Archive of SID

کلونینگ و بیان ژن کد کننده آنزیم لاکاز از باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه QZA2

پروین زمانی[۱]، محمدعلی آموزگار[۱*] و خسرو خواجه[۲]

[۱] تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۲۸

چکیده

لاکازها به دلیل توانایی اکسیداسیون طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنولی کاربردهای بیوتکنولوژیکی گوناگونی دارند. در این مطالعه سویه بومی QZA2 که از خاکهای ایران جدا شده است مورد استفاده قرار گرفت. این سویه بر اساس توالی SrRNA ۱۶دارای بیش‌ترین شباهت به باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه ATCC 14578 بود. ژن کد کننده آنزیم لاکاز از سویه QZA2 به وسیله پرایمرهای کلونینگ تکثیر شد و سپس محصول PCR در ناقل بیانی (pET21a) کلون شد و آنالیز توالی انجام گرفت. این ژن سپس در باکتری اشریشیاکلی سویه BL21(DE3) تحت کنترل فاژ T7 بیان شد. ژن مولتی کوپر اکسیداز در سویه QZA2 یک قالب باز خواندن دارد که دارای ۱۶۵۶ نوکلئوتید بوده و ۵۵۱ اسید آمینه را کد می‌کند و شامل ۴ دمین غنی از هیستیدین متصل شونده به مس بود. توالی آمینواسیدی مولتی کوپراکسیداز سویه QZA2 دارای ۱۶ درصد همسانی به توالی آمینو اسیدی پروتئین CotAدر باکتری باسیلوس سوبتیلیس و ۵۷ درصد شباهت را به توالی مولتی کوپر اکسیداز باکتری باسیلوس هالودورانس نشان داد. بیان تحت شرایط میکروآئروفیلیک به منظور دست‌یابی به مقادیر بیشتر پروتئین محلول انجام گرفت. بیان آنزیم با استفاده از سوبسترای معمول لاکاز ABTS سنجیده شد.

واژه های کلیدی: لاکاز، مولتی کوپر اکسیداز، کلونینگ، باسیلوس آنتراسیس

* نویسنده مسئول، تلفن : ۰۲۱۶۱۱۱۳۵۵۷ ، پست الکترونیکی: amoozegar@ut.ac.ir

مقدمه

پروتئینهای آبی چند مسی (MCBP) از معروف‌ترین گروههای پروتئین حاوی مس، دارای گروه متغیری از پروتئینها با ۶-۲ یون مس هستند (۱۲). اکسیدازهای چند مسی یک گروه از MCBP هستند که آنزیمهای متعددی مانند لاکازها (EC 1.10.3.2)، آسکوربات اکسیدازها (EC 1.10.3.3.)، سرولوپلاسمین (EC 1.16.3.1) و فرواکسیداز (EC 1.16.3.1) در این گروه قرار دارند (۲۱).

لاکازها (بنزن‌دیول‌اکسیژن‌اکسیدوردوکتاز) پلی فنول اکسیدازهایی هستند که طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنولی را اکسید کرده و به طور گسترده‌ای در گیاهان، باکتریها، قارچها و حشرات توزیع شده‌اند (۴). این آنزیمها دارای ۴ دمین غنی از هیستیدین متصل شونده به مس هستند. اتمهای مس کوئوردینه شده در این پروتئین بر اساس خصوصیات اسپکتروسکوپی به سه نوع I، II و III دسته‌بندی می‌شوند. ویژگی اسپکتروسکوپی مس نوع I اساساً مشابه پروتئینهای انتقال دهنده الکترون است و بیشترین جذب را در طول موج ۶۱۰ نانومتر دارد، مس نوع II جذب ضعیف‌تری در این طول موج دارد و مس نوع III بیشترین جذب را در طول موج ۳۳۰ نانومتر نشان می‌دهد. مس نوع I و II به وسیله EPR قابل تشخیص بوده و دارای یک اتم مس هستند، در حالی که مس نوع III دارای یک جفت اتم مس است که به وسیله EPR قابل تشخیص نیست (۲۲). لاکازها به دلیل توانایی اکسیداسیون

www.SID.ir

Archive of SID

سوبستراهای گوناگون در سالهای اخیر از لحاظ کاربردهای بیوتکنولوژیکی اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند و در صنایع مختلفی مانند: صنایع کاغذسازی، نساجی، غذایی، دارویی و همچنین در حذف زیستی ترکیبات فنولی کاربرد دارند (۱۵).

