کردن دو نسخه از ژن به ژنوم میزبان در افزایش بیان ژن کیتیناز نقش دارد [۱۶].

در این مطالعه ژن کیتیناز باسیلوس پومیلوس با استفاده از وکتورهای الحاقی به درون ژن آمیلاز کروموزوم باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸ منتقل و بیان آن توسط IPTG القا گردید. بیان این ژن توسط ایجاد هاله در اطراف کلونی‌های باکتری نوترکیب بر روی محیط حداقل شامل کیتین به‌عنوان منبع کربن مشاهده گردید.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده. آنزیم‌های محدودگر SphI و XhoI متعلق به شرکت New England Biolabs Inc. (Beverly, Mass) بود. آنزیم T4 DNA Ligase و DNA polymerase از شرکت Roche تهیه گردید که طبق شرایط توصیه‌شده کارخانه استفاده گردید. تخلیص DNA پلاسمیدی و کیت استخراج DNA از شرکت Roche خریداری شد موادی از قبیل پارانیترو فنیل- سیتوبیوز، کیتین خالص، کربوکسی متیل- کیتین، پروتئین استاندارد که از Sigma Aldrich خریداری گردید. سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. سویه های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق

سویه ها	خصوصیات	منبع
Bacillus pumilis SG2	Chitinase chiS coding gene	Ahmadian et al., 2007
B. subtilis 168	trpC2	Kunst et al., 1997
اشریشیا کلی M15		Invitrogen Life Technologies
اشریشیا کلی DH5α	F- Φ80dlacZΔM15 endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_K^- m_K^+) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169	Invitrogen Life Technologies

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق و توالی آنها همراه با نواحی اثر آنزیم های محدود الاثر و شاین دالگارنو

نام	توالی	توضیحات
ChiSF1J	5’ GGGTCTAGAAAAGGAGGCGATTTG GAAA Sph1 Shine-Dalgarno spacer start codon	پرایمر بالادست در بالای ژن کیتیناز حاوی شاین دالگارنو و فاصله انداز بهینه شده
ChiSR1J	5’ GG GCATC GAGCCCACTCTCTCTTTA xhoI	پرایمر پایین دست در پایین ژن کیتیناز
AFSma-4F	5’-GCGCCCG-GGTAGTGGTGCTTACGATG	پرایمر بالادست ژن آمیلاز E
ABXA-5R	5’-GCTCTAGA-CAATATCAGCATCCTTGCAG	پرایمر پایین دست ژن آمیلاز E

پلاسمید الحاقی. pDHAFB به عنوان یک وکتور الحاقی در این آزمایش استفاده گردید.

محیط‌های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها. از محیط‌های LB Brath و LB Agar حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جهت کلونینگ استفاده گردید و برای بیان ژن مورد نظر محیط‌های مختلف LB Brath مورد بررسی قرار گرفت. آمپی‌سیلین و کانامایسین مورد استفاده به عنوان آنتی‌بیوتیک از شرکت سیگما خریداری شد.

پرایمرها. پرایمرهای فرادست و فرودست پس از طراحی و آنالیز کامپیوتری سنتز گردید و در جدول ۲ آمده است. دو پرایمر بالایی برای کلونینگ کیتیناز و دوتای پایینی برای ابتدا و انتهای امیلاز طراحی گردید. دو پرایمر بالایی برای کلونینگ کیتیناز و دوتای پایینی برای ابتدا و انتهای امیلاز طراحی گردید. برای افزایش DNA در شرایط آزمایشگاهی، واکنش‌ها PCR طبق جدول ۳ و ۴ انجام گردید.

جدول ۳. مواد مورد نیاز در واکنش PCR و مقدار آنها

مواد	مقدار
بافر 10X PCR	۵ میکرو لیتر
dNTPs Mi ۱mM	۴ میکرو لیتر
Mgso4 50 mM	۳ میکرو لیتر
پرایمربالا دست۱۰پیکو مول بر میکرو لیتر	۳ میکرو لیتر
پرایمرپایین‌دست۱۰پیکومول‌بر میکرو لیتر	۳ میکرو لیتر
آنزیم Pfu DNA پلی مراز	۰/۵ میکرو لیتر
الگو 100ng(cDNA)	۳ میکرو لیتر
آب مقطر(آمپولی)	۲۸/۵میکرو لیتر
حجم نهایی	۵۰ میکرولیتر

