

همسانه‌سازی ژن آنزیم کلاستروال اکسیداز سویه بومی ایرانی *Rhodococcus sp. 502* در راستای تولید آفت‌کش بیولوژیکی پنبه

*صبا بهرامی^۱، مسعود توحیدفر^۲، محمدعلی ابراهیمی^۳، حامد اسمعیل لشگریان^۴
^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
^۲دانشیار، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی، گروه بیوتکنولوژی
^۳دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
^۴استادیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی لرستان و عضو علمی مرکز تحقیقات
داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۷

چکیده

آنزیم کلاستروال اکسیداز به‌عنوان نسل جدیدی از آفت‌کش‌های بیولوژیک اثر آفت‌کشی قوی بر روی آفت غوزه پنبه (*Heliothis armigera*) دارد. مکانیسم اثر کشندگی کلاستروال اکسیداز مربوط به اکسیداسیون کلاستروال در غشای اپیتیلیوم روده میانی حشرات می‌باشد که منجر به تخریب فیزیکی و ساختاری غشاء و در نتیجه ایجاد اختلالاتی در عملکرد غشاء و در نهایت سبب مرگ آفت می‌شود. تولید گیاهان مهندسی ژنتیک شده با ژن کدکننده آنزیم کلاستروال اکسیداز در جهت مقاوم‌سازی آن‌ها به آفات، مستلزم انتخاب مناسب‌ترین سوش از نظر میزان بیان و فعالیت زیاد این آنزیم است. لذا این تحقیق با هدف همسانه‌سازی ژن آنزیم کلاستروال اکسیداز در یک سیستم بیانی pET مناسب، جهت امکان هدایت پروتئین نوترکیب تولیدشده به فضای پری‌پلاسمی باکتری طراحی و اجرا شد. بدین منظور از سویه باکتری (*Rhodococcus sp. 502*) بومی ایران، که دارای فعالیت کلاستروال اکسیدازی بالا بود، جهت جداسازی ژن با PCR استفاده شد. محصول PCR ابتدا در پلاسمید خطی pJET و در نهایت در پلاسمید pET23a کلون و داخل میزبان (*E. coli* DH5 α) ترانسفورم شد. پس از همسانه‌سازی و استخراج پلاسمید نوترکیب pET23a+cho و به‌منظور تأیید حضور ژن از آنزیم‌های *XhoI* و *HindIII* و تعیین توالی استفاده شده است. حضور باند ۱۶۰۰ جفت بازی در هضم آنزیمی حضور ژن را تأیید کرد. نتایج حاصل از آنالیز تعیین توالی حاکی از آن است که توالی به‌دست آمده شباهت زیادی با کلاستروال اکسیداز سویه‌های دیگر باکتری *Rhodococcus* موجود در NCBI دارد، که از آن می‌توان در راستای تولید آفت‌کش بیولوژیکی در پنبه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کلاستروال اکسیداز، pET23a، همسانه‌سازی، آفت‌کش بیولوژیکی پنبه

