

# کلونینگ و بیان ژن آنزیم ضد قارچ نو ترکیب 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 فراوان ترین پلی ساکاریدهای طبیعی است که جزء اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از موجودات است. کیتینازها، آنزیم‌های اصلی کاتالیزکننده کیتین به اجزاء مونومری و لیگومری آن هستند و می‌توانند به عنوان یک عامل ضد قارچ طبیعی استفاده شوند. هدف از این تحقیق کلونینگ و بیان ژن نو ترکیب 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 عمل کرد آن بررسی گردید. یافته‌ها: سازه نو ترکیب حاوی ژن کیتیناز تولید گردید. بیان ژن با ایجاد هاله در اطراف کلونی‌های باکتری نو ترکیب روی محیط حداقل شامل کیتین به عنوان منبع کربن مشاهده گردید. نتیجه‌گیری: ایجاد هاله در محیط حداقل حاوی کیتین نشان‌دهنده عمل کرد آنزیم کیتیناز نو ترکیب 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

بین هدف‌های کروموزومی ایجاد می‌شود. الحاق وکتورهای کلونینگ از طریق نو ترکیبی هم‌سان (همولوگوس) برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ در آزمایشگاه فرانک.ای.یانگ در دانشگاه روجستر 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

وکتورهای الحاقی ابزارهای مهمی در زیست‌شناسی مولکولی باسیلوس سوبتیلیس هستند. فرایند الحاق، نواحی خاصی در کروموزوم را به وسیله توالی‌های هم‌سان بر روی پلاسمید، مورد هدف قرار می‌دهد. اگر یک توالی هم‌سان وجود داشته باشد، یک کراس اور 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 اور دوگانه کاست‌های الحاقی

که با ایجاد جهش در دمین اتصال کیتین به کیتیناز، فعالیت آنزیم می‌تواند افزایش یابد، مثال با جای‌گزینی Phe با Trp687 ، 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 مواد 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.

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 به‌طور وسیعی گسترش یافت [۲].

کیتین، پلی‌ساکارید خطی مرتبط بتا [۱-۴] ان-استیل گلوکز آمین 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 ارگانسیم‌ها شامل باکتری‌ها، گیاهان، قارچ‌ها و حشرات یافت می‌شود. گیاهان کیتینازها را به‌عنوان دفاعی بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا تولید می‌کنند. به‌علت 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 ارگانسیم‌ها است [۱۲، ۱۳]. در نتیجه، کیتینازها دارای عمل‌کرد ضد قارچی بر علیه چنین ارگانسیم‌هایی 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 [۱۴، ۱۵]. بررسی‌ها نشان می‌دهند

جدول ۱. سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق

منبع	خصوصیات	سویه‌ها
Ahmadian et al., 2007	Chitinase chiS coding gene	Bacillus pumilis SG2
Kunst et al., 1997	trpC2	B. subtilis 168
Invitrogen Life Technologies		M15 اشریشیا کلی
Invitrogen Life Technologies	F <sup>-</sup> Φ80dlacZΔM15 endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) supE44 relA1 deoR Δ (lacZYA-argF) U169	DH5α اشریشیا کلی

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' GGGTCTAGAAAAGGAGGCGATTG GAAA Shine-Dalgarno spacer start codon	پرایمر بالادست در بالای ژن کیتیناز حاوی شاین دالگارنو و فاصله انداز بهینه شده
ChiSR1J	5' GG GCATC GAGCCCCTCTCTTTA 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

جدول ۴. مراحل واکنش PCR به همراه تعداد سیکل و زمان و درجه

حرارت لازم برای هر مرحله

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

برای خالص سازی DNA پلاسمیدی از ستون های jetquick (Genomed, Löhne Germany) استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل توالی ها در NCBI و با استفاده از نرم افزار آنالیز توالی (DNASTAR) انجام گرفت.

ترانسفورم DNA نو ترکیب به درون باکتری اشریشیا کلی. پس از انجام مراحل لیگاسیون و تهیه سلول های باکتریایی مستعد، محصول لیگاسیون با استفاده از شوک حرارتی به درون سلول ها منتقل شد.

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

پلاسمید الحاقی. pDHAFB به عنوان یک وکتور الحاقی

در این آزمایش استفاده گردید.

محیط های کشت و آنتی بیوتیک ها. از محیط های LB Brath و LB Agar حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر آنتی بیوتیک جهت کلونینگ استفاده گردید و برای بیان ژن مورد نظر محیط های مختلف LB Brath مورد بررسی قرار گرفت. آمپی سیلین و کانامایسین مورد استفاده به عنوان آنتی بیوتیک 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، واکنش ها PCR طبق جدول ۳ و ۴ انجام گردید.