جدول ۴. مراحل واکنش PCR به همراه تعداد سیکل و زمان و درجه حرارت لازم برای هر مرحله

مرحله	درجه حرارت	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل‌ها
دناتوره کردن اولیه	۹۵	۴	۱
دناتوره کردن اتصال تکثیر	۹۵ ۴۶ ۷۲	۱ ۱ ۱	۳۵
تکثیر نهایی	۷۲	۵	۱

برای خالص‌سازی DNA پلاسمیدی از ستون‌های jetquick (Genomed, Löhne Germany) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل توالی‌ها در NCBI و با استفاده از نرم‌افزار آنالیز توالی (DNASTAR) انجام گرفت.

ترانسفورم DNA نوترکیب به درون باکتری اشریشیاکلی. پس از انجام مراحل لیگاسیون و تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد، محصول لیگاسیون با استفاده از شوک حرارتی به‌درون سلول‌ها منتقل شد.

آماده‌سازی کیتین کلوئیدی. ۱ گرم از کیتین (sigma) در ml ۱۲ از HCL غلیظ در دمای ۴°C هم زده و حل می‌شود ml ۴۰۰ از اتانول سرد خالص اضافه و در دمای اتاق هم زده می‌شود. روز بعد کیتین در xg ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه رسوب می‌یابد و ۳ بار با dH2O با pH تنظیم شده ۷ شسته می‌شود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

محیط حداقل ۱ لیتری باسیلوس سوبتیلیس برای ترانسفورماسیون با روش طبیعی باسیلوس سوبتیلیس با دستورالعمل زیر تهیه می‌شود:

K_2HPO_4	۱۴ gr
KH_2PO_4	۶gr
$(NH_4)_2SO_4$	۲ gr
Trisodium citrate	۱ gr
$MgSO_4.2H_2O$	۰/۲ gr
Agar	۱۵ gr

مقدار کمی MgCl2, ZnSO4, FeCl3 و CaCl2 با غلظت نهایی ۱۰-۶ M در انتها اضافه می‌شود. ۴۰Ml از کیتین کلوئیدی ۵٪ برای غلظت نهایی ۰/۲٪ اضافه می‌گردد. محیط BSS با اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌گردد. Casamino acids یا casein hydrolysate با فیلتر استریل می‌شود و سپس به محیط BSS سرد برای رسیدن به غلظت نهایی (w/v) ۰/۱٪ اضافه می‌شود.

ترانسفورم کردن طبیعی باکتری باسیلوس سوبتیلیس (Natural transformation). در این روش تهیه سلول مستعد و ترانسفورماسیون هم زمان صورت می‌گیرد. به‌طور خلاصه ابتدا یک کلنی تک از پلیت کشت شبانه جدا و از آن در حجم کوچکی (۵ ml)، یک پیش کشت، در محیط LB، تهیه گردید و برای یک شب (Overnight) ، لوله در ۳۷ با حرکت دورانی قرار داده شد. روز بعد ۰/۵ ml از محیط پیش کشت، برای تلقیح به۵۰ml محیط کشت LB استریل جدید به‌کار رفت و اجازه رشد باکتری در ۳۷°C برای مدت چند ساعت داده شد. در این روش از ارلن‌های Baffled استفاده می‌شود که به علت شکل خاص, هوارسانی بهتری را برای باکتری فراهم می‌سازد. باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر باید به OD ۰/۳ برسد. سپس ۳۵ ml از کشت باکتریایی به فالکن استریل منتقل, در دور ۳۰۰۰ rpm، به مدت ۱۴ دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد. در این روش از دو محیط فقیر به نام‌های TF1 و TF2 به منظور مستعد کردن سلول‌ها استفاده می‌شود. در مرحله نخست رسوب حاصل، در ۱ml از محیط TF1 حل شد سپس به بقیه محیط TF1 منتقل گردید. حجم ارلن بایستی ml ۱۰۰ باشد. سپس در دور rpm ۷۰ و در دمای ۳۷ درجه، تا رسیدن به OD600=2.6 با حرکت دورانی قرار داده شد. سپس ml ۱ از محیط TF1 به محیط TF2 منتقل و در ارلنml ۲۰۰ با دور rpm ۴۰ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱,۵ تا ۲ ساعت، با حرکت دورانی قرار داده شد. در انتها به ml ۰/۵ از محیط TF2، مقدار µg ۰/۲ تا µg ۱، DNA اضافه گردید و در ویال ۱/۵ یا لوله شیشه‌ای استریل، در دور rpm ۴۰ و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت با حرکت دورانی قرار داده شد. سلول‌ها با دور rpm ۳۰۰۰، به مدت ۳ دقیقه، در ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شد و رسوب، در ۱۰۰ میکرولیتر محیط حل و با میله شیشه‌ای استریل، روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب پخش گردید. پلیت کشت حداقل به مدت ۱۶ ساعت جهت رشد کلنی‌های مورد انتظار در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در صورت رشد کلنی‌ها، باکتری‌ها با روش‌های مولکولی آنالیز می‌گردند.