*نویسنده مسئول: hamedesmaili@gmail.com

مقدمه

میکروارگانیزم‌ها دارای پتانسیل عظیمی برای تولید گروه بسیار زیادی از آنزیم‌ها هستند که سال‌هاست به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dayanand and Patil, 2003). میکروارگانیزم‌ها به عنوان منبع آنزیم‌ها نسبت به گیاهان و حیوانات ارجحیت دارند (Patil et al., 2006). چرا که عموماً تولید به‌وسیله آن‌ها ارزان‌تر است و با تکثیر و زاد و ولد سریع مقادیر بسیار زیادی آنزیم می‌توان از آن‌ها به دست آورد. هم‌چنین مدت زمان به‌دست آوردن آنزیم کوتاه‌تر و مناسب است و منابع قابل اعتمادی از مواد خام با ترکیبات پایدار به راحتی فراهم می‌شود. کلاسترول‌اکسیداز (CHO) آنزیمی با ارزشی است که دارای دامنه گسترده‌ای از کاربردها در کشاورزی، پزشکی و صنعت است (Sharma et al., 2001). آنزیم کلاسترول‌اکسیداز به‌عنوان مونومر دو عملکردی کوفاکتور فلاوین‌آدینین‌دی‌نوکلوئید هستند که به خانواده آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز خصوصاً آن‌هایی که بر روی گروه CH-OH دهنده اکسیژن به‌عنوان گیرنده عمل می‌کنند تعلق دارد. کوفاکتورهای آنزیم کلاسترول‌اکسیداز به دو صورت، کووالانسی و غیرکووالانسی به آنزیم متصل می‌شوند (Badenes et al., 2006). آنزیم کلاسترول‌اکسیداز، واکنش کلاسترول را در حضور مولکول اکسیژن کاتالیز می‌کند و ۴-کلاستن-۳-ان و پراکسیدهدروژن ایجاد می‌شود (Patil et al., 2006). در سال ۱۹۴۴ Turfitt برای اولین بار آنزیم کلاسترول‌اکسیداز را از باکتری *Nocardia erythropolis* جداسازی نمود و آن را به عنوان یک اکسیدکننده کلاسترول معرفی کرد. به دنبال Turfitt آنزیم کلاسترول‌اکسیداز از منابع محیطی خاک با کشت در محیط‌های غربالگری توسط محققین بسیاری شناسایی و جداسازی شد (Kumari et al., 2012; Volontè et al., 2010; Yang et al., 2011; Doukyu et al., 2009). از مهم‌ترین کاربردهای آنزیم کلاسترول‌اکسیداز اثر آفت‌کشی آن است. آفت‌کش‌های بیولوژیکی غیرنوترکیب، مشابه *Bacillus thuringiensis* در مقابل آفات خاصی بسیار سمی عمل می‌کنند، اما برای انسان‌ها، گیاهان، حیات‌وحش و حشرات مفید زبانی ندارند و مدت اثر آن‌ها در محیط موقتی می‌باشد (Omidbegi et al., 2010). مکانیسم اثر کشندگی متفاوت آنزیم کلاسترول‌اکسیداز به عنوان یک آفت‌کش بیولوژیک بر روی آفاتی چون کرم غوزه پنبه، سرخرطومی پنبه، آن را نسبت به آفت‌کش‌های بیولوژیک موجود مانند Bt متمایز ساخته است به‌طوری‌که این آنزیم با اکسیداسیون کلاسترول از غشای روده آفت باعث اختلال در عملکرد غشاء و مرگ حشره می‌شود (Corbin et al., 1994; Somkuti et al., 1992; Purcell et al., 1993). در ایران ۴۰۰ تن سموم شیمیایی که عمدتاً از طریق واردات تأمین می‌شود، برای مبارزه با آفت کرم غوزه پنبه در مساحتی حدود ۱۵۰ هزار هکتار از مزارع این گیاه مهم به کار گرفته می‌شود. که بدین منظور در حدود شش میلیون دلار هزینه در سال برای واردات سموم پرداخت می‌شود که از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نمی‌باشد. از طرف دیگر

مشکلات استفاده نادرست و بی‌رویه از سموم شیمیایی علاوه بر مقاوم شدن آفات نسبت به سموم شیمیایی سبب آثار منفی بسیاری بوده که به طور مستقیم و غیرمستقیم بر عملکرد گیاه، کیفیت محصول، سلامت انسان و اکوسیستم کشاورزی تأثیر دارد و مشکلات زیست محیطی فراوان را ایجاد می‌کند (Etebari *et al.*, 2008; Rashno *et al.*, 2014; Omidbegi *et al.*, 2010). از این رو اهمیت استفاده از آفت‌کش‌های بیولوژیکی برای کنترل آفات ضروری به نظر می‌رسد، به طوری که امروزه تولید گیاهان تراریخت که در برابر آفات، مقاوم باشند یکی از مهم‌ترین راهبردهای کنترل آفات به شمار می‌آید. در حال حاضر کشورهای پیشرفته به این مهم توجه خاص داشته و در این حیطه سرمایه‌گذاری‌های کلانی را انجام می‌دهند (Sharma *et al.*, 2001). همچنین با کاربرد روز افزون آنزیم‌ها در صنایع، تولید این آنزیم‌ها با درجه خلوص و کیفیت بهتر از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا با توجه به اثر آفت‌کشی قوی کلستروکسیداز به عنوان یک آفت‌کش بیولوژیک، پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی ژن کلستروکسیداز در ناقل بیانی pET23a انجام شد تا تولید آن در سطح زیاد فراهم شود.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت باکتری: باکتری (*Rhodococcus sp.* 502) که در این پژوهش جهت جداسازی ژن آنزیم کلستروکسیداز مورد استفاده قرار گرفت یک سویه بومی است که توسط دکتر لشگریان در آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان در اختیار ما قرار گرفت. باکتری مذکور در محیط LB کشت داده شد. نمونه‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری شد.

