مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۶، خرداد ۱۳۹۵، صفحه ۷۲-۶۶

همسانه سازی و ساخت وکتور بیانی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم

بنت الهدی عربپور (MSc)[۱]، ابوالقاسم اسماعیلی (PhD)*[۲]، محمد ربانی (PhD)[۲]

۱-گروه زیست فناوری،دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه اصفهان
۲-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

دریافت: ۹۴/۸/۲۲، اصلاح: ۹۴/۱۰/۱۶، پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

خلاصه

سابقه و هدف: گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینه چهار کربنه غیر پروتئینی است که در درمان فشارخون، دیابت، التهاب و افسردگی می تواند بکار رود. گابا توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بسیاری از موجودات شامل باکتری‌ها سنتز می شود. از اینرو همسانه سازی این آنزیم جهت بهینه‌سازی تولید گابا اهمیت دارد. هدف از این پژوهش همسانه سازی و ساخت وکتور بیانی حاوی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTC1058 است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی خصوصیات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، ژنتیکی و توالی یابی 16s rDNA سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*۱۰۵۸ بررسی شد. سپس DNA ژنومیک این باکتری جدا و با استفاده از PCR ژن گلوتامات‌دکربوکسیلاز تکثیر شد. سپس این ژن در حامل کلونینگ pJET1.2/Blunt وارد و در حامل pET32a ساب کلون گردید. حامل پلاسمید بیانی pET32a-gad در *اشریشیاکلی* سویه BL21 ترانسفورم گردید و بیان پروتئین با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: بررسی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیکی توالی یابی 16srDNAنشان داد که زیر سویه مورد بررسی مربوط به سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است. نتیجه توالی یابی قطعه تکثیرشده با استفاده از PCR وجود ژن گلوتامات دکربوکسیلاز را نشان داد. در پایان نتیجه کلنیPCR و آنالیز SDS-PAGE، صحت همسانه‌سازی و بیان آنزیم در سویه نوترکیبBL21 را تأیید کرد.

نتیجه گیری: این مطالعه همسانه سازی موفق ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*۱۰۵۸ را نشان داد. ژن همسانه سازی شده می تواند در سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی سریع رشد و استفاده از محیط کشت‌های ارزان‌تر و حتی پسماندهای غیرقابل بازیافت به کار رود.

واژه‌های کلیدی: همسانه سازی، گاماآمینوبوتیریک اسید، گلوتامات دکربوکسیلاز، لاکتوباسیلوس.

مقدمه

گاماآمینوبوتیریک اسید (گابا) یک اسیدآمینه چهارکربنه است که در ساختار پروتئینها یافت نمی‌شود (۱). گابا به عنوان یک انتقال‌دهنده عصبی مهاری در دستگاه اعصاب مرکزی و همچنین در بافت‌های محیطی تعداد زیادی از موجودات پذیرفته شد (۸-۲). گابا عملکردهای مهمی شامل کاهش فشارخون (۱۰-۸و۶)، ادرارآور (۱۱و۱)، آرام‌بخش، درمان بی‌خوابی و افسردگی (۱۲)، بیماری‌های خود ایمنی (۱۳)، درمان بیماری‌های مزمن مربوط به مصرف الکل (۱۴)، کاهش التهاب (۱۶و۱۵)، محرک سلول‌های ایمنی (۱۷)، مهار دیابت (۱۸)، خواص ضد توموری (۱۹)، انتشار اسیدهای آمینه آزاد، بهبود سلامت اعصاب و روان انسان (۲۰) درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی مانند صرع، پارکینسون، شیزوفرنی، اسپاسم و آلزایمر (۲۱) دارد. بنابراین در پزشکی و حتی در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۲۲). گابا به طور گسترده‌ای در طبیعت در میان ریزسازواره‌ها (مانند باکتری‌ها، قارچها و مخمرها)، گیاهان و حیوانات وجود دارد. آنزیم کاتالیز کننده واکنش غیرقابل‌برگشت دکربوکسیلاسیون L-گلوتامات برای تولید گابا، گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز وابسته به پیرودوکسال فسفات است (۱). گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسیدلاکتیک یک آنزیم درون سلولی (۲۴و۲۳و۴) است که در پاسخ به استرس اسیدی القا می‌شود (۲۵). اختلاف در ساختار اولیه این آنزیم می‌تواند در توانایی آن در تولید گابا تأثیر بگذارد (۲۳). از جمله اهداف همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (*gad*)، تهیه و یا دستیابی به باکتری‌های نوترکیبی است که علاوه بر قابلیت استفاده از محیط کشت ارزانتر، توانایی تولید گابای بیشتر داشته باشند. تاکنون طول کامل ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پاراکازیی7415 NFRI (۲۳)، لاکتوباسیلوس برویس OPK-3 (۲۶)، لاکتوباسیلوس برویس IFO12005 (۹) و لاکتوکوکوس لاکتیس 01-7 (۲۷) و قطعات اصلی از ژن گلوتامات دکربوکسیلازB از لاکتوباسیلوس پاراکازیی PF6 لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس PR1، لاکتوباسیلوس لاکتیسPU1 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم C48 همسانه‌سازی و تعیین توالی شده‌اند (۱۱). علاوه بر این ژن