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

مقدار	مواد
۵ میکرو لیتر	بافر 10X PCR
۴ میکرو لیتر	dNTPs Mi ۱mM
۳ میکرو لیتر	Mgso4 50 mM
۳ میکرو لیتر	پرایمر بالا دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۳ میکرو لیتر	پرایمر پایین دست ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر
۰/۵ میکرو لیتر	آنزیم Pfu DNA پلی مراز
۳ میکرو لیتر	الگو 100ng (cDNA)
۲۸/۵ میکرو لیتر	آب مقطر (آمیولی)
۵۰ میکرو لیتر	حجم نهایی

۱ ml از محیط TF1 حل شد سپس به بقیه محیط TF1 منتقل گردید. حجم ارلن بایستی ۱۰۰ ml باشد. سپس در دور rpm ۷۰ و در دمای ۳۷ درجه، تا رسیدن به  $OD_{600}=2.6$  با حرکت دورانی قرار داده شد. سپس ۱ ml از محیط TF1 به محیط TF2 منتقل و در ارلن ۲۰۰ ml با دور rpm ۴۰ و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به مدت ۱.۵ تا ۲ ساعت، با حرکت دورانی قرار داده شد. در انتها به ۰.۵ ml از محیط TF2، مقدار  $0.2 \mu g$  تا  $1 \mu g$  DNA اضافه گردید و در ویال ۱/۵ یا لوله شیشه‌ای استریل، در دور rpm ۴۰ و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد رسوب داده شد و رسوب، در ۱۰۰ میکرولیتر محیط حل و با میله شیشه‌ای استریل، روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک مناسب پخش گردید. پلیت کشت حداقل به مدت ۱۶ ساعت جهت رشد کلنی‌های مورد انتظار در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد 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 به دست آوردن پلاسمید نو ترکیب انجام گرفت. و بر روی محیط LB-agar حاوی آنتی بیوتیک امپی‌سیلین کشت داده شد. از سلول‌های مستعد بدون ناقل نیز به عنوان 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

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

$K_2HPO_4$	۱۴ gr
$KH_2PO_4$	۶ gr
$(NH_4)_2SO_4$	۲ gr
Trisodium citrate	۱ gr
$MgSO_4.2H_2O$	۰.۲ gr
Agar	۱۵ gr

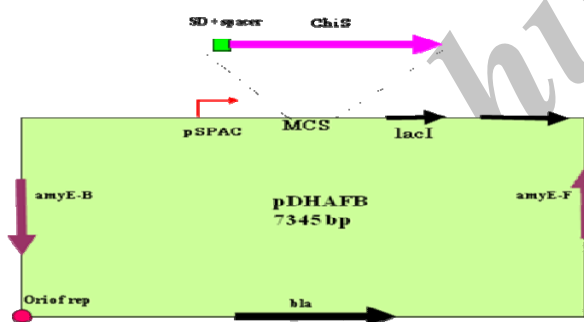
مقدار کمی  $CaCl_2$ ،  $MgCl_2$ ،  $ZnSO_4$ ،  $FeCl_3$  با غلظت نهایی ۱۰-۶ M در انتها اضافه می‌شود. ۴۰ ml از کیتین کلونیدی ۵٪ برای غلظت نهایی ۰.۲٪ اضافه می‌گردد. محیط BSS با اتوکلاو در دمای  $121^\circ C$  به مدت ۱۵ دقیقه استریل می‌گردد. Casamino acids یا casein hydrolysate با فیلتتر استریل می‌شود و سپس به محیط BSS سرد برای رسیدن به غلظت نهایی ۰.۱٪ (w/v) اضافه می‌شود.

ترانسفورم کردن طبیعی باکتری باسیلوس سوبتیلیس (Natural transformation). در این روش تهیه سلول مستعد و ترانسفورماسیون هم زمان صورت می‌گیرد. به طور 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 به ۵۰ ml محیط کشت LB استریل جدید به کار رفت و اجازه رشد باکتری در  $37^\circ C$  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  $OD_{600}$  ۰.۳ برسد. سپس ۳۵ ml از کشت باکتریایی به فالکن استریل منتقل، در دور rpm ۳۰۰۰، به مدت ۱۴ دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد 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

فنل - کلروفورم خالص سازی 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 می کنند. ترانسفورم شده ها روی پلیت آگار حاوی  $10 \mu\text{g/ml}$  کلرامفنیکل انتخاب می شوند.

انتقال کیتیناز (ChiS) به ژنوم باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸. ژن کیتیناز باسیلوس پومیلوس ChiS نام گذاری گردید. کل اپران chiS به وکتور الحاقی منتقل و ژن کیتیناز در جایگاه MCS وکتور pDHAFB که تحت کنترل پروموتور pSPAC و با IPTG لقاء می گردد قرار گرفت و به ژنوم باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸ الحاق گردید.

وکتور pDHAFB شامل ۲ منطقه هم سان در انتهای ۵' و انتهای ۳' لوکوس آمیلاز E (amyE) است. بنابراین، توالی کلون شده در جایگاه کلون سازی (MCS) به جایگاه بین ۲ جایگاه هم سان اضافه، و به لوکوس amyE باسیلوس سوبتیلیس طی کراس اوور دوگانه الحاق و عمل کرد ژن آمیلاز E از بین می رود (شکل ۳).

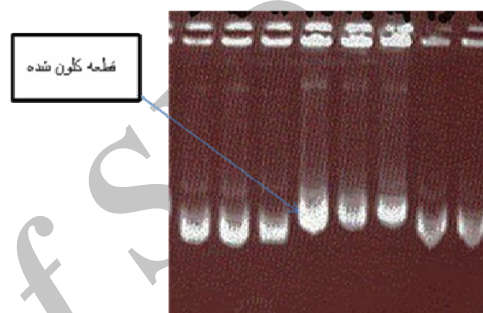


شکل ۳. نشان دهنده سازه ساخته شده مورد استفاده در انتقال ژن کیتیناز به لوکوس amyE باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸.

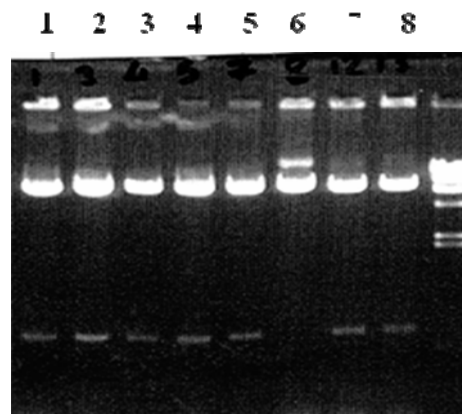
اثبات الحاق کیتیناز با استفاده از PCR. سوبیه های نو ترکیب در مدت ۸ ساعت رشد کرده و ژنوم شان استخراج و برای واکنش PCR به عنوان الگو استفاده می شوند. جهت ژن کیتیناز خلاف آمیلاز E است، اگر پرایمرها به لوکوس راست الحاق شوند، PCR باندی در حدود ۳ kb می دهد اما برای

پرش و پیدا کردن کلون های مثبت در E.coli را می توان در شکل ۱ مشاهده کرد.

اثبات کلونینگ با استفاده از برش آنزیمی. برای تایید کلونینگ ساختارهای کیتیناز در پلاسمید pDHAFB، پلاسمید با وزن مولکولی بیش تر با آنزیم HindIII برش می خورد. از آن جا که جایگاه برش HindIII یکی در MCS وکتور و دیگری در ژن کیتیناز (در جایگاه حدود ۷۵۰ bp) می باشد، برش با این آنزیم یک باند تقریباً در بالای باند ۷۵۰ bp ایجاد می کند (شکل ۲).



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

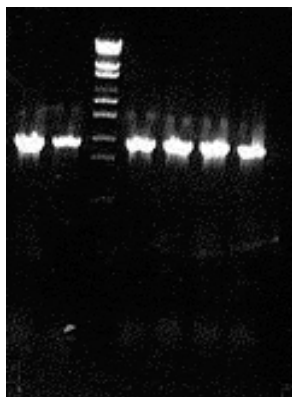


شکل ۲. ژل آگاروز نشان دهنده تایید کلونینگ کیتیناز (ChiS) در پلاسمید pDHAFB کلونی هایی با وزن مولکولی بیشتر در آزمایش jumping با HindIII برش می خورد. ردیف های ۲-۳ دارای pDHAFB-chiS می باشند. موقعیت نشان گر ( $\lambda$ HindIII) در سمت راست قرار گرفته است.

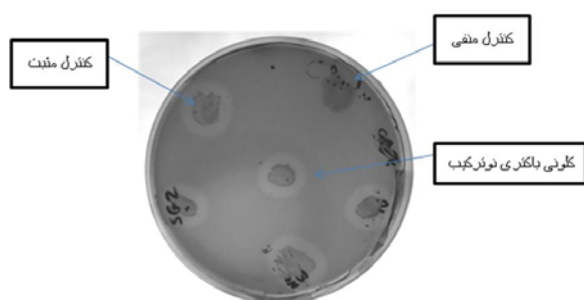
روش ترانسفورماسیون طبیعی باسیلوس سوبتیلیس. کلون های مثبت حاوی سازه پلاسمیدی هستند که با روش

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 بانندی در حدود ۱/۸ kb دادند که متناظر با طول کامل ژن کیتیناز می‌باشد (شکل ۶).