طراحی پرایمر و تکثیر ژن کلستروکسیداز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی: پس از استخراج و تلخیص ژنوم باکتری (*Rhodococcus sp.* 502) با استفاده از کیت استخراج سیناژن این ژنوم به‌عنوان الگو جهت تکثیر ژن تولیدکننده کلستروکسیداز با استفاده از PCR مورد استفاده قرار گرفت. براساس توالی ژن مورد نظر یک جفت پرایمر با استفاده از نرم‌افزار 5 Oligo و Vector NTi طراحی شد.

Forward: 5' - TATACTCGAGACCGATAGCCGGGCGAACAG -3'

Reverse: 5' - TACCAAGCTTCTGGATGTCGGACGAGATGA -3'

ژن کلستروکسیداز با پرایمرهای ذکرشده در بالا، پرایمر رفت حاوی جایگاه برشی *XhoI* و پرایمر برگشت حاوی جایگاه برشی *HindIII* ابتدا با آنزیم *Taq DNA polymerase* و سپس با آنزیم *PFU DNA polymerase* تکثیر شد.

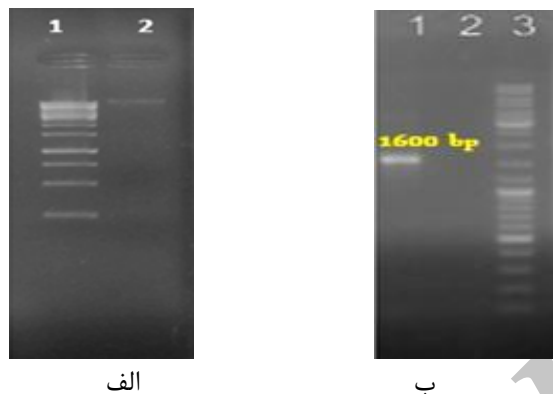
واکنش PCR به‌منظور تکثیر ژن آنزیم کلسترول اکسیداز: برنامه‌ی PCR (واسرشت‌سازی آغازین در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سی چرخه، تکثیر هر کدام شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، پلی‌مریزه شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و پلی‌مریزه شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه) تکثیر شد. آنزیم *PFU DNA polymerase* دارای خاصیت proofreading بوده و در طی فرآیند PCR از اشتباه کمتری برخوردار است.

تهیه سلول پذیرا و انجام کلونینگ: قطعه‌ی تکثیر شده در وکتور pJET وارد و تحت عنوان pJET+cho نامیده شد و سپس با روش شوک حرارتی به باکتری (*E. coli* DH5α) انتقال داده شد. به‌منظور غربال‌گری کلون‌های سفید رنگ، از روش Colony PCR استفاده شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمر اختصاصی CHO انجام گرفت.

استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی: به‌منظور تأیید نتایج حاصل از Colony-PCR، از کلون‌های غربال‌شده پلاسمید استخراج شد و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی حاوی جایگاه برشی با پلاسمیدهای استخراج شده انجام گرفت. برای تأیید نهایی حضور ژن *cho* در وکتور pJET، هضم دوگانه‌ی آنزیمی سازه ژنی pJET+cho با استفاده از آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XhoI* مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور کلون کردن ژن *cho* در وکتور بیانی pET23a، ابتدا پلاسمید pET23a با آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XhoI* برش داده شد. هضم دوگانه‌ی آنزیمی سازه‌ی ژنی pJET+cho با استفاده از آنزیم‌های برشی *HindIII* و *XhoI* در حجم زیاد صورت گرفت. پس از خالص‌سازی ژن *cho* از ژل آگارز، این قطعه در وکتور بیانی pET23a وارد گردید و به باکتری (*E. coli* DH5α) انتقال داده شد. پس از همسانه‌سازی و استخراج پلاسمید نو ترکیب pET23a+CHO، به‌منظور تأیید حضور نسخه ژنی *cho* در سازه ژنی فوق از روش برش آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI* و توالی‌یابی قطعه مورد نظر انجام شد. نمونه‌های کلون شده جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوریان فرستاده شد.