▣ این مقاله حاصل پایان نامه بنت الهدی عربپور دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی و طرح تحقیقاتی به شماره طرح شماره ۹۰/۹۷۸۸۶ دانشگاه اصفهان می باشد.
* مسئول مقاله: دکتر ابوالقاسم اسماعیلی
آدرس: اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن: ۳۷۹۳۲۴۹۰ -۰۳۱
E-mail:aesmaeili@sci.ui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس برویس OPK-3 (۲۷) به طور موفقیت آمیزی در باکتری اشرشیاکلی بیان شدند و همچنین ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از باکتری لاکتوباسیلوس برویس OPK-3 به طور موفقیت‌آمیزی در *باسیلوس سابتیلیس* بیان شد (۲۸). مطالعه منابع داخلی نشان می‌دهد که گابا در ایران تولید نمی‌شود و عمدتاً وارداتی است.

گاباپنتین، یک ماده درمانی آنالوگ گابا است. این ماده در ابتدا برای درمان صرع و همچنین تسکین دردهای نوروپاتیک استفاده می شد و در سال ۱۹۹۴ توسط FDA به منظور کنترل صرع تأیید شد (۲۹). گاباپنتین دارای عوارض جانبی متعددی مشتمل بر سرگیجه، خستگی، افزایش وزن، خواب‌آلودگی می‌باشد که این عوارض در دوزهای بالاتر در افراد مسن مشاهده شده است. بنابراین نباید به مدت طولانی مصرف شود (۳۰). با توجه به اهمیتی که گابا در پزشکی، بهداشت و نیز صنایع غذایی دارد هدف از این پژوهش همسانه سازی و ساخت وکتور بیانی حاوی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*PTCC1058 است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 از گروه میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان و سویه‌های BL21 و TOP10 از سازمان ملی پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهیه شدند.

کشت باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 و تأیید آن: در این پژوهش به منظور جداسازی ژن *gad* سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 در محیط کشت MRS (Man, Rogosa and Sharpes) (شرکت مرک) کشت داده شد. جهت تأیید سویه علاوه بر آزمایش‌ها بیوشیمیایی و مورفولوژیکی از واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای ژن 16srDNA با توالی AGGAGGTGATCCACCCGCA و DG47F RW01RAACTGGAGGAAGGTGGGGAT (تکاپوزیست) استفاده شد. بطور خلاصه ابتدا DNA ژنومی باکتری استخراج شد (کیت شرکت سیناژن) و سپس واکنش PCR متشکل از ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10x، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱ میکرو لیتر dNTP، ۱میکرو لیتر Mgcl2، ۰/۵ میکرولیترآنزیم Taq DNA Polymerase و در نهایت افزودن آب مقطر تزریقی تا حجم ۲۵ میکرو لیتر در ۳۰ سیکل (۹۴˚C - ۴۵ s، ۵۸˚C-۴۵s، ۷۲˚C -۶۰s) و در پایان انکوباسیون نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. محصول PCR خالص شده جهت توالی یابی به صورت یک بار خوانش به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. نتیجه توالی یابی 16srRNA، با برنامه BLASTn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http:/www,ncbi.nlm.nih.gov/BLAST بررسی شد.

