مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره چهارم (پیاپی ۲۵) زمستان ۱۳۹۴
صفحات ۲۷۰-۲۶۴

Original Article

ایجاد سازواره ژنی گلوکاناز باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* در *اشریشیا کلی*

مرضیه شاولی[۱]، عباس دوستی*[۲]

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲] دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: غلات به عنوان تغذیه اصلی طیور مطرح می باشد. غلات دارای میزان قابل توجهی پلی‌ساکارید غیرنشاسته‌ای (NSP) محلول می‌باشند. NSP منجر به افزایش اثرات منفی و ناسازگاری در طیور می‌شوند. مکمل آنزیمی بتاگلوکاناز با تجزیه پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای ویسکوزیته محتویات هضمی دستگاه گوارش را کاهش می‌دهد و جذب روده‌ای را بالا می‌برد. این مطالعه با هدف ایجاد سازواره ژنی گلوکاناز باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* در باکتری *اشریشیا کلی* انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز توالی کامل ژن گلوکاناز از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* تکثیر شد. پس از خالص سازی، ژن *bgl* با استفاده از روش T/A Cloning در وکتور pGEM کلون گردید. سپس ساختار پلاسمیدی pGEM-*bgls* در باکتری *اشریشیا کلی* سویه Top-10 ترانسفورم شد. باکتری ترانسفورم شده به محیط جامد LB محتوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) منتقل شد. پلاسمید نوترکیب ترانسفورم شده در *اشریشیا کلی* سویه Top-10 و کلنی های حاوی پلاسمید به روش PCR انتخاب شد. تایید نهایی سازواره حاصل به روش هضم آنزیمی صورت گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که همسانه‌سازی ژن گلوکاناز در باکتری *اشریشیا کلی* به درستی صورت گرفته است. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز همسانه سازی ژن ۷۶۷ جفت بازی گلوکاناز را تایید نمود.

نتیجه گیری: این پژوهش با ساخت سازواره ژنی گلوکاناز از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* و کلون کردن آن در باکتری *اشریشیا کلی* می‌تواند کاندیدای جدیدی در تولید پروبیوتیک برای دام و طیور معرفی نماید.

واژگان کلیدی: β-گلوکاناز، *باسیلوس سوبتیلیس*، همسانه‌سازی T/A.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۳

مقدمه

خوراک و تغذیه طیور به ویژه جوجه های گوشتی یکی از مهمترین مسائل مورد توجه در پرورش طیور می باشد که بیش از ۵۰ درصد از هزینه ها را به خود اختصاص داده است (۱). قسمت اصلی تغذیه طیور را غلات تشکیل می دهند. غلات دارای میزان قابل توجهی پلی ساکارید غیرنشاسته‌ای (Non-Starch Polysaccharides=NSP) محلول می‌باشند. NSP منجر به افزایش اثرات منفی و ناسازگاری در طیور می‌شوند. تحقیقات نشان می‌دهد که میزان NSP مواد خام مورد نظر همراه با آنزیم‌های میکروبی کاهش یافته و کیفیت غذا بهبود می‌یابد. برخی از غلات به دلیل داشتن NSP بالا در جیره غذایی کمتر استفاده می‌شوند (۲). مکمل آنزیمی بتاگلوکاناز با تجزیه پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای ویسکوزیته محتویات هضمی دستگاه گوارش را کاهش می‌دهد و جذب روده‌ای را بالا می‌برد (۳).

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد به طور قابل توجهی نیاز استفاده از آنزیم را در گذشته کاهش می‌داد. در سال ۲۰۰۶

*) آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰ پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

اتحادیه اروپا استفاده از تمام آنتی بیوتیک‌های محرک رشد مورد استفاده در جیره غذایی دام و طیور و همچنین حیوانات دیگر را ممنوع اعلام کرد. اداره غذا و دارو در ایالات متحده آمریکا نیز استفاده از اکثر آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد را ممنوع کرده است. به همین دلیل محققین به دنبال یافتن مواد افزودنی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد می‌باشند (٤). روش جدیدی که با استقبال قابل قبولی در صنعت پرورش دام و طیور رو به رو شده است، استفاده از پروبیوتیک‌ها می باشد. پروبیوتیک‌ها مکمل غذایی میکروبی زنده‌ای هستند که با بهبود تعادل میکروبی روده، توان دفاعی میزبان را در برابر عوامل بیماری زا افزایش می دهد. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در روده حیوان ایجاد کلون کنند و پایدار شوند (٥).