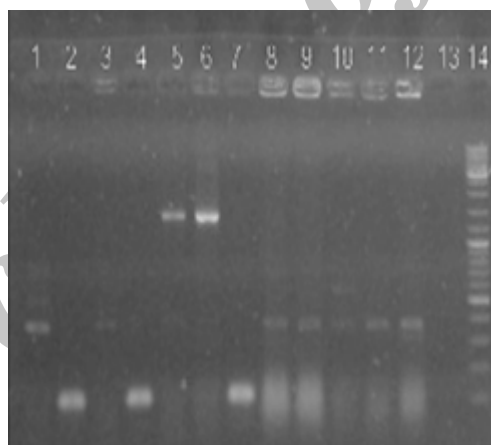
نتایج

الف) بررسی نتایج PCR: نتایج واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن CHO حضور باند ۱۶۰۰ جفت بازی را نشان داد، عدم تشکیل باند در کنترل منفی نشان دهنده عدم آلودگی در واکنش است (شکل ۱).

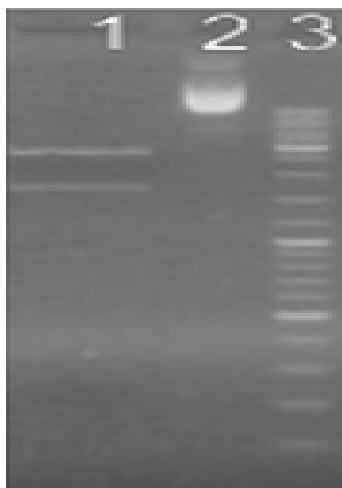


شکل ۱- الکتروفورز نمونه DNA کل بر روی ژل آگارز (الف)، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ب) چاهک ۱: محصول PCR ژن، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳: مارکر اندازه 1kb شرکت فرمانتاز.

نتایج کلونینگ محصول PCR در وکتور pJET به روش Colony PCR و هضم آنزیمی در شکل ۲ آورده شده است.

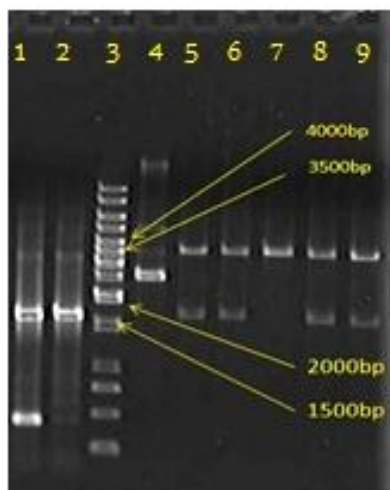


شکل ۲- بررسی نتایج کلونی PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ با پرایمرهای pJET بر روی pJET-CHO، چاهک‌های شماره ۱ الی ۱۲ کلونی باکتری، چاهک شماره ۱۳: کنترل منفی، چاهک شماره ۱۴: مارکر اندازه 1 Kb شرکت فرمانتاز

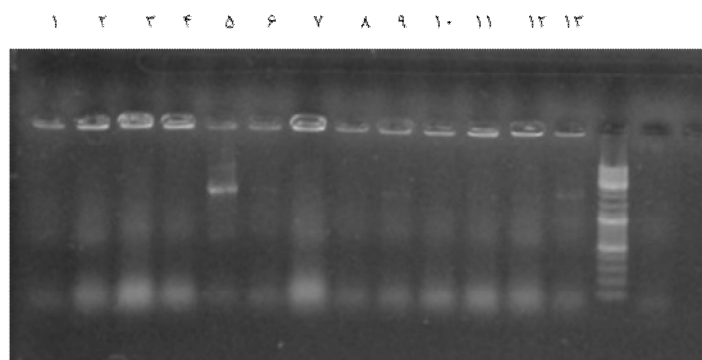


شکل ۳ - هضم آنزیمی با آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI* بر روی pJET- CHO چاهک شماره ۱:
 چاهک شماره ۲: pJET- cho (*HindIII*, *XhoI*)، چاهک شماره ۳: ladder