تکثیر ژن گلوتامات دکربوسیلاز: آغازگرهای مربوط به ژن گلوتامات دکربوکسیلاز با استفاده از نرم‌افزار Oligo ۷ دارای جایگاه برش آنزیمی طراحی و ساخته شد (CGCGGATCCATGGCAATGTTATACGGTAAA PLANre-F و CCGGAATTCTCAGTGTGTGAATCCGTATTTCTT PLANre-R). جهت تکثیر ژن گلوتامات دکربوسیلاز، واکنش PCR همانند آنچه قبلا توضیح داده شد، انجام شد. جهت آشکارسازی نتایج PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و سپس مشاهده با دستگاه ژل داک صورت گرفت. در نهایت پس از خالص‌سازی محصول PCR، قطعه خالص شده جهت توالی یابی به صورت دو بار خوانش به شرکت تکاپوزیست تهران ارسال شد. قطعه استخراج و خالص شده با استفاده از کیت کلونینگ (CloneJET™ PCR Cloning Kit) به وکتور pJET1.2/Blunt (فرمنتاز) یا T/A وکتور، دارای انتهای صاف متصل شد. و مطابق پروتوکل های رایج تکثیر قطعه موجود در وکتور انجام گرفت. برای ترانسفورماسیون ناقل pJET1.2 نوترکیب، باکتری اشرشیاکلی سویه TOP10 بعنوان میزبان همسانه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

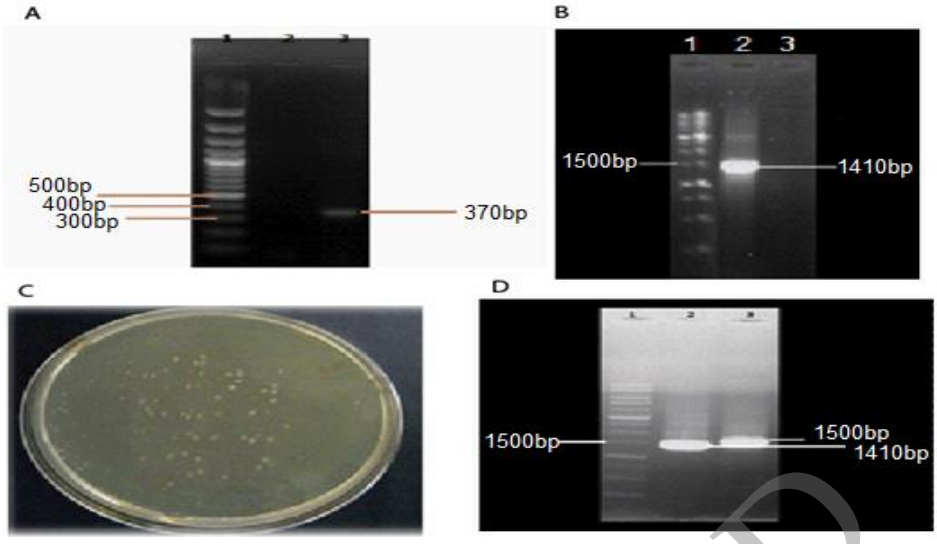
ساب کلونینگ ژن گلوتامات دکربوسیلاز در پلاسمید بیانی: استخراج پلاسمید از باکتری‌های دارای پلاسمید pET-32a(+) و pJET1.2 gad(+) انجام شد. آنزیم‌های محدودالاثر *Bam*HI (فرمنتاز) و*Eco*RI (فرمنتاز) جداگانه جهت هضم دو آنزیمی استفاده شدند. ناقل بیانی نوترکیب pET-32a(gad^{+})در سویه بیانی باکتری BL21 از قبل مستعد شده، با روش شوک حرارتی وارد شد و پس از رشد در محیط آنتی‌بیوتیک دار، از چند کلونی به طور تصادفی کلنی PCR انجام شد.