تا کنون لاکازها به طور وسیعی از قارچها جدا شده‌اند و در حال حاضر دارای کاربردهای بیوتکنولوژیکی هستند (۸). با وجود اینکه لاکازها به طور گسترده‌ای در باکتریها وجود دارند اما تاکنون تعداد کمی از لاکازهای باکتریایی شناسایی شده است. لاکازهای باکتریایی تاکنون از باکتریهایی مانند آزوسپیریلوم لیپوفروم (اولین لاکاز پروکاریوتی گزارش شده) (۱۱)، مارینوموناس مدیترانه‌ای (۲۰)، باسیلوس هالودورانس (۱۷)، باسیلوس لیکنیفورمیس (۱۳)، باسیلوس سوبتیلیس (۲۵) و باسیلوس اسفاریکوس گزارش شده است (۵) . مهم‌ترین لاکاز باکتریایی که تاکنون به خوبی بررسی شده و خصوصیات ساختاری و بیوشیمیایی آن تعیین شده، پروتئین CotA اندوسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس است که به نظر می‌رسد این پروتئین در محافظت در برابر نور uv و پراکسید هیدروژن نقش دارد (۲۵). از جمله بررسیهای دیگری که در مورد جداسازی این آنزیم از باکتریها در ایران انجام شده است مربوط به جداسازی یک سویه ملانوژنیک (HR03) متعلق به جنس باسیلوس است که توانایی بالایی برای تولید انواع پلی‌فنول اکسیدازها مانند: کرزولازها (EC1.14.18.1)، کتکولازها (EC1.10.3.1) و لاکاز (EC.1.10.3.2) را دارد (۲). آنزیم لاکاز این سویه کلون و بیان شده و ویژگیهای بیوشیمیایی آن تعیین شده است (۱۶). بررسیهای انجام شده در تجزیه و تحلیل کل ژنوم مشخص کرده که این آنزیمها در باکتریها به طور گسترده‌ای توزیع شده‌اند، با وجود این اطلاعات در مورد لاکازهای باکتریایی کم است (۱۹). با توجه به توسعه روشهای مولکولی و ابزارهای ژنتیکی گوناگون امکان بررسی ژنوم باکتریایی بیشتر شده و از آنجایی که فرآیندهای بیوتکنولوژیکی به خوبی شناسایی شده‌اند، توسعه لاکازهای باکتریایی با توجه به مزایایی آنها از جمله پایداری بالا و تولید در مدت زمان کوتاه در محیطهای ارزان، اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارد. در این پژوهش ژنهای جدید دارای فعالیت بالقوه لاکاز با جستجو در پایگاه داده-های پروتئینی و نوکلئوتیدی، با الگو قرار دادن توالی ژن لاکازهای باکتریهایی که تاکنون شناسایی و توالی یابی شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفت. از بین ژنهای کاندید، ژن کد کننده آنزیم لاکاز از سویه QZA2، که از خاکهای بومی ایران جدا شده بود برای شناسایی، کلون و بیان ژن استفاده شد.

مواد و روشها

مواد: ایزوپروپیلβ-D-۱- تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG)، آنزیمهای محدود کننده *Xho*I و *Nde*I از شرکت فرمنتاز (آلمان) و ABTS از شرکت سیگما-آلدریچ (آمریکا) و سایر مواد از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

سویه‌ها و محیط کشت: باکتری اشریشیاکلی سویه-XL1 Blueبه عنوان سویه کلونینگ و باکتری اشریشیاکلی سویه BL21(DE3) به عنوان سویه بیانی مورد استفاده قرار گرفت. انتخاب باکتری مورد نظر برای شناسایی تکمیلی بر اساس سویه بومی QZA2 انجام گرفت. این سویه از خاکهای ایران و از منطقه فیروز کوه تهران جدا شد. آزمونهای میکروسکوپی و فیزیولوژیک برای شناسایی سویه انجام شد. رنگ آمیزی گرم بر اساس روش هوکر انجام شد، و شکل میکروسکوپی سویه توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شد. حرکت سلول با استفاده از روش لام مرطوب بررسی شد (۱۰). برای مشاهده حرکت از میکروسکوپ نوری استفاده شد. برای بررسی فعالیت کاتالازی از کشت ۲۴ ساعته سویه و پراکسید هیدروژن سه درصد به عنوان معرف استفاده شد و تولید حباب به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد. برای مشاهده اسپور باکتری از محیط اسپورزایی آگاردار استفاده شد، به علاوه جهت تأمین رشد و کاهش میزان آلودگی،

www.SID.ir

Archive of SID

کلرید سدیم به میزان ۳ درصد حجم محیط اضافه گردید (۱). ابتدا باکتری در محیط تولید اسپور کشت داده شد، و بعد از ۴ روز رنگ آمیزی اندوسپورها با رنگ فوشین بازی بر اساس روش شافر و فولتون انجام گرفت (۱۰). بررسی حساسیت سویه به پنی‌سیلین به روش انتشار از دیسک پس از انجام کشت چمنی از سویه‌ها در محیط نوترینت آگار انجام شد. وجود هاله عدم رشد نشان دهنده حساسیت سویه‌ها به پنی‌سیلین بود (۳). فعالیت همولیتیکی باکتری در محیط کشت آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفند از لحاظ وجود و عدم وجود هاله شفاف اطراف کلنیها بررسی شد (۹).