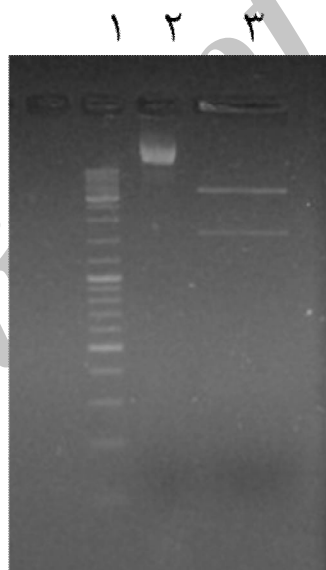
نتایج مربوط به تأیید کلونی‌های نوترکیب pET23a با استفاده از PCR و آنزیم‌های بررسی در شکل‌های ۴ و ۵ آورده شده است.



شکل ۴ - بررسی هضم آنزیمی وکتور pET23a بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. چاهک شماره ۱ و ۲ محصول PCR ژن کلاستروکسیداز، چاهک شماره ۳: ladder، چاهک شماره ۴: pET23a، چاهک شماره ۵، ۶، ۸، ۹: هضم آنزیمی pET23a-CHO، چاهک شماره ۷: هضم آنزیمی pET23a



شکل ۵- بررسی نتایج کلونی PCR با پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator بر روی پلاسمید pET23a-CHO با ژل آگاروز ۱ درصد (سمت راست) چاهک شماره ۱ الی ۱۳ کلونی باکتری، چاهک شماره ۱۴: مارکر اندازه 1 Kb فرمانتاز، چاهک شماره ۱۵: کنترل منفی



شکل ۶- بررسی هضم آنزیمی pET23a-CHO بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، چاهک شماره ۱: مارکر اندازه 1Kb فرمانتاز، چاهک شماره ۲: پلاسمید pET23a-CHO، چاهک شماره ۳: پلاسمید pET23a-CHO برش خورده با *XhoI* و *HindIII*

طبق شکل ۵ نتایج مربوط به PCR نشان داد که ژن مورد نظر در وکتور pET23a جای‌گذاری شده است به‌منظور تأیید کامل این فرایند از برش آنزیمی استفاده شد که نتایج آن در شکل ۵ آورده شده است. بدین‌منظور با استفاده از آنزیم *XhoI* پلاسمید حاصل از کلونی‌های مذکور مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در صورتی که در حامل نوترکیب pET23a-CHO کاست ژن کلسترول‌اکسیداز به صورت همسو با کاست ژن *cho* قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *XhoI* منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۶۰۰ جفت باز شد. به همین ترتیب در صورتی که در حامل نوترکیب pET23a-CHO کاست ژن کلسترول‌اکسیداز به‌صورت همسو با کاست ژن *cho* قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *HindIII* و *XhoI* منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۶۰۰ جفت باز می‌شود و جهت‌گیری عکس کاست ژن کلسترول‌اکسیداز نسبت به کاست ژن *cho* ظهور باندهایی با طول ۱۶۰۰ را سبب می‌شود (شکل ۵).