بررسی بیان ژن گلوتامات دِکربوکسیلاز با استفاده از آنالیز SDS-PAGE: بیان ژن گلوتامات‌دِکربوکسیلاز با افزودن IPTG ۰/۵ میلی‌مولار در یک کلنی از سویه BL21 نوترکیب در کشت داده شده در محیط LB آنتی-بیوتیک‌دار انجام و از آنالیز SDS-PAGE استفاده شد.

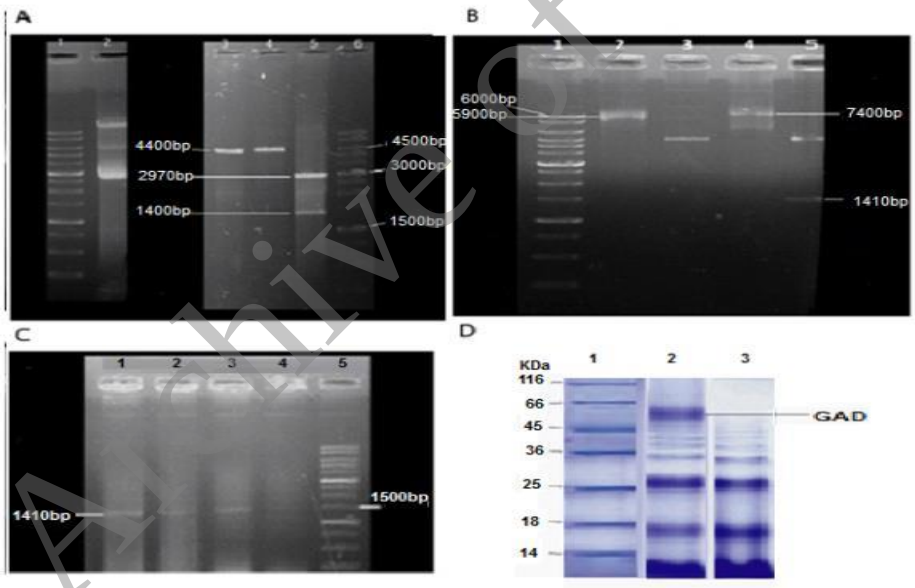
یافته ها

نتایج بررسی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی پس از مقایسه با جدول استاندارد برگی (http://www.bergeys.org/outlines.html، داده‌ها نشان داده نشده است) و آزمایش ژنتیکی توالی یابی 16sRNA (شکل۱A باند ۳۷۰ bp)، پس از بلاست و بررسی آن نشان داد سویه مورد بررسی باسیل گرم مثبت و کاتالاز منفی لاکتواسیلوس پلانتاروم است. کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج‌شده از باکتری‌لاکتواسیلوس پلانتاروم با کیت استخراج DNA سیناژن با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد که غلظت ۸/۱۶۹۳میکروگرم بر میلی‌لیتر و نسبت جذب۲۸۰/۲۶۰ برابر ۸۲/۱ برای نمونه استخراج‌شده به دست آمد و نتیجه الکتروفورز نیز کیفیت بالای آن را مشخص کرد. نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بر روی ژنوم استخراجی با آغازگرهای طراحی‌شده نشان دهنده یک باند ۱۴۱۰ bp است (شکل۱B) که نشان دهنده وجود ژن gad با طول کامل است. همانگونه که در شکل ۱C و ۱D مشاهده می‌شود الحاق ژن gad در T/A و کتور کلونینگ و همسانه‌سازی در سویه کلونینگ TOP10 با موفقیت انجام شده است. استخراج پلاسمید، خالص‌سازی و بررسی نتایج توالی یابی قطعه، تأیید کرد که قطعه خالص شده مربوط به یکی از زیر سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم است. نتایج کلنی PCR پلاسمید هم از سویه نوترکیب TOP10 و هم از سویه بیانی BL21 وجود ژن gad را تائید کرد (شکل۲Bو۲A). بررسی‌های SDS-Page، صحت همسانه‌سازی و بیان آنزیم را در سویه بیانی نوترکیب نشان داد (شکل ۲D و ۲C) هرچند برای تائید نهائی آزمایش وسترن بلات و یا سایر آزمایش‌ها لازم است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. (A): ستون۱:DNA Ladder 1kb. ستون۲: باندی در حدود ۳۷۰bp نتیجه PCR ژنوم باکتریلاکتوباسیلوسپلانتاروم PTCC 1058 با آغازگرهای DG47F و RW01R. (B): نتایج حاصل از ژل‌آگارز برای DNA