شناسایی تکمیلی سویه منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA انجام شد. برای این منظورDNA ژنومی سویه QZA2 استخراج شد (۲۴) و به عنوان الگو برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفت (۲۳) و با استفاده از پرایمرهای عمومی ۱۶S rRNA، 27F با توالی (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′) و 1492R با توالی (5′-GGTTACCTTGTTACGACTTCACC-3′) تکثیر انجام شد. به منظور تکثیر ژنS rRNA ۱۶S با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بافر با غلظت 1X در ترکیب نهایی، MgCl2 با غلظت نهایی ۲/۵ تا ۰/۵ میلی مول ، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی مول از هر کدام، آنزیم Taq DNA پلیمراز به میزان ۲U/۵۰ میکرولیتر و پرایمرهای رفت و برگشت از هر کدام به میزان ۰/۵ تا ۰/۴ میلی مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. در انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نمونه با شرایط مشابه با سایر نمونه‌ها که در آن به جای DNA الگو از آب مقطر استفاده شده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای انجام این واکنش واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت سازی با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه گسترش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول نهایی حاصل از واکنش تعیین توالی شد (شرکت ماکروژن کره جنوبی).

کلونینگ ژن مورد نظر: همان طور که گفته شد لاکازها جزء آنزیمهای مولتی کوپر اکسیداز هستند. سویه از جنس باسیلوس که توالی مولتی کوپر اکسیدازی با فعالیت لاکازی دارد و همچنین توالی آمینواسیدی و توالی نوکلئوتیدی و همچنین خصوصیات بیوشیمیایی آن به خوبی شناسایی شده، باکتری باسیلوس هالودورانس است. در نتیجه از توالی آمینواسیدی و توالی نوکلئوتیدی ژن مولتی کوپراکسیداز باکتری باسیلوس هالودورانس با شماره دسترسی NP_242948 به عنوان الگوی جستجو درپایگاه اطلاعاتی بانک ژنی استفاده شد. به منظور به دست آوردن توالی نوکلئوتیدی کد کننده مالتی‌کوپر اکسیدازهای باکتریایی که دارای فعالیت لاکاز باشند، از توالی نوکلئوتیدی مولتی کوپر اکسیداز باکتری باسیلوس هالودورانس به عنوان الگو استفاده شد و جستجو tBLASTn در پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی، انجام شد.

به منظور طراحی پرایمر برای ژن مورد نظر در باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه QZA2 توالی ژنی مولتی کوپر اکسیداز در سویه‌های مختلف باکتری باسیلوس آنتراسیس انتخاب شد و در دو پایگاه clustalW2 و NCBI Blas مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن مورد نظر با استفاده از پرایمر رفت با توالی -5′ ATA**CATATG**ATGCGATATATATATTAACAG CGG-3′ دارای جایگاه برش آنزیم *Nde*I در طرف ۵′ و پرایمر برگشت با توالی -5′ GTG**CTCGAG**TTATTCTGGCTTATTAGGAATA ATTTGGG-3′ دارای جایگاه برش آنزیم *Xho*I در طرف ۵′ انجام شد. DNA ژنومی استخراج شده از سویه QZA2 به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ژن مورد نظر با واکنش زنجیره‌ای

www.SID.ir

Archive of SID

پلیمراز تکثیر شد. به منظور تکثیر ژن مورد نظر با واکنش زنجیره‌های پلیمراز بافر با غلظت ۱x در ترکیب نهایی، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مول، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی مول از هر کدام، آنزیم Taq DNA پلیمراز ۲U/۵۰ میکرولیتر و پرایمرهای رفت و برگشت از هر کدام ۰/۸ تا ۱ میلی مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. در انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نمونه با شرایط مشابه با سایر نمونه‌ها که در آن به جای DNA الگو از آب مقطر تزریقی استفاده شده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل واسرشت سازی با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و اتصال با دمای بین ۵۵–۶۰ درجه سانتی گراد هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کیت خالص سازی محصول PCR، (AccuPrep, nano-plus Plasmid mini Extraction kit, korea) خالص شد.

محصول خالص شده و پلاسمید بیانی pET21a(+) توسط آنزیمهای محدود کننده به صورت جداگانه مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. به منظور هضم آنزیمی در واکنشهای جداگانه‌ای، بافر تانگو با غلظت ۲xدر حجم نهایی، آنزیم *Nde*I 10U/µl و *Xho*I 10U/µl ، محصول خالص شده و پلاسمید بیانی و آب مقطر تزریقی به میزان مناسب افزوده شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. محصولات هضم شده توسط کیت خالص سازی محصول PCR خالص شد و سپس با غلظت مناسب توسط آنزیم لیگاز به هم اتصال یافت. واکنش اتصال شامل، بافر ویژه آنزیم لیگاز با غلظت نهایی ۱x، آنزیم لیگاز (T_4 DNA Ligase) 5U/µl و قطعات ژنی پلاسمید بیانی pET21a(+) و ژن خالص شده به میزان مناسب افزوده شد و به مدت یک ساعت در ۲۲ درجه سانتی گراد و سپس ۱۲ ساعت در ۱۶ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. پلاسمید حاصل از اتصال قطعات ژنی در سویه XL1-Blue به عنوان وکتور کلونینگ، با روش شوک حرارتی ترانسفورم گردید. محصول حاصل از انتقال پلاسمید به سلول میزبان بر روی محیط کشت جامد دارای آمپی‌سیلین کشت داده شد. کلنیهای مثبت دارای پلاسمید نوترکیب انتخاب و صحت حضور پلاسمید مورد نظر در این سویه با روش هضم دوگانه با آنزیمهای محدود کننده *Nde*I و *Xho*I و همچنین روش کلنی PCR تأیید شد. پلاسمید نوترکیب pET21a از این سویه با استفاده از کیت استخراج پلاسمید Bioneer استخراج شد و برای اطمینان از صحت توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator تعیین توالی گردید.