نتایج

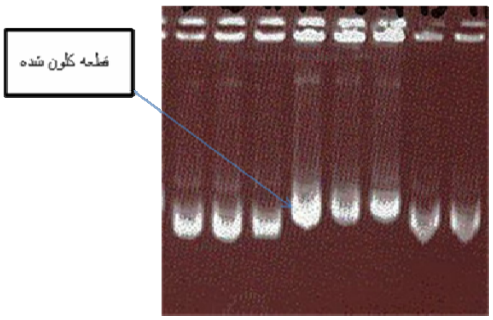
بعد از انجام PCR با پرایمرهای طراحی شده، جایگاه‌های برش با آنزیم‌های SphI و XhoI در پرایمرهای فرادست و فرودست جداگانه طراحی گردید، عمل هضم آنزیمی با دو آنزیم SphI و XhoI برای قطعات حاصل از PCR و وکتور انجام گرفت. سپس جهت Ligation از آنزیم T4 DNA Ligase استفاده گردید در ادامه طی مراحل شوک گرمایی E-coli ترانسفورم گردید، اولین ترانسفرم به باکتری اشریشیاکلی برای به‌دست آوردن پلاسمید نوترکیب انجام گرفت. و بر روی محیط LB-agar حاوی آنتی‌بیوتیک امپی‌سیلین کشت داده شد. از سلول‌های مستعد بدون ناقل نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

بررسی سریع (Quick check) برای اثبات کلونینگ. استخراج پلاسمید در مقیاس کم (Minipreparation) و استخراج DNA در ژل آگاروز ۱٪ برای مشاهده Jumping

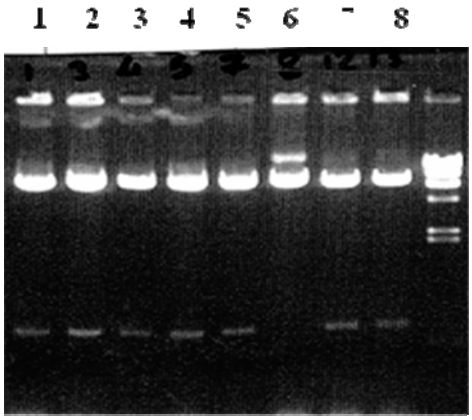
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

پرش و پیدا کردن کلون‌های مثبت در E.coli را می‌توان در شکل ۱ مشاهده کرد.

اثبات کلونینگ با استفاده از برش آنزیمی. برای تائید کلونینگ ساختارهای کیتیناز در پلاسمید pDHAFB، پلاسمید با وزن مولکولی بیش‌تر با آنزیم HindIII برش می‌خورد. از آن‌جا که جایگاه برش HindIII یکی در MCS وکتور و دیگری در ژن کیتیناز (در جایگاه حدود ۷۵۰ bp) می‌باشد، برش با این آنزیم یک باند تقریباً در بالای باند ۷۵۰ bp ایجاد می‌کند (شکل ۲).



شکل ۱. ژل آگاروز نشان دهنده پلاسمید نوترکیب pDHAFB-chis که با استخراج پلاسمید در مقیاس کم (Minipreparation) جدا و با روش Quick check بررسی گردید. پلاسمیدهای نوترکیب وزن مولکولی بیش‌تری نسبت به وکتور خالی داشته وآهسته تر روی ژل حرکت می‌کنند (اولین ردیف از سمت چپ)