استخراجی باکتریلاکتوباسیلوسپلانتارم PTCC 1058 با آغازگرهای PLANreF و PLANreR. ستون ۱:DNA Ladder 1kb ستون۲: ژنوم استخراج شده ۳: کنترل منفی. (C): باکتری‌های top10 نوترکیب حاوی T/A(gad+) وکتور رشدکرده بر روی پلیت LB حاوی آمپی‌سیلین. (D): نتایج کلنی PCRحاصل از کلنی تصادفی با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژنGAD و وکتورpJET1.2. ستون۱: DNALeader 1kb. ستون۲: کلنیPCR با استفاده از پرایمر های GAD.ستون ۳: کلنی PCR با استفاده ازپرایمر های وکتور.



شکل ۲. (A): ستون۱و۶: DNA leader 1kb. ستون۲: ناقلT وکتور حاوی ژن گلوتامات دِکربوکسیلاز. ستون۳ و۴: به ترتیب هضم تک آنزیمی ناقل T وکتور حاوی ژن گلوتامات دِکربوکسیلاز با EcoRI وBamHI . ستون ۵: هضم ۲ آنزیمی ناقل T وکتور حاوی ژن. (B): ستون۱،DNA Leader 1kb. ستون۲، ناقل بیانی pET-32a(+). ستون ۳، هضم ۲ آنزیمی ناقل بیانی pET-32a(+) با آنزیم‌های EcoR1 و BamHI. ستون ۴، ناقل بیانی pET-32a(+) حاوی ژن گلوتامات دِکربوکسیلاز. ستون ۵، هضم ۲ آنزیمی، pET-32a(gad+) با آنزیم های EcoRI و BamHI. (C): تأیید حضور قطعه در ناقل بیانی، نتایج کلنی PCRاز کلنی‌های pet32a(gad+) رشدکرده بر روی پلیت LB حاوی آمپی‌سیلین. ستون ۱،۲،۳ نتایج کلنی PCRاز ۳ کلنی متفاوت BL21 ترانسفورم شده با ناقلِ PET32-(a)+ نوترکیبِ حاوی ژن گلوتامات دِکربوکسیلاز. ستون۴کنترل منفی. ستون ۵ DNA Ladder1kb (D): نتیجه آنالیز SDS-Page. ستون۱، نشانگر پروتئین. ستون۲، آنزیم بیان‌شده در سویه نوترکیبBL21. ستون۳، عدم بیان آنزیم در سویه غیر نوترکیب BL21.

بحث و نتیجه گیری

مهمترین یافته این تحقیق همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTC1058 است. در این پروژه برای نخستین بار ژن کدکنندهِ آنزیم گلوتامات‌دِکربوکسیلاز از سوش لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 شناسایی، توالی یابی، همسانه‌سازی شد و وکتور بیانی آن ساخته و بیان آن بررسی شد. سویه نوترکیب به‌دست آمده توانایی رشد و تولید خوبی داشت و برای استفاده در صنعت غذا و داروسازی بسیار کارآمد می‌باشد. در سال ۱۹۹۱، GAD انسانی از کروموزوم ۱۰ جداسازی شد (۳۱). در سال ۱۹۹۷، ژن گلوتامات‌دِکربوکسیلاز از *لاکتوباسیلوس برویس* جداسازی، و ویژگی‌های آن