بعد از اطمینان از صحت توالی مورد نظر پلاسمید نوترکیب pET21a در سویه بیانی *E. coli* BL21(DE3) ترانسفورم شد و سپس بر روی محیط LB دارای آمپی‌سیلین کشت داده شد. یکی از کلنیهای BL21 مثبت دارای پلاسمید نوترکیب pET21a که بر روی محیط LB جامد دارای آمپی‌سیلین رشد کرده بود به محیط LB حاوی آمپی سیلین به عنوان پیش کشت تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ ساعت گرما گذاری شد. پس از این زمان از محیط پیش کشت به محیط TB حاوی آمپی‌سیلین تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با شیک ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا به OD ۰/۶–۰/۵ برسد. بعد از این زمان IPTG با غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار و CuSO4 با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار به عنوان القاء کننده به محیط افزوده شد. به طور همزمان به عنوان نمونه شاهد، محیط کشتی با شرایط مشابه با شرایط قبل از همان کلنی مثبت تهیه شد اما بعد از رسیدن به OD القاء نشد. یک کلنی از سلولهای BL21 فاقد پلاسمید نوترکیب با شرایط یکسان با کلنی مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب، نیز به عنوان نمونه شاهد منفی به طور

www.SID.ir

Archive of SID

همزمان کشت داده شد. سپس محیطهای کشت القاء شده و القاء نشده (حاوی کلنیهایی با پلاسمیدهای نوترکیب و غیر نوترکیب) به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد با ۱۴۰ دور در دقیقه شیک شد و بعد از آن به مدت ۲۰ ساعت بدون شیک در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. همچنین نمونه‌های تهیه شد که بعد از القاء شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد با ۱۴۰ دور در دقیقه (شرایط هوازی) قرار گرفتند.

از آنجایی که پروتئینهای بیان شده در داخل سلول مجتمع می‌شوند، سلولها بعد از ۲۰ ساعت گرما گذاری، با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد جمع‌آوری شدند. رسوب به دست آمده در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۶ حاوی مهار کننده پروتئاز PMSF 1mM حل شد و سپس بر روی یخ سونیکیت شد. بقایای سلولهای شکسته شده با سانتریفیوژ با ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد رسوب داده شد. محلول رویی در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرما گذاری شد و سپس برای حذف پروتئینهای دناتوره شده در ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. عصاره سلولی به دست آمده برای هر دو نمونه کنترل و آزمون، به منظور سنجش بیان آنزیم و ارزیابی میزان فعالیت آنزیم بیان شده، مورد سنجش آنزیمی قرار گرفت.

سنجش بیان آنزیمی: فعالیت آنزیمی در دمای اتاق در حضور سوبسترای معمول این آنزیم ABTS سنجیده شد. اکسیداسیون ABTS (۲ mM) در بافر فسفات ۱۰۰ mM با pH ۴ توسط افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه اندازه گیری شد.

نتایج

جستجوی tBLASTn در پایگاه اطلاعات ژنی با استفاده از توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی باکتری باسیلوس هالودورانس به عنوان الگو انجام شد. در نتیجه این جستجو توالیهای متعددی در باکتریهای گوناگون شناسایی شد. یکی از این توالیها، توالی مولتی‌کوپر اکسیداز باکتری باسیلوس آنتراسیس بود که تاکنون نوع فعالیت و ویژگیهای این توالی شناسایی نشده بود. در نتیجه باکتری باسیلوس آنتراسیس به عنوان باکتری منتخب برای کلونینگ و بیان توالی مورد نظر در باکتری اشریشیاکلی انتخاب شد.

شناسایی سویه QZA2: نتایج بررسی صفات اولیه در سویه QZA2 نشان داد که این سویه، سویه‌ای گرم مثبت، دارای اندوسپور و کاتالاز مثبت، فاقد حرکت و حساس به پنی‌سیلین است و همچنین توانایی همولیز گلبولهای قرمز خون گوسفند را ندارد.

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن ۱۶S rRNA با استفاده از نرم افزار Chromas Pro (Technelysium Pty Ltd, Australia) ویرایش شد و با استفاده از ابزار BLAST در دو بانک اطلاعاتی NCBI و پایگاه اطلاعاتی EzTaxon-e server (http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/; Kim et al., 2012) مورد بررسی قرار گرفت. سویه QZA2 از نظر میزان شباهت در توالی ژن ۱۶S rRNA بررسی شد و درخت فیلوژنتیک این سویه با الگوریتم Neighbor joining (۱۸) و ضریب Boot Strap ۱۰۰۰ (۷) و با نرم افزار MEGA5 (Molecular evolutionary genetics analysis, version 5, Tokyo, Japan) (۱۴) رسم شد. بررسی توالی ژن ۱۶S rRNA سویه QZA2 نشان داد که این سویه دارای ۱۰۰ درصد شباهت به باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه ATCC 14578^T است (شکل ۱).