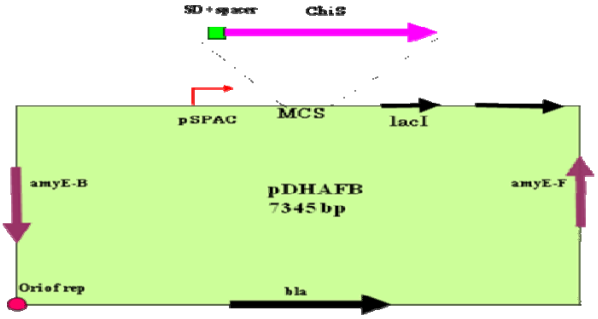


شکل۲. ژل آگاروز نشان دهنده تایید کلونینگ کیتیناز (ChiS) در پلاسمید pDHAFB. کلونی‌هایی با وزن مولکولی بیشتر در آزمایش jumping با HindIII برش می‌خورد. ردیف‌های ۲-۳ دارای pDHAFB-chiS می‌باشند. موقعیت نشانگر (λHindIII) در سمت راست قرار گرفته است.

روش ترانسفورماسیون طبیعی باسیلوس سوبتیلیس. کلون‌های مثبت حاوی سازه پلاسمیدی هستند که با روش فنل- کلروفرم خالص‌سازی گردیدند؛ سپس با روش ترانسفورماسیون طبیعی به باسیلوس سوبتیلیس ترانسفورم شدند. در این روش با رشد باکتری در محیط حداقل آن را برای دریافت DNA خارجی مستعد می‌کنند. ترانسفورم شده‌ها روی پلیت آگار حاوی ۱۰ µg/ml کلرامفنیکل انتخاب می‌شوند.

انتقال کیتیناز (ChiS) به ژنوم باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸. ژن کیتیناز باسیلوس پومیلوس ChiS نام‌گذاری گردید. کل ایران chiS به وکتور الحاقی منتقل و ژن کیتیناز در جایگاه MCS وکتور pDHAFB که تحت کنترل پروموتر pSPAC و با IPTG القاء می‌گردد قرار گرفت و به ژنوم باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸ الحاق گردید.

وکتور pDHAFB شامل ۲ منطقه همسان در انتهای ۵' و انتهای ۳' لوکوس آمیلاز E (amyE) است. بنابراین، توالی کلون شده در جایگاه کلون‌سازی (MCS) به جایگاه بین ۲ جایگاه همسان اضافه، و به لوکوس amyE باسیلوس سوبتیلیس طی کراس اوور دوگانه الحاق و عمل‌کرد ژن آمیلاز E از بین می‌رود (شکل ۳).

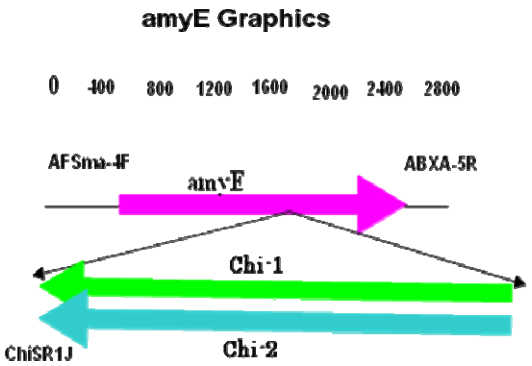


شکل ۳. نشان دهنده سازه ساخته شده مورد استفاده درانتقال ژن کیتیناز به لوکوس amyE باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸.

اثبات الحاق کیتیناز با استفاده از PCR. سویه‌های نوترکیب در مدت ۸ ساعت رشد کرده و ژنوم‌شان استخراج و برای واکنش PCR به عنوان الگو استفاده می‌شوند. جهت ژن کیتیناز خلاف آمیلاز E است، اگر پرایمرها به لوکوس راست الحاق شوند، PCR باندی در حدود ۳ kb می‌دهد اما برای

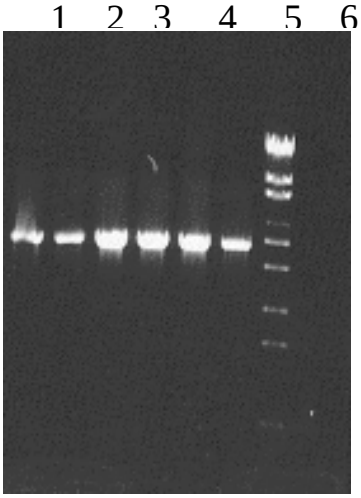
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

ترانسفورم نشده‌ها و سویه‌های وحشی باسیلوس سوبتیلیس هیچ باندی مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).