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی شد (۲۴). در سال ۱۹۹۹این ژن از *لاکتوکوکوس لاکتیس* جداسازی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد (۲۷). در سال ۲۰۰۶ ژن *gad* مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* OPK-3 در شاتل وکتور بنام pLip، همسانه‌سازی شد که فعالیت آنزیم بیان‌شده در سویه نوترکیب به مراتب بالاتر از فعالیت آن در *باسیلوس سوبتیلیس* بود (۲۸). در سال ۲۰۰۷ بعد از جداسازی تعدادی باکتری‌های اسیدلاکتیک از پنیر ایتالیایی ناحیه مرکزی ژن *gad* از این سویه‌ها جداسازی شد (۱۱). ژن *gad* از *لاکتوباسیلوس برویس* BH2 جداسازی، همسانه‌سازی شده و ویژگی‌های آن بررسی شد (۳۲). در سال ۲۰۰۷، ژن *gad* از *لاکتوباسیلوس برویس* OPK3 جداسازی شده و ویژگی‌های آن بررسی شد (۲۶).

در سال ۲۰۰۸ همسانه‌سازی ژن *gad* و تعیین خصوصیات آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* NFRI7415 انجام شد (۳۳). در سال ۲۰۰۸ همسانه سازی و بررسی توالی ژن *gad* باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* IFO12005 انجام شد (۹). در سال ۲۰۰۹، GAD از استرپتوکوکوس ترموفیلوس Y2 همسانه‌سازی شده و بیان آن بررسی شد (۱۰). ژن *gad* همچنین از باکتری‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی و روتری (۹) کازئی (۳۵و۳۴) نیز همسانه سازی شده است. در یک مورد نیز این ژن از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*ATCC1497*) جداشده و در شاتل وکتور بیانی (اکلای- لاکتوباسیلوس) (PTRKH2)، همسانه‌سازی و محصول(PTRKH2GAD)، در *لاکتوباسیلوس ساکئی B2-16*، بیان و مشاهده شد که *لاکتوباسیلوس ساکئی B2-16* نوترکیب ۴۲/۱-۳۵/۱ برابر افزایش تولید گابا را نشان داد (۳۶). این آنزیم می تواند در اختیار محققین جهت استخراج و خالص‌سازی آنزیم و تعیین خصوصیات آن و بهینه‌سازی بیان آنزیم و استفاده از تکنیک آنزیم تثبیت‌شده برای تبدیل مستقیم گلوتامات به گابا برای تولید آن در مقیاس بالا در صنعت قرار گیرد، زیرا استفاده از آنزیم نسبت به سلول کامل دارای مزیت‌هایی است که عبارت‌اند از: ۱- اختصاصی بودن واکنش‌های آنزیمی که مانع از تولید محصولات جانبی ناخواسته می‌گردد. ۲- آنزیم‌ها قابل‌تجزیه بوده و بنابراین آلودگی‌های محیطی کمتری را ایجاد می‌کنند. ۳- آنزیم‌ها می‌توانند در شرایطی از قبیل pH خنثی، دمای پایین و فشار اتمسفری نرمال فعالیت کنند و بنابراین باعث ذخیره انرژی می‌گردند، که این قابلیت‌ها در مقیاس صنعتی بسیار حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱۰۵۸ برای اولین بار انجام شد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

Cloning and Expression Vector Construction of Glutamate Decarboxylase Gene from Lactobacillus Plantarum

B. Arabpour (MSc)[1], A. Esmaeili (PhD)*[2], M. Rabbani (PhD)[2]

1. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran
2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(6); Jun 2016; PP: 66-72
Received: Mar 2th 2016, Revised: Nov 6th 2015, Accepted: Jan 6th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a four-carbon non-protein amino acid used in the treatment of hypertension, diabetes, inflammation, and depression. GABA is synthesized by glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme in many organisms, including bacteria. Therefore, cloning of this enzyme is essential to the optimization of GABA production. This study aimed to clone and construct the expression vector of GAD gene from *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 bacterium.