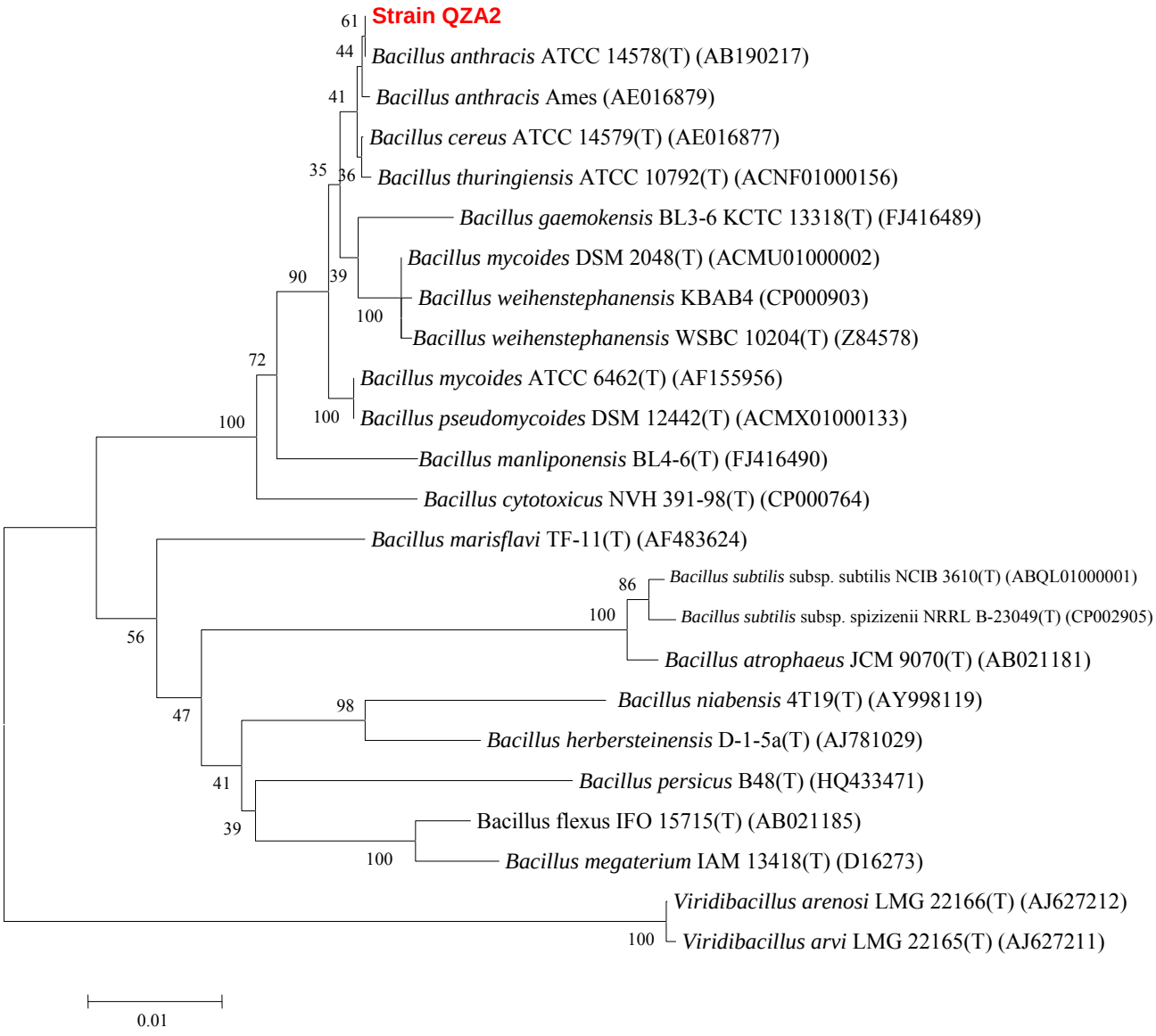
تکثیر اختصاصی ژن لاکاز: توالی ژن لاکاز در باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه QZA2 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی ژن، تکثیر شد و صحت توالی آن مورد بررسی قرار گرفت.

پس از تأیید کلون شدن ژن مورد نظر در وکتور pET21a(+)، پلاسمیدهای نوترکیب تخلیص شد و با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator تعیین توالی شد. نتیجه تعیین توالی ژن بررسی شد. توالی نوکلئوتیدی در پایگاه داده‌هایExPASy (www.expasy.ch، مؤسسه بیوانفورماتیک سوئیس SIB) به توالی آمینواسیدی تبدیل و مشخص شد توالی بدون جهش بود.