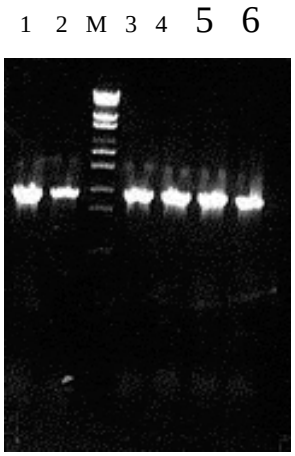
شکل ۴. می‌توان ترانسفورم شده‌ها را با انجام PCR و استفاده از رایمرهای ABXA-5R و AFSma-4F بررسی کرد. (پرایمر طراحی شده از بیرون ژن آمیلاز E). گونه وحشی باسیلوس سوبتیلیس۱۶۸ باندی با طول bp ۲۵۷۷ می دهند وترانسفورم شده ها این ژن را قطع و در آن قرار می‌گیرد؛ بنابراین باندی بالاتر می‌دهند. پرایمر ABXA-5R برای ناحیه بالا دست لوکوس آمیلازE و پرایمر ChiSR1J برای انتهای ژن کیتیناز طراحی شده‌اند محصولات PCR برای ترانسفورم شده‌های صحیح باندی در حدود 3kb می دهند.

برای تایید ورود کیتیناز به لوکوس آمیلاز E2 دسته از پرایمرها استفاده می‌شوند. موقعیت پرایمرها در شکل ۵ نشان داده شده است.

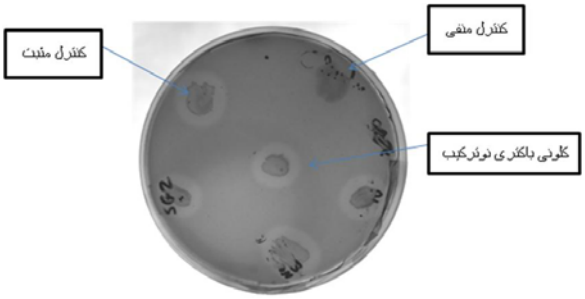


شکل ۵. ژل آگاروز نشان دهنده ورود ژن‌های کیتیناز به لوکوس آمیلازE از باسیلوس سوبتیلیس. در واکنش PCR از پرایمرهای ABXA- 5R و chiSR1J و ژنوم ترانسفورم شده‌ها به عنوان الگو استفاده می‌شود. ردیف ۱-۶ ترانسفورم شده‌هاست و ردیف ۷ گونه وحشی است

برای تایید بیش‌تر الحاق، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای (ChiSF1J and ChiSR1J) طراحی شده برای ناحیه ۵' و ۳' ژن کیتیناز، انجام شد. ترانسفورم شده‌ها باندی در حدود ۱/۸ kb دادند که متناظر با طول کامل ژن کیتیناز می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۶. در PCR انجام شده، از پرایمرهای chiSF1J و chiSR1J و ژنوم ترانسفورم شده‌ها به عنوان الگو استفاده گردید. یک باند در حدود kb ۱/۸ در عکس دیده می‌شود.



شکل ۷. ترانسفورم شده‌هایی که بر روی پلیت CIC رشد کرده اند (این محیط شامل LB آگار به علاوه ٪ ۰/۲ کیتین کلوئیدی، IPTG در غلظت نهایی 1mM و 8 µg/ml کلرامفنیکل).

بررسی عمل‌کرد باکتری‌های ترانسفورم شده با ژن کیتیناز

کلون‌های حاوی سازه پلاسمیدی ترانسفورم شده در باسیلوس سوبتیلیس روی پلیت آگار حاوی ۱۰ µg/ml کلرامفنیکل انتخاب می‌شوند. سپس برخی از ترانسفورم شده‌ها به پلیت کیتین-آگار (حاوی ۱۰ µg/ml کلرامفنیکل و ۱ Mm IPTG) منتقل گردیدند. IPTG هر ژنی را تحت کنترل پروموتر pSPAC القاء می‌کند. بعد از ۳ روز گرماگذاری در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

دمای ۳۰°C، هاله در اطراف کلونی‌هایی که ژن کیتیناز به داخل ژنوم‌شان وارد شده، قابل مشاهده است (شکل ۷).