METHODS: In this experimental study, we investigated the morphological, biochemical, genetic and 16s rDNA sequencing of *L. plantarum* PTCC 1058 strain. Genomic DNA of the bacterium was isolated and amplified using the GAD gene via polymerase chain reaction (PCR). Afterwards, the gene was inserted into the pJET1.2/blunt cloning vector and subcloned in vector pET32a. Plasmid pET32a-gad expression vector was transformed in Escherichia coli BL21 strain, and protein expression was assessed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

FINDINGS: Morphological, biochemical and genetic analyses of 16s rDNA sequencing indicated that the studied substrain was of the L. plantarum strain. In addition, results of nucleotide sequencing of the fragmented segment via PCR showed the presence of GAD gene. Results of colony PCR and SDS-PAGE analysis confirmed the accuracy of the cloning and gene expression of the recombinant Escherichia coli BL21 strain.

CONCLUSION: According to the results of this study, cloning of GAD gene from *L. plantarum* PTCC 1058 was successful. These cloned genes could grow rapidly in prokaryotic and eukaryotic systems and be used in cost-effective culture media and even non-recyclable waste.

KEY WORDS: *Cloning, Gamma-aminobutyric acid, Glutamate acid decarboxylase, Lactobacillus plantarum.*

Please cite this article as follows:

Arabpour B, Esmaeili A, Rabbani M. Cloning and Expression Vector Construction of Glutamate Decarboxylase Gene from Lactobacillus Plantarum. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(6):66-72.

* **Corresponding author: A. Esmaeili (PhD)**
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran
Tel: +98 31 37932490
E-mail: aesmaeili@sci.ui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

References

1.Esmaeili A, Rabbani M B, Kheiri A. Cloning of glutamate decarboxylase and production of γ-aminobutyric acid from Lactobacillus brevis. Res Pharma Sci. 2012;7(5): 421.
2.Esmaeili A. Receptor subunits in rat testis and sperm. Int J Fertili and Steril. 2008;2(3):121-4.
3.Zaker SR, Esmaeili A, Bouzari M, Shirani E. Quantitative analysis of GABAA Gamma receptor subunits in the developing embryonic chick forebrain. Iran J Basic Med Sci. 2012;15(5):1097-1101.
4.Huang J, Mei L, Sheng Q, Yao S, Lin D. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of lactobacillus brevis CGMCC 1306 Isolated from fresh milk. Chin J Chem Engin. 2007;15(2):157-61.
5.Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT. Production of γ-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by Lactobacillus brevis GABA100. Intern J Food Microbiol. 2009;130(1):12-6.
6.Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. Amino Acids. 2010;39(5):1107-16.
7.Lu X, Chen Z, Gu Z, Han Y. Isolation of γ-aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. Biochem Engin J. 2008;41(1):48-52.
8.Mazur R, Kovalovská K, Hudec J. Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation conditions and microorganisms resources. J Microbiol, Biotechnol Food Sci. 2011;1(2):164-71.
9.Hiraga K, Ueno Y, Oda K. Glutamate decarboxylase from Lactobacillus brevis: activation by ammonium sulfate. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(5):1299-306.
10.Lin Q, Yang S, Lü F, Lu Z, Bie X, Jiao Y, et al. Cloning and expression of glutamate decarboxylase gene from Streptococcus thermophilus Y2. J Gen App Microbiol. 2009;55(4):305-10.
11.Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello C, Coda R, Gobbetti M. Synthesis of γ-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. App Environment microbiol. 2007;73(22):7283-90.
12.Esmaeili A, Lynch JW, Sah P. GABAA receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. J Neurophysiol. 2009;101(1):341-9.
13.Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. J Japan Soc Food Sci Technol. 2000;47(8):596-603.
14.Oh SH, Soh JR, Cha YS. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. J Med Food. 2003;6(2):115-21.
15.Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H, Yamori Y. Effect of a γ-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. Bri J Nutr. 2004;92(03):411-7.
16.Kelley JM, Hughes LB, Bridges SL. Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis?. J Neuroinflammation. 2008;5:1.
17.Oh SH, Oh CH. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. Food Sci Biotechnol. 2003;12(3):248-52.
18.Taneera J, Jin Z, Jin Y, Muhammed S, Zhang E, Lang S, et al. γ-Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes. Diabetologia. 2012;55(7):1985-94.
19.Wu TY, Tsai CC, Hwang YT, Chiu TH. Effect of antioxidant activity and functional properties of chingshey purple sweet potato fermented milk by Lactobacillus acidophilus, L. delbrueckii subsp. lactis, and L. gasseri Strains. J Food Sci. 2012;77(1):2-8.
20.Parvez S, Malik K, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J App Microbiol. 2006;100(6):1171-85.
21.Esmaeili A, Ghaedi K. GABAA receptors as novel drug targets for treatment of mental disorders. J Paramed Sci. 2010;1(3):50-61.
22.Taherzadeh M ,Esmaeli A, Rabbani M.Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Production Using Acid Lactic Bacteria. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(8):46-56.[In Persian]
23.Komatsuzaki N, Nakamura T, Kimura T, Shima J. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ-aminobutyric acid (GABA)-producer, Lactobacillus paracasei. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(2):278-85.