باسیلوس ها (*Bacillus*)، باکتری های ساپروفیت، گرم مثبت، غیربیماری‌زا و دارای اسپور هستند که به طور طبیعی در هوا، آب، خاک و رسوبات یافت می‌شوند (٦). به دلیل عدم گزارش مبنی بر بیماری زا بودن *باسیلوس* برای دام و طیور، کاربرد آن به طور وسیعی در صنعت پرورش دام و طیور مورد قبول می باشد (٧). گونه‌های *باسیلوس* قادر به تولید آنتی‌بیوتیک ها، آمینو اسیدها و آنزیم‌ها می‌باشند. از این رو پروبیوتیک‌های *باسیلوس* ممکن است اثرات تغذیه‌ای مثبتی بر روی دام و طیور داشته باشند (٨). نتایج به دست آمده از تحقیقات نشان می دهد که خانواده باسیلاسه آنزیم اندولیتیک بتاگلوکاناز را به صورت خارج سلولی ترشح می‌کنند. یکی از بهترین اعضای این خانواده *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) است که این آنزیم را توسط ژن *bgls* کد می نماید (٩). آنزیم های بتاگلوکاناز با شکستن اتصالات بتاگلیکوزیدی میان زیرواحدها، بتاگلوکان موجود در دیواره سلولی غلات را به اجزای سازنده آن تجزیه می‌کنند (١٠). باکتری *اشریشیا کلی* یکی از باکتری‌های فلور طبیعی روده دام و طیور است. در نتیجه می‌تواند کاندیدای مناسبی در تولید پروبیوتیک برای دام و طیور و نیز کاهش هزینه های پرورش آنها باشد. هدف از این پژوهش، ایجاد سازواره ژنی گلوکاناز باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* در باکتری *اشریشیا کلی* بود.

مواد و روش‌ها

الف) استخراج DNA: DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران (DNP^{TM} KIT) از سویه استاندارد *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC 6633) تهیه شده از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، استخراج گردید.

ب) واکنش زنجیره‌ای پلی مراز: در این مطالعه به منظور تکثیر توالی کامل ژن گلوکاناز از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* از پرایمرهای:

Glu-F:5'-TTAGGTACCATGCCTTATCTGAAACGAG-3'

Glu-R:5-TACGAGCTCAGGTTCTTTCACATTTGG-3'

استفاده شد. پرایمرهای یاد شده از روی توالی موجود در بانک ژن جهانی با شماره ثبت X00754 و به کمک نرم افزار *Generunner* طراحی شدند.

به منظور تسهیل کلون‌سازی، در نزدیکی سر '5 هر یک از پرایمرهای Glu-F و Glu-R به ترتیب سایت برش آنزیم‌های *Kpn*I و *Sac*I (زیر این نواحی خط کشی شده)، قرار گرفت. اندازه محصول واکنش تکثیری برابر ٧٦٧ جفت باز می‌باشد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر شامل ٢/٥ میکرولیتر DNA الگو، ١ میکرومول از پرایمر های رفت و برگشت، ٢٠٠ میکرومول dNTPs Mix، ١/٥ میکرومول $MgCl_2$، ٢/٥ میکرومول بافر PCR(10X) و ١ واحد آنزیم SmarTaq پلی مراز انجام گردید. به منظور جلوگیری از آلودگی و تبخیر ٢ تا ٣ قطره روغن معدنی استریل به مخلوط واکنش اضافه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Master cycler Gradient, Eppendorf) ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ٥ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ٩٥ درجه سلیسیوس و در ادامه ٣٢ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ٩٥ درجه سلیسیوس به مدت ١ دقیقه، اتصال در دمای ٦٢ درجه سلیسیوس به مدت ١ دقیقه، طویل شدن در دمای ٧٢ درجه سلیسیوس به مدت ١ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ٧٢ درجه سلیسیوس به مدت ٥ دقیقه انجام گرفت.

Archive of SID

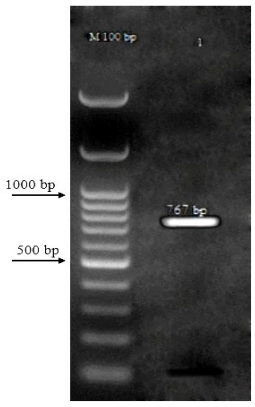
www.SID.ir

ج) *استخراج DNA از ژل:* محصول PCR با ژل آگاروز ۱ درصد دارای اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد. قطعه DNA مربوط به ژن گلوکاناز به وسیله تیغ اسکالپل بریده و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت (BIONNER) ساخت کشور کره جنوبی و مطابق با دستوالعمل شرکت سازنده، جداسازی گردید. برای اطمینان از صحت قطعه استخراج شده و کیفیت آن، ۳ میکرولیتر از آن را بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