این هاله‌ها در اطراف کلونی‌هایی وجود دارند که پس از افزودن IPTG بیان کیتیناز (ChiS) از پروموتر Pspac در سازه pDHAFB-chiS را القاء می‌کنند. پلیت‌ها بعد از تلقیح ۲ روز در ۳۰°C نگهداری می‌شوند.

بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت کیتینازی باسیلوس سوبتیلیس با کشت روی محیط حاوی کیتین برای مشخص کردن این‌که می‌تواند از کیتین به عنوان تنها منبع کربن استفاده کند، مشخص می‌شود. ارگانیسم‌هایی با فعالیت کیتینازی را می‌توان با مشاهده مناطق شفاف ایجاد شده در پلیت کیتین آگار، تشخیص داد. باسیلوس سوبتیلیس‌ها مناطق شفاف واضحی در این محیط، بعد از چند ساعت و در دمای ۳۰°C، ایجاد می‌کنند. قطر هاله حتی در ۴°C نیزافزایش می‌یابد و نشان‌دهنده این است که این سویه، کیتینازی قوی تولید می‌کند که حتی در دمای کم هم فعال است. ژن کیتیناز باکتری باسیلوس پومیلیس به باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸(trpC2) که سیستم شناخته شده ژنتیکی دارد (این ژنوم در طی پروژه ژنوم کاملاً توالی‌یابی شده است) و به طور معمول در آزمایشگاه‌های بیولوژی مولکولی استفاده می‌شود الحاق می‌شود. این نتایج هم‌چنین نشان می‌دهند که توالی نشانه کیتیناز باسیلوس پومیلوس توسط سیستم ترشحی باسیلوس سوبتیلیس شناسایی می‌شوند. ایجاد هاله در اطراف کلون‌های حاوی کیتیناز نوترکیب در محیط حداقل کیتین‌دار نشان‌دهنده تجزیه و مصرف کیتین به عنوان منبع کربن توسط باکتری‌های نوترکیب می‌باشد. در این مقاله عمل‌کرد تجزیه‌ای آنزیم کیتیناز نوترکیب در محیط حاوی کیتین نشان داده شد، تحقیقات بیش‌تر و دقیق‌تری در آینده لازم است که بیان و مقدار آنزیم کیتیناز نوترکیب به طور دقیق و کمی اندازه‌گیری گردد. آنزیم کیتیناز در ارگانیسم‌های مختلف به عنوان یک عامل دفاعی و رقابتی بر علیه اجزای کیتینی سایر ارگانیسم‌ها عمل می‌کند. آنزیم کیتیناز در انسان و پستانداران در مقابله با عوامل پاتوژن کیتین‌دار مثل عوامل ایجادکننده عفونت‌های قارچی و نماتودی نقش دارد. با توجه به این خصوصیات تولید قارچ‌کش‌های ایمن در درمان عفونت‌های قارچی و محصولات کمک‌کننده به سیستم دفاعی بدن انسان یک ضرورت است، که با تولید کیتیناز نوترکیب محقق می‌شود. از طرفی کیتیناز نوترکیب می‌تواند به عنوان یک آفت‌کش طبیعی محصولات زراعی جای‌گزین آفت‌کش‌های سنتزی و سرطان‌زا گردد که بر سلامت و تغذیه انسان اثر سوء دارد.

تشکر و قدردانی

مولفان از مسئولین صندوق حمایت از پژوهشگران و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک برای کمک مالی (به پروژه شماره ۸۹۰۰۱۱۹۱) صمیمانه تشکر مینمایند.

منابع

[1] Duo-Chuan L. Review of fungal chitinases. Mycopathologia 2006; 161: 345-360.

[2] Suzuki K, Suzuki M, Taiyoji M, Nikaidou N, Watanabe T. Chitin binding protein (CBP21) in the culture supernatant of serratia marcescens 2170. Biosci Biotechnol Biochem 1998; 62: 128-135.

[3] Boot RG, Blommaart EF, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C. et al. Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. J Biol chem 2001; 276: 6770-6778.

[4] Antranikian G, Vorgias CE, Bertoldo C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. Adv Biochem Eng Biotechnol 2005; 96: 219-262.

[5] Ferrandon S, Sterzenbach T, Mersha FB, Xu MQ. A single surface tryptophan in the chitin-binding domain from Bacillus circulans chitinase A1 plays a pivotal role in binding chitin. Biochim Biophys Acta 2003; 1621: 31-40.