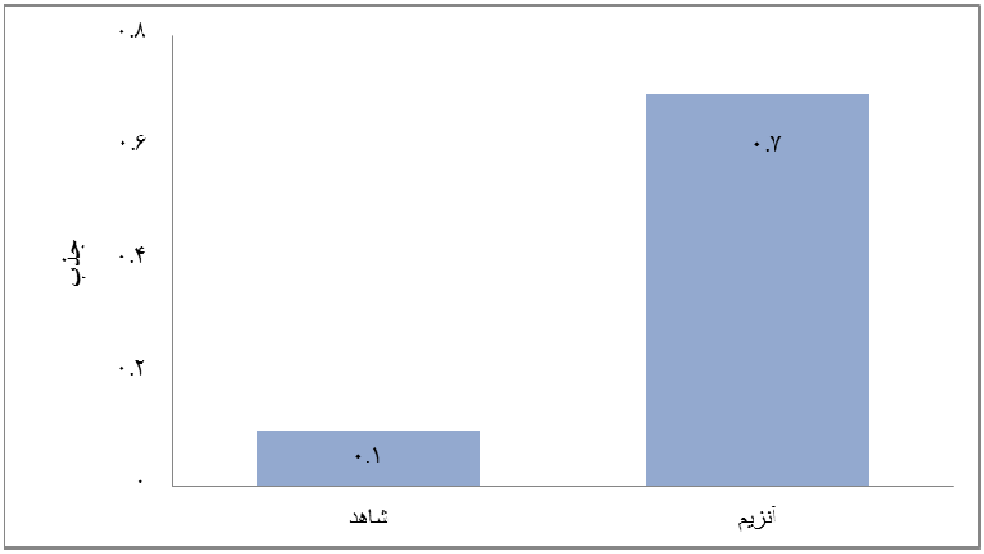
شکل ۱: درخت فیلوژنتیک سویه QZA2 با روش Neighbor-joining و با استفاده از معیار Boot strap ۱۰۰۰

سنجش بیان آنزیم لاکاز: فعالیت آنزیمی لاکاز در دمای اتاق در حضور سوبسترای معمول این آنزیم ABTS انجام شد. از بین کلنیهای بررسی شده تنها کلنی دارای پلاسمید نوترکیب pET21a که تحت شرایط القاء با IPTG و $CuSO_4$ قرار گرفته بود فعالیت آنزیمی نشان داد. سنجش فعالیت آنزیمی شامل اکسیداسیون ABTS (۲میلی مولار)

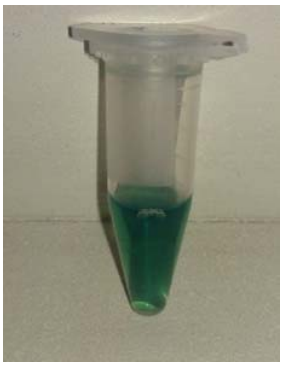
www.SID.ir

Archive of SID

در بافر فسفات ۱۰۰ میلی مولار با pH ۴ با افزایش جذب در ۴۲۰ نانومتر مشاهده شد، همچنین در اثر اکسیداسیون ABTS با آنزیم لاکاز در مخلوط واکنش رنگ سبز ایجاد شد، که نشانگر حضور آنزیم لاکاز در مخلوط واکنش بود (شکل ۲).



الف



(ب)

(ج)

شکل ۲- الف) افزایش جذب در اثر اکسیداسیون ABTS در طول موج ۴۲۰ نانومتر، بعد از زمان ۵ دقیقه میزان جذب به ۰/۷ رسید. نمونه شاهد ۰/۱ افزایش جذب به علت شکستن خودبه خودی ABTS نشان می‌دهد. ب) ایجاد رنگ سبز در اثر اکسیداسیون ABTS با آنزیم لاکاز برای نمونه لاکاز مثبت ج) نمونه کنترل که عدم تغییر رنگ را نشان می‌دهد.

بحث

بیان ژن لاکاز در شرایط معمول یعنی کشت سلول تحت شرایط هوازی جواب مطلوبی نداشت. همان طور که قبلاً گزارش شده است در شرایط هوازی تنها بخش کمی از آنزیم بیان شده به صورت فعال باقی مانده و بیشتر محصول بیان به فرم جسم توده‌ای می‌باشد که این اتفاق احتمالاً به دلیل جایگزینی ناقص یون مس در ساختار آنزیم می‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۰). همان‌طور که دورائو (Durao) و همکاران به این نکته اشاره کرده‌اند که محتوای مس CotA وابسته به غنی سازی محیط کشت با یون مس و وجود اکسیژن در محیط کشت است (۶). تغییر شرایط آئروبیک به میکروآئروبیک محتوای داخل سلولی مس را افزایش می‌دهد. افزایش یون مس داخل سلولی و همچنین وجود شرایط میکروآئروبیک منجر به ایجاد وضعیتی مناسب برای تاخوردگی و تشکیل هولوآنزیم می‌گردد. با توجه به این نتایج، القاء با IPTG و در محیط غنی شده با $CuSO_4$ انجام گرفت و بعد با خاموش کردن شیکر میزان دسترسی به اکسیژن در کشت کاهش یافت. توالی آمینواسیدی مولتی کوپراکسیداز سویه QZA2 بررسی شده در NCBI Blast نشان داد که این توالی دارای ۱۶ درصد همسانی و ۲۴ درصد شباهت به توالی آمینو اسیدی باکتری باسیلوس سوبتیلیس است. از طرف دیگر توالی آمینواسیدی مولتی کوپراکسیداز سویه QZA2 دارای ۴۰ درصد همسانی و ۵۷ درصد شباهت به توالی آمینواسیدی لاکاز باکتری باسیلوس هالودورانس است.