ب) نتایج تعیین توالی: برای اطمینان از عدم موتاسیون در ژن، پلاسمید نوترکیب پس از استخراج و تخلیص برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. توالی به‌دست‌آمده از ژن کلسترول‌اکسیداز با سایر ژن‌های کلسترول‌اکسیداز از سویه‌های دیگر باکتری با استفاده از سایت NCBI و برنامه BLAST مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که توالی به‌دست‌آمده با سویه (*Rhodococcus equi*) به میزان ۹۷ درصد شباهت دارد. دلیل اصلی تفاوت در چند نوکلئوتید، احتمالاً به دلیل بروز جهش حذف در طی تکامل در طبیعت یا نوع سویه باشد (Akhtar et al., 2011; Chen et al., 2013; Matsuba et al., 2013). به‌طور کلی توالی به‌دست‌آمده شباهت زیادی با ژن کلسترول‌اکسیداز سویه‌های دیگر باکتری موجود در NCBI داشت، که نتایج توالی‌یابی این پژوهش را مورد تأیید قرار می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم کلسترول‌اکسیداز به‌عنوان یک آنزیم پر کاربرد تجاری دارای کاربردهای وسیع در حوزه‌های پزشکی، صنعت و کشاورزی است. این آنزیم به‌عنوان نسل جدیدی از آفت‌کش‌های بیولوژیکی دارای مکانیسم عملی متفاوت نسبت به سایر آفت‌کش‌های بیولوژیکی است. از این‌رو ژن‌های کلسترول‌اکسیداز به‌عنوان آفت‌کش‌های قوی معرفی شده که می‌تواند در تولید گیاهان مقاوم در برابر آفات استفاده شود (Corbin et al., 2001). با بررسی جامعی که به‌عمل آمده تاکنون گزارشی مبنی بر مقاومت آفات نسبت به پنبه تراریخت شده با ژن کلسترول‌اکسیداز ارائه نشده است که محققان آن را به دلیل وجود کلسترول در غشای سلول‌های دستگاه گوارش همه آفات و عمل اختصاصی کلسترول‌اکسیداز در اکسیداسیون کلسترول غشاء می‌دانند (Badense et al., 2006). هم‌ردیفی توالی کامل *cho* تکثیر شده از روی DNA باکتری توسط جفت آغازگرهای اختصاصی نشان داد که این توالی در باکتری‌های

تولید کننده کاملاً حفظ شده است. که خود دال بر اهمیت و کلیدی بودن این آنزیم می باشد. بنابراین در این پژوهش ژن *cho* با PCR جدا شد و در مکان برشی مشابه در ناقل بیانی pET23a که برای تولید آنزیم خالص کلسترول اکسیداز به کار می رود همسانه سازی شد. این قطعه الحاقی *cho* پائین دست پیشبر قوی ویروسی T7 و بالادست خاتمه دهنده قوی ویروسی در pET23a قرار گرفت. پلاسمید نو ترکیب از طریق واکنش زنجیره ای پلی مرارز و هضم آنزیمی مشخص شد. پلاسمید نو ترکیب برای بیان پروتئین نو ترکیب آماده می باشد تا در طی مراحل تحقیقاتی آینده به عنوان یک کلون بیانی جهت استفاده در بخش کشاورزی به عنوان آفت کش بیولوژیک نقش آن ها ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مسئولین و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی لرستان و دانشگاه پیام نور به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1. Akhtar T.A., Matsuba, Y., Schauvinhold, I., Yu, G., Lees, H.A., Klein, S.E. and Pichersky, E. 2013. The tomato *cis*-prenyltransferase gene family. *Plant J.* 73: 640-652.
2. Badense, M.L., Hurtado, M.A. and Liacer, G. 2006. Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. *Plant Breeding* 119: 157-160.
3. Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J. and Pichersky, E. 2011. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* 66: 212-229.
4. Corbin, D., Greenplate, J., Wong, E. and Purcell, J. 1994. Cloning of an insecticidal cholesterol oxidase gene and its expression in bacteria and in plant protoplasts. *Appl. Environ Microbiol*, 60:4239-4244.
5. Corbin, D.R., Grebenok, R.J. and Ohnmiess, T.E. 2001. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* 126(3): 1116-1128.
6. Dayanand, A. and Patil, S.R. 2003. In: Detection of potential fungal isolates for the production of pectinase from deseeded dried sunflower head.
7. Doukyu, N. 2009. Characteristics and Biotechnological Applications of Microbial Cholesterol Oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5): 825-837.
8. Etebari, K. and Matindost, E. 2008. Introduced a number of proteins insecticide as a fourth-generation pesticides Olive Special Edition (1). (In Persian)