[6] Huang CJ, Wang TK, Chung SC, Chen CY. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, bacillus cereus 28-9. J Biochem Mol Biol 2005; 38: 82-88.

[7] Muzzarelli R, Jeuniaux C, Gooday GW, editors. Chitin in nature and technology. New York: Plenum Press; 1986. p 435–442.

[8] Barboza-Corona JE, Nieto-Mazzocco E, Velázquez-Robledo R, Salcedo-Hernandez R, Bautista M, Jiménez B, Ibarra JE. Cloning, sequencing and expression of the chitinase gene chiA74 from Bacillus thuringiensis. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1023-1029.

[9] Shimotsu H, Henner DJ. Construction of a single-copy integration vector and its Use in analysis of regulation of the trp operon of bacillus subtilis. Gene 1986; 43: 85-94.

[10] Piggot PJ, Curtis CA. Analysis of the regulation of gene expression during Bacillus subitlis sporulation by manipulation of the copy number of spo-lacZ fusions. J Bacteriol 1987; 169: 1260-1266.

[11] Tantimavanich S, Pantuwatana S, Bhumiratana A, Panbangred W. Cloning of a chitinase gene into bacillus thuringiensis subsp. aizawai for enhanced insecticidal activity. J Gen Appl Microbiol 1997; 43: 341-347.

[12] Muzzarelli RA, Guerrieri M, Goteri G, Muzzarelli C, Armeni T, Ghiselli R, Cornelissen M. The biocompatibility of di-

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

butyryl chitin in the context of wound dressings. Biomaterials 2005; 26: 5844-5854.

[13] Li J, Yang Q, Zhao LH, Zhang SM, Wang YX, Zhao XY. Purification and characterization of a novel antifungal protein from Bacillus subtilis strain B29. J Zhejiang Univ Sci B 2009; 10: 264-272.

[14] Haran S, Schickler H, Chet I. Increased constitutive chitinase activity in transformed trichoderma harzianum. Biol Control Theory 1993; 3: 101-108.

[15] Tiffin P. Comparative evolutionary histories of chitinase genes in the genus Zea and family poaceae. Genetics 2004; 167: 1331-1340.

[16] Flach J, Pilot PE, Jolles P. What's new in chitinase research? Experientia 1992; 48: 701-716.

[17] Ahmadian G, Degrassi G, Venturi V, Zeigler DR, Soudi M, Zanguinejad P. Bacillus pumilus SG2 isolated from saline conditions produces and secretes two chitinases. J Appl Microbiol 2007; 103: 1081-1089[18] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, et al. The completegenome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature 1997; 390; 249-256.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Cloning and expression of Recombinant antifungal chitinase enzyme of *Bacillus pumilus* in *Bacillus subtilis* 168

Mostafa Keshavarz (M.Sc)[1] ,Meysam. Ahmadi Zeydabadi (M.Sc)[1] Gholamreza Ahmadian (Ph.D)[*1]
Dept. of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

(Received: 25 Dec 2010 Accepted: 27 Aug 2011)

Introduction: Chitin, a linear polysaccharide and is one of the most abundant natural polysaccharides is the main component in numerous of organisms. Chitinase enzymes are essential enzymes catalyzing the conversion of chitin to its monomeric or oligomeric components, therefore, chitinase can used as a natural antifungal agent. The purpose of this study is cloning and expression of recombinant chitinse gene in Bacillus subtilis in the treatment offungal infection effects and replacement with carcinogenic and synthetic products.

Materials and Methods: Chitinase gene of *Bacillus.pumilus* was cloned to integrate vector Pdh5 Through designed the appropriate pimers.built construct using dual crossing over for transferred into the amylase gene (amyE) of *Bacillus subtilis*168; and its expression was induced by IPTG and its function was evaluated.

Results: Recombinant construct containing chitinase gene was produced. Gene expression by creating halo around the recombinant bacteria colonies in minimal media including chitin as carbon source was observed.

Conclusion: Create a halo containing chitin in the minimal media represents the performance of recombinant chitinase enzyme to catalyze the chitin. Considering antifungal property can be effectively treated as a matter of human fungal infection and safe substance to excretion biological pest and pollutants.

Key words: Chitin, Chitinase, Crossing over, Genetic, Dermatomycoses, Therapy

* Corresponding author: Fax: +98 21 44580395; Tel: +98 9124187608
gholamrezaahmadian@yahoo.ca

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]