د) *T/A Cloning:* برای این منظور محصول PCR تخلیص شده از ژل، با استفاده کیت شرکت (TOPO TA Cloning Kit) Invitrogen ساخت کشور آمریکا در وکتور pGEM کلون گردید. در ابتدا محصول الحاق شده (Ligation) در باکتری *اشریشیا کلی* سویه TOP-10 ترانسفورم و این باکتری در محیط جامد LB محتوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت و به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. از کلنی‌های رشد یافته با کمک کیت تخلیص پلاسمید شرکت (BIONNER) ساخت کشور آمریکا، استخراج پلاسمید انجام گرفت. سپس تایید صحت کلونینگ به کمک روش PCR انجام شد. به منظور تایید نهایی سازواره حاصل از روش هضم آنزیمی (Digest) با آنزیم های محدوگر *KpnI* و *SacI* استفاده گردید.

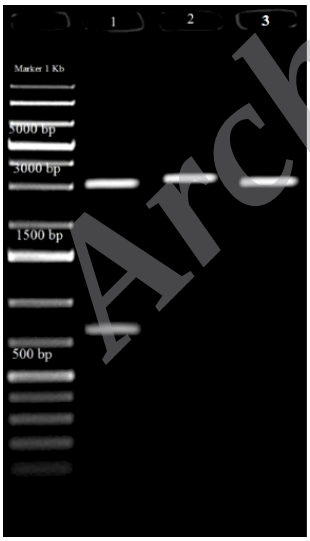
یافته ها

در این پژوهش، استخراج DNA ژنومی از باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* با موفقیت انجام شد. نتایج به دست آمده از الکتروفورز DNA تخلیص شده بر روی ژل آگاروز نشان داد که کیفیت آن برای آزمایشات مولکولی مناسب می باشد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن گلوکاناز باعث تکثیر قطعه ژنی با طول ۷٦۷ جفت باز گردید (شکل ۱). کلون‌سازی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به روش T/A Cloning در وکتور pGEM، به منظور ایجاد همسانه‌ای از ژن گلوکاناز، سازه pGEM-*bgls* تولید شد.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن *bgls* M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) محصول PCR که در راستای باند ۷٦۷ جفت بازی نشانگر DNA قرار گرفته است.

روش های مورد استفاده جهت تایید صحت همسانه‌سازی نشان داد که تعداد زیادی از کلون‌های حاصل، دارای سازه pGEM-*bgls* می‌باشند. همچنین هضم آنزیمی دوگانه با آنزیم‌های *KpnI* و *SacI* بر روی پلاسمیدهای خالص‌سازی شده، حضور قطعه ژنی ۷٦۷ جفت بازی مربوط به ژن گلوکاناز در وکتور pGEM را تایید نمود (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی سازه pGEM–*bgls* . ستون ۱) پلاسمیدهای نوترکیب برش خورده با آنزیم های *SacI* و *KpnI*، یک قطعه ۷٦۷ جفت بازی که قطعه ژنی مورد نظر می باشد و یک قطعه ۳۰۱۵ جفت بازی که پلاسمید pGEM خطی شده می باشد، ستون ۲) پلاسمید نوترکیب حاوی سازه *bgls*، ستون ۳) پلاسمید pGEM بدون ژن مورد نظر، M) مارکر ۱ کیلوجفت بازی.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

سلولازها گروهی از آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند که قادر به تجزیه سلولز، همی‌سلولز و لیگنین می‌باشند. این گروه آنزیمی بر پیوندهای 1,4-β,3,1-β وابسته به β-D-گلوکان به طور متناوب اثر می‌گذارند و باعث کاهش طول پلیمر و افزایش غلظت از طریق کاهش قند می‌شوند. آنزیم‌های گلوکانازی در این گروه آنزیمی قرار می‌گیرند (۱۱ و ۱۲). آنزیم گلوکاناز مقاومت قابل توجهی در برابر حرارت و شرایط اسیدی دارد. این ویژگی منحصر به فرد باعث شده که از این آنزیم در طیف وسیعی از برنامه‌های کاربردی بیوتکنولوژی مانند صنعت جوش، تولید خوراک دام و مدیریت مواد زاید استفاده‌ی گسترده‌ای شود (۱۲).