9. Kumari, L. and Kanwar, S. 2012. Cholesterol Oxidase and Its Applications. *Advances in Microbiol.* 2: 49-65.
10. Matsuba, Y., Nguyen, T.T.H, Wiegert, K., Falara, V., Gonzales-Vigil, E., Leong, B., Schafer, P., Kudma, D., Wing, R.A., Bolger, A.M., Usadel, B., Tissier, A., Fernie, A.R., Barry, C.S. and Pichersky, E. 2013. Evolution of complex locus for Terpene biosynthesis in Solano, *The Plant Cell.* 25: 2022-2036.
11. Omidbegi, R. 2010. Approaches to production and processing of medicinal plants. Published by Tarahan Nashr. Designers Publications, pp. 173-161. (In Persian)
12. Patil, S.R. and Dayanand, A. 2006. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology.* 97(18): 23-40.
13. Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Jennings, M.G., Ryerse, J.S., Pershing, J.C., Sims, S.R., Prinsen, M.J., Corbin, D.R., Tran, M., Sammons, R.D. and Stonard, R.J. 1993. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1406-1413.
14. Rashno, M. 2014. Identification, isolation and biochemical activities of the enzyme cholesterol oxidase compared Lorestan soil indigenous bacteria for use as biological pesticides cotton, M.Sc. Thesis. Payame Noor University, Tehran. (In Persian)
15. Sharma, A. and Gupta, M.N. 2001. Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotech. Letters.* 23(19): 1625-1627.
16. Somkuti, G.A., Solaiman, D.K.Y. and Steinberg, D.H. 1992. Expression of *Streptomyces sp.* cholesterol oxidase in *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:330-334.
17. Turfitt, G.E. 1994. The microbiological degradation of steroids: 2. Oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* spp. *Biochemical Journal.* 38(5): 492-496.
18. Volontè, F., Pollegioni, L., Molla, G., Frattini, L., Marinelli, F. and Piubelli, L. 2010. Production of Recombinant Cholesterol Oxidase Containing Covalently Bound FAD in *Escherichia coli*, *BMC Biotechnology,* 10: 33-35.
19. Yang, J.Y., Li, Y., Chen, S.M. and Lin, K.C. 2011. Fabrication of a cholesterol biosensor based on cholesterol oxidase and multiwall carbon nanotube hybrid composites. *International Journal of Electrochemical Science,* 6: 2223-2234.

Cloning of cholesterol oxidase gene from Iranian strain of *Rhodococcus* for production of cotton biological pesticide

S. Bahrami¹, M. Tohidfar², M.A. Ebrahimi³ and *H. Esmacil Lashkarian⁴

¹M.Sc in Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

²Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technology, ShahidBeheshti University, Tehran, Iran.

³Associate Professor, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

⁴Assistant Professor, Department of Genetic and Biochemistry and Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran.

Received: 2016/3/11 ; Accepted: 2016/7/17

Abstract

Cholesterol oxidase enzyme, as a new generation of biological pesticides, has pesticides strong effect on the pest to cotton *Heliothisarmigera*. The mechanism of action of cholesterol oxidase fatality related to the oxidation of cholesterol in the membranes of insect midgut epithelial which leads to physical destruction and the resulting disturbances in membrane structure and function and eventually death of the insect. In order to retrofitting genetically engineered plants against pests, production of them with the gene coding for cholesterol oxidase enzyme, require the best method for expression level and activity of this enzyme. Therefore, this study aimed to clone cholesterol oxidase enzyme in plasmid pET23a for possible guidance recombinant protein produced in bacterial periplasmic space. *Rhodococcus sp. strain 502 that produce high level of cholesterol oxidase, was used* for gene isolation by PCR. The PCR product was sub cloned in plasmid pJET, subsequently for expression was cloned in pET23a, eventually was transformed into the host *E.coli* DH5 α . Recombinant plasmid pET23a CHO was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The results of sequencing showed high similarity between our isolated gene sequence and the other cholesterol oxidase gene sequences in NCBI that can be used for production of biological pesticide.

Keywords: Cholesterol oxidase, Cloning, pET23a, Cotton biological pesticides

*Corresponding author; hamedesmailli@gmail.com