Archive of SID

www.SID.ir

24.Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, Oda K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from Lactobacillus brevis IFO 12005. Biosci Biotechnol Biochem. 1997;61(7):1168-71.
25.Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands JR, Venema G, Kok J. A chloride-inducible acid resistance mechanism in Lactococcus lactis and its regulation. Molecul Microbiol. 1998;27(2):299-310.
26.Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, Lactobacillus brevis OPK-3. Bioresour Technol. 2007;98(2):312-9.
27.Nomura M, Nakajima I, Fujita Y, Kobayashi M, Kimoto H, Suzuki I, et al. Lactococcus lactis contains only one glutamate decarboxylase gene. Microbiology. 1999;145(6):1375-80.
28.Park KB, Oh SH. Enhancement of γ-aminobutyric acid production in Chungkukjang by applying a Bacillus subtilis strain expressing glutamate decarboxylase from Lactobacillus brevis. Biotechnol Lett. 2006;28(18):1459-63.
29.Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, et al. An astrocytic basis of epilepsy. Nat Med. 2005;11(9):973-81.
30.Vedula LS, Brannigan G, Economou NJ, Xi J, Hall MA, Liu R, et al. A unitary anesthetic binding site at high resolution. J Biol Chem. 2009;284(36):24176-84.
31.Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Disteche CM, Adler DA, et al. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. Proc Nat Acad Sci. 1991;88(19):8337-41.
32.Huang J, Mei LH, Wu H, Lin DQ. Biosynthesis of γ-aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of Lactobacillus brevis. World J Microbiol Biotechnol. 2007;23(6):865-71.
33.Komatsuzaki N, Nakamura T, Kimura T, Shima J. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ-aminobutyric acid (GABA)-producer, Lactobacillus paracasei. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(2):278-85.
34.Taherzadeh M, Esmaeili A, Rabbani M. Molecular gene cloning and sequencing of glutamate decarboxylase gene from Lactobacillus delbrueckii and Lactobacillus reuteri. J Paramed Sci. 2015;6(4):40-6.
35.Tavakoli Y, Esmaeili A, Rabbani M. Identification and molecular cloning of glutamate decarboxylase gene from Lactobacillus casei. Molecul Biol Res Commun. 2015;4(3):161-5.
36.Kook MC, Seo MJ, Cheigh CI, Lee SJ, Pyun YR, Park H. Enhancement of γ-amminobutyric acid production by Lactobacillus sakei B2–16 expressing glutamate decarboxylase from Lactobacillus plantarum ATCC 14917. J Korean Soc App Bio Chem. 2010;53(6):816-20.

Archive of SID

www.SID.ir