با توجه به گسترش مصرف انواع مواد افزودنی در غذا و افزایش چشمگیر تولید فرآورده های دام و طیور در جهان، به راحتی می توان حجم و میزان دارو و مواد شیمیایی که به عنوان یک آلاینده محیط زیست را تهدید نموده و سلامت مصرف کنندگان این قبیل فرآورده ها را به مخاطره می افکند، برآورد نمود. با این وجود، به دلیل نقش ارزنده این ترکیبات در افزایش بهره وری در تولیدات دام و طیور، در اکثر موارد استفاده مکرر از آنها اجتناب ناپذیر گردیده است. به همین دلیل داشتن انواعی از افزودنی ها که ضمن حفظ ویژگی های مطلوب و نداشتن اثرات نامناسب بهداشتی و زیست محیطی، همواره توجه پژوهشگران در سطح جهان را به خود معطوف داشته است. بدین منظور یافتن راه حلی برای این مشکلات ضروری به نظر می رسد (۱۳).

در مطالعه حاضر ژن *bgls* باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* جداسازی و سپس کلون سازی آن در وکتور pGEM انجام شد. وجود یک باند اختصاصی نشان داد که توالی مشابه ای برای جفت شدن آغازگرهای مورد استفاده در محل های دیگر ژنوم وجود نداشته است. در مطالعات مختلف پژوهشگران از وکتورهای متفاوتی به منظور کلون سازی استفاده نموده اند. در پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ توسط ژائو (Zhao) و همکاران انجام شد، ژن β-4,1-گلوکاناز از فیلافورا (*Phialophora* sp.G5) جداسازی و درون وکتور pGEM-T easy کلون گردید. آنزیم تولید شده ۷۰ درصد از فعالیت خود را در شرایطی شبیه به اسید معده حفظ نمود. این امر آنزیم را برای کاهش ویسکوزیته خوراک جو و لوبیا برای دام و طیور مناسب می کند (۱۳).

آفتاب (Aftab) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با جداسازی و کلون سازی ژن گلوکاناز از باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* (*Bacillus licheniformis*) در وکتور pTZ57R/T و سپس ترانسفورم وکتور نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلی* مستعد، مشاهده نمودند که آنزیم تولید شده توسط باکتری یاد شده بسیار بهتر از آنزیم به دست آمده از دیگر موجودات بوده است (۱٤). تیویت (Tuyet) و همکاران ژن β-4,1-گلوکاناز موجود در *باسیلوس سوبتیلیس* را در *اشریشیا کلی* به واسطه وکتور pCR2.1 کلون کردند (۱۲). در پژوهشی که توسط اوزکان (Özcan) و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، ژن گلوکاناز از سلولوزی *میکروبیوم سلولانس* توسط PCR تکثیر و درون وکتور pUC18 کلون گردید. سپس قطعه ژن تخلیص شده درون وکتورهای pTEG5 و pTEG11 منتقل شد. وکتورهای نوترکیب درون *اشریشیا کلی* مستعد ترانسفورم شدند (۱۵).

کیو (Qiao) و همکاران با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز ژن گلوکاناز را از *باسیلوس سوبتیلیس* MA139 جداسازی و درون وکتور pUCm-T منتقل نمودند. وکتور نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلی* سویه DH5α به عنوان میزبان ترانسفورم گردید (۱٦).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر به دلیل استفاده از تجهیزات ساده، از امکان تکرارپذیری بالایی برخوردار می باشد و نتایج قابل ملاحظه ای را برای تحقیقات بعدی فراهم می نماید.

با وجود اینکه هضم آنزیمی و تکثیر محصول PCR نشان دهنده صحت کلون سازی ژن *bgls* در باکتری *اشریشیا کلی* می باشد، ضروری است که قبل از انجام هرگونه اقدام به منظور بیان این

Archive of SID
www.SID.ir

ژن، توالی نوکلئوتیدی ژن کلون شده حداقل دوبار در هر دو جهت توالی یابی گردد. وجود ژن در ناقل pGEM سبب در دسترس بودن این کلون برای آزمایشات تکمیلی و بیان در محدوده وسیعی از ناقلین خواهد بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل حمایت های علمی و همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Golian A, Moini S, Mazhari M. Feed Poultry. 3nd ed. Pajouhesh and Tose Keshavarzi Kosar. 2009. [In Persian]

2. Ribeiro T, Lordelo MMS, Ponte PIP, Maçãs B, Prates JAM, Aguiar Fontes M, Falcão L, Freire JPB, Ferreira LMA and Fontes CMGA. Levels of endogenous â-glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry. Poult Sci. 2011; 90(6): 1245-1256

3. Khattak FM, Pasha TN, Hayat Z, Mahmud A. Enzymes in poultry nutrition. J Anim Pl Sci. 2006; 16(1-2): 1-5.

4. Hajati H, Rezaei M, Hassan Abadi A. Effects of different diets and enzyme supplementation on performance of broiler chickens. Iran J Anim Sci Res. 2012; 4(3): 182-190.