1 2 M 3 4 5 6



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

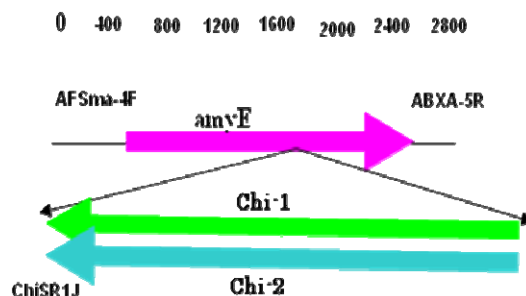


شکل ۷. ترانسفورم شده‌هایی که بر روی پلیت CIC رشد کرده اند (این محیط شامل LB آگار به علاوه ۰/۲٪ کیتین کلوییدی، IPTG در غلظت نهایی ۱mM و ۸ μg/ml کلرامفنیکل).

بررسی عمل کرد 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 پروموتور pSPAC القاء می‌کند. بعد از ۳ روز گرماگذاری در

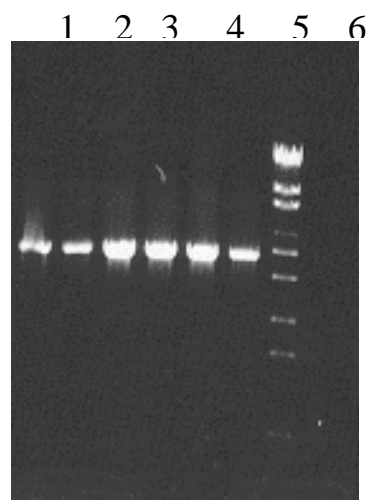
ترانسفورم نشده‌ها و سویه‌های وحشی باسیلوس سوبتیلیس هیچ بانندی مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).

## amyE Graphics



شکل ۴. می‌توان ترانسفورم شده‌ها را با انجام PCR و استفاده از پرایمرهای AFSma-4F و ABXA-5R بررسی کرد. (پرایمر طراحی شده از بیرون ژن آمیلاز E). گونه وحشی باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸ بانندی با طول ۲۵۷۷ bp می‌دهند و ترانسفورم شده‌ها این ژن را قطع و در آن قرار می‌گیرند؛ بنابراین بانندی بالاتر می‌دهند. پرایمر ABXA-5R برای ناحیه بالا دست لوکوس آمیلاز E و پرایمر ChiSR1J برای انتهای ژن کیتیناز طراحی شده‌اند محصولات PCR برای ترانسفورم شده‌های صحیح بانندی در حدود 3kb می‌دهند.

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 آمیلاز E از باسیلوس سوبتیلیس. در واکنش PCR از پرایمرهای ABXA-5R و ChiSR1J و ژنوم ترانسفورم شده‌ها به عنوان الگو استفاده می‌شود. ردیف ۶-۱ ترانسفورم شده‌هاست و ردیف ۷ گونه وحشی است

عوامل پاتوژن کیتین دار 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 نو ترکیب محقق می‌شود. از طرفی کیتیناز نو ترکیب 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

مolfان 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, Blommaert 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 subtilis* 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-

دمای  $30^{\circ}\text{C}$ ، 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 پروموتور Pspac در سازه pDHAFB-chiS را القاء می‌کنند. پلیت‌ها بعد از تلقیح ۲ روز در  $30^{\circ}\text{C}$  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. ارگانسیم‌هایی 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  $30^{\circ}\text{C}$ ، ایجاد می‌کنند. قطر هاله حتی در  $4^{\circ}\text{C}$  نیز افزایش 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 پومیلیس توسط سیستم ترشحی باسیلوس سوبتیلیس شناسایی می‌شوند. ایجاد هاله در اطراف کلون‌های حاوی کیتیناز نو ترکیب در محیط حداقل کیتین‌دار نشان‌دهنده تجزیه و مصرف کیتین به عنوان منبع کربن توسط باکتری‌های نو ترکیب می‌باشد. در این مقاله عمل‌کرد تجزیه‌ای آنزیم کیتیناز نو ترکیب در محیط حاوی کیتین نشان داده شد، تحقیقات بیش‌تر و دقیق‌تری در آینده لازم است که بیان و مقدار آنزیم کیتیناز نو ترکیب به طور دقیق و کمی اندازه‌گیری گردد. آنزیم کیتیناز در ارگانسیم‌های مختلف به عنوان یک عامل دفاعی و رقابتی بر علیه اجزای کیتینی سایر ارگانسیم‌ها عمل می‌کند. آنزیم کیتیناز در انسان و پستانداران در مقابله با

[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 complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 1997; 390: 249-256.

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.

Archive of SID



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

Mostafa Keshavarz (M.Sc)<sup>1</sup>, Meysam. Ahmadi Zeydabadi (M.Sc)<sup>1</sup>, Gholamreza Ahmadian (Ph.D)<sup>\*1</sup>  
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 chitinase gene in *Bacillus subtilis* in the treatment of fungal 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 primers, 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