چهار دمین غنی از هیستیدین متصل شونده به مس در آنزیمهای لاکاز وجود دارد. جایگاههای T1، T2 و T3 دارای ریشه‌های آمینواسیدی حفاظت شده‌ای هستند. همان طور که جدول ۱ دیده می‌شود، این جایگاه‌های متصل شونده به مس در توالی آمینواسیدی ژن مولتی کوپر اکسیداز سویه QZA2 نیز وجود دارند و ژن مورد نظر در سویه QZA2 دارای ۴ ناحیه غنی از هیستیدین متصل شونده به مس است و شباهت زیادی به پروتئینهای متصل شونده به مس دارد (جدول ۱).

جدول ۱- هم تراز سازی ۴ دمین متصل شونده به مس در توالی آمینواسیدی برخی سویه‌های باسیلوسی و سویه‌های قارچی و مقایسه آنها با توالی مالتی‌کوپراکسیداز باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه QZA2. ریشه‌های آمینواسیدی متصل شونده به مس حفاظت شده برای مس نوع ۱، ۲ و ۳ با سایه نشان داده شده است. اعداد داخل پرانتز شماره دسترسی پروتئین مربوطه است (۹).

نام و شماره دسترسی	2 3	3 3	1 2 3	313 1
Phlebia radiate (Q01679)	83 TIHWHG	126 TFWYHSH	418 HPFHLHGHTFSVV	470 NFLHCHIDW HL
Trametes versicolor (AAL00887)	82 SIHWHG	125 TFWYHSH	415 HPFHLHGHAFAVV	489 NFLHCHIDF HL
Coprinus cinereus (AAD30964)	80 SIHWHG	123 TFWYHSH	414 HPFHLHGHAFSVV	466 NFFHCHIEF HL
Pleurotus ostreatus (Q12793)	96 SIHWHG	139 TFWYHSH	427 HPFHLHGHTFDVI	480 NFLHCHIDWHL
Trametes villosa (AAB477)	85 TIHWHG	128 TFWYHSH	425 HPFHLHGHTFSVV	47 NFLHCHIDF HL
B. subtilis Cot A (NP_388511)	103 VV HLHG	14 9 ILWYHDH	419 HPIHLHLVSFRVI	486 YVWHCHILE HE
B. halodurance (NP_242948)	103 ALHLHG	143 TYWYHSH	413 HPMHLHGDFFHVI	462 NMFHCHEF HA
QZA2	107 SIHWHG	157 TYWYHSH	461 HPMHLHGHFFQ	516 WMFHCHDL HLA
B. licheniformis (YP_077905)	100 VVHLHG	146 ALWYHDH	417 HPIHLHLVQFM	487 YVWHCHILE HED
HR03 (FJ663050)	102 VVHLHG	148 ILWYHDH	418 HPIHLHLVSFR	485 VYWHCHILE HE

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- مقایسه همسانی ژن لاکاز در برخی از سویه‌های قارچی و برخی از باسیلوسها که با ClustalW2 بررسی شده است. QZA2، Bs *B. subtilis*، Bh *B. halodurans*، Bl *B. licheniformis*، Bf: *Botryotinia fuckeliana*، Pr: *Phlebia radiata*، Tv: *T. versicolor*، Tvi: *T. villosa*، Cc: *C. cinereus*، Po: *Pleurotus ostreatus*

Enzyme	Identity (%) with multicopper oxidase from:									
	HR03	Bs	Bh	Bl	Bf	Pr	Tv	Cc	Tvi	Po
QZA2	16	16	41	13	20	20	20	20	20	21
HR03		98	19	65	13	13	12	11	13	13
B. subtilis CotA			19	65	12	12	12	11	13	12
B. halodurans				18	20	17	17	14	16	16
B. licheniformis					13	13	12	12	11	10
Botryotinia fuckeliana laccase (Lcc2)						29	28	30	32	31
Phlebia radiate laccase							68	55	69	64
T. versicolor laccase (Lcc1)								57	69	63
C. cinereus laccase (Lcc1)									54	53
T. villosa laccase (Lcc5)										59