5. Dankowiakowska A, Kozawska I, Bednarczyk M. Probiotics, prebiotics and snybiotics in poultrmode of action, limitation and achivments. J Cent Eur Agric. 2013; 14(1): 467-478.

6. Økstad OA, Kolstø AB. Genomics of *Bacillus* species. In: Wiedmann, M, Zhang, W (Eds.). Food microbiology and food safety. 7 nd ed. New York. Springer. 2011. pp: 29-31.

7. Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in Penaeusvannamei. Aquaculture. 2004. 233(1-4): 1-14.

8. Kamgar M, Pourgholam R, Ghiasi M, Ghane M. Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge infections. Adv Stud Biol. 2013; 5(1): 37-50.

9. Furtadoa G, Ribeiroa L, Santosb C, Tonolib C, Souzab A, Oliveirab R, Murakamib M, Wardc R. Biochemical and structural characterization of a β-1,3–1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. Process Biochem. 2011; 46(5): 1202-1206.

10. Bahramsari N, Zamani M. β-1,3-glucanase production in Trichoderma isolates. Iran J Biol. 2010; 18(3): 261-271. [In Persian]

11. Jung Y, Yoo J, Lee Y, Park I, Kim S, Lee S, Yasuda M, Chung S, Larkchoi Y. Purification and characterization of thermostable β-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus* sp. A8-8. Biotechnol Bioprocess Eng. 2007; 12(3): 265-270.

12. Tuyet P, Quoc V, Gia L, Kim T, Man Dinh T. Molecular cloning gene and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4-β-glucanase from *Bacillus* sp. VLSH08 strain applying to biomass hydrolysis. J Viet Env. 2012; 3(2): 80-86.

Archive of SID

www.SID.ir

13. Zhao J, Shi P, Yuan T, Huang H, Li Z, Meng K, Yang P, Yao B. Purification, gene cloning and characterization of an acidic β-1,4-glucanase from *Phialophora* sp. G5 with potential |applications in the brewing and feed industries. J Biosci Bioeng. 2012; 114(4): 379-384.

14. Aftab S, Aftab M, Ul-Haq I, Javed M, Zafar A, Iqbal I. Cloning and expression of endo- 1,4–β-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 into *Escherichia coli* BL21 (DE 3). Afr J Biotechnol. 2012; 11(12): 2846-2854.

15. Özcan B, Özcan N, Baylan M, Guzel A. Cloning and expression of β-1,3-glucanase gene from *Cellulosimicrobium cellulans* in *Escherichia coli* DH5α. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2013; 19 (3): 523-528.

16. Qiao J, Dong B, Li Y, Zhang B, Cao Y. Cloning of a beta-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its functional expression in *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 152(2): 334-342.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 4, January 2016

Original Article

Construction of glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*

Marzieh Shavali[1], Abbas Doosti[2]

[1]M.Sc., Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran.
[2]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background & Objectives: The grains are considered as the main food for poultries. Grains contain significant content of non- soluble starch polysaccharides (NSP). NSPs cause negative impact and incompatibility in birds. Digestion of NSP contents by β-glucanase enzyme supplement reduces the viscosity of polysaccharides in the digestive tracts, and increases their intestinal absorption. The aim of this study was to construction of glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli.*

Materials & Methods: In this experimental study, the glucanase gene of *B. subtilis* was amplified using specific primers and polymerase chain reaction. After purification of the bands, *Bgl* gene was cloned by T/A cloning technique in pGEM vector, and was transformed in *E. coli*. Afterward, the pGEM-bgl was transferred into *E. coli* Top-10 strain. The recombinant vectors were then transformed into *E. coli* competent cells, and the recombinants were plated on LB agar containing 100 µg/ml ampicillin. The recombinant plasmid transformed to *E. coli* Top10 cell and the colonies carrying plasmid were selected by PCR. The presence of glucanase construction was confirmed by enzymatic digestion.

Results: The results showed that the glucanase gene was successfully cloned in *E. coli*. The results of cloning of 767 bp glucanase gene was confirmed by PCR assay.

Conclusion: The construction of *B. subtilils* glucanase gene and cloning of this gene in *E. coli* is a strong alternative for the production of probiotic used for poultry.

Keywords: β-glucanase, *Bacillus subtilis*, T/A Cloning.

Correspondence to: Abbas Doosti

Tel: +98 9133838830

E-mail: abbasdoosti@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 8(4): 264-270.

Archive of SID

www.SID.ir