مقایسه توالی آمینو اسیدی مولتی کوپر اکسیداز سویه QZA2 با توالی آمینواسیدی برخی لاکازهای قارچی و لاکازهای باکتریایی که تاکنون شناسایی شده است، با ClustalW2 و BLAST پروتئینی در پایگاه اطلاعات بانک ژنی نشان داد که توالی آمینو اسیدی مولتی کوپر اکسیداز باکتری باسیلوس آنتراسیس سویه QZA2 دارای بیشترین شباهت به لاکاز قارچی، بوتریوتینیا فوکلیانا با شماره دسترسی AAK77953 و با ۲۸ درصد همسانی و ۴۱ درصد شباهت است . گرچه شباهت کلی سویه QZA2 به لاکازهای قارچی خیلی بالا نیست اما نسبت به سایر لاکازهای باکتریایی که تاکنون بررسی شده‌اند، بالاتر است (جدول ۲). اگرچه بیان آنزیم با افزودن مس به محیط کشت، کاهش دما و ایجاد شرایط میکروآئروبیک، نسبت به شرایط هوازی افزایش می‌یافت، اما با این حال تنها بخش کمی از آنزیم بیان شده به صورت فعال بود. بهینه سازی شرایط بیان برای تولید آنزیمی با فعالیت بیشتر، بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در شرایط مختلف دما و pH، تعیین ویژگیهای آنزیمی، تعیین مکانیسم عمل آنزیم و تعیین ساختار آنزیمی برای ادامه کار پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Atlas, R. M., Bartha, R., 1998. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. 4th Edition. *Addison-Wesley*.
2. Badoei Dalfard, A., Khajeh, Kh., Soudi, M., Naderi-manesh, H., Banjbar, B., 2006. Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(7):1409–1416.
3. Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.

www.SID.ir

Archive of SID

American Journal of Clinical Pathology. 45(44):493-496.

4. Claus, H., 2003. laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archive of Microbiology*. 179(3): 145-150.
5. Claus, H., Filip, Z., 1997. The evidence of a laccase-like activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Micribiological Research*. 152(2):209-215.
6. Durao, P., Chen, Z., Fernandes, AT., Hildebrandt, P., Murgida, DH., Todorovic, S., Pereira, MM., Melo, EP., Martins, LO., 2008. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 13(2):183–193.
7. Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39(4): 783-791.
8. Feng, X.u., Damhus, T, Danielsen, S, Ostergaard, L.H., 2007. Modern biooxidation: Enzyme, Reaction and Application. Edited by Rolf D. Schmid, Valada B. urlacher. *Weinheim , Wiley*.
9. Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S., 2002. Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology. 11th ed. St. *Louis: Missouri Mosby*.
10. Gerhardt, P., Murray R. G. E., 1994. Methods for general and molecular bacteriology. 3rd Edition. *Washington. D. C: American Society for Microbiology.*
11. Givaudan, A., Effosse. A., Faure. D., Potier, P., Bouillant, M.L. & Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*. 108(2):205-210.
12. Komori, H., Higuchi,Y., 2010. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. *BioMolecular Concepts*. 1(1): 31–40.
13. Koschorreck, K., Richter, S. M., Ene, A.B., Roduner, E., Schmid, R.D. Urlacher, V.B., 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(2):217-224.
14. Kumar, S., Stecher, G., Peterson, D., and Tamura, K., 2012. MEGA-CC: Computing Core of Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program for Automated and Iterative Data Analysis. *Bioinformatics*. 28(20):2685–2686.
15. Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 60(6):551–565.
16. Mohammadian, M., Fathi-Roudsari, M., Mollania, N., Badoei-Dalfard, A., Khajeh, K., 2010. Enhanced expression of a recombinant bacterial laccase at low temperature and microaerobic conditions: purification and biochemical characterization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37(8):863–869.
17. Ruijssenaars, H., J., Hartmans, S., 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65(2): 177–182.
18. Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*. 4(4): 406-425.
19. Sharma, P., Goel, R., Capalash, N., 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(6):823–832
20. Solano, F., Garcia, E., Perez de Egea, E., & Sanchez-Amat, A., 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel melanogenic marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9): 3499–3506.
21. Solomon, E.I., Augustine, A.J., & Yoon, J., 2008. O_2 reduction to HO by the multicopper oxidases. *Dalton Transaction*. 30: 3921-3932.
22. solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*. 96(7): 2563-2606.
23. Spencer, J., 2004. Environmental microbiology: methods and protocols. *US; Humana Press Inc.*
24. Wilson, K., 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current Protocols in Molecular Biology, B.R. Ausubel FM, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editor., *New York; John Wiley & Sons*.
25. Yang, S. Sh., Liu, Z. W., Yi, X.P. & Zhang, A. L., 2012. Isolation of laccase gene from *Bacillus subtilis* and analysis of its physicochemical properties. *Gene*. 491(1), 49–52.

www.SID.ir

Archive of SID

Cloning and Expression of Laccase Enzyme from *B. anthracis* strain QZA2

Zamani P.[1], Amoozegar M.A.[1] and Khajeh Kh.[2]

[1] Microbiology Dept., School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

[2] Biochemistry Dept., Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Laccases have many biotechnological applications due to their oxidation ability towards a wide range of phenolic compounds. In this study, the strain QZA2 isolated from Iran soils was used. This strain showed high similarity to *Bacillus anthracis* strain ATCC 14578 according to 16S rRNA gene sequence. Laccase gene was amplified by cloning primers.then PCR product cloned in the expression vector (pET21a) and transferred to BL21(DE3) strain of *E. coli* under the control phage T7 and sequence analysis carried out. The gene of the QZA2 has an open reading frame composed of 1656 bases, which encodes 551 amino acid residues and contain four histidine rich copper-binding domains. The laccase gene from QZA2 showed 16% similarity with CotA from *B. subtilis* and 57% similarity with multicopper oxidase *B. halodurans* . The expression was performed under microaerobic condition in order to obtain high amounts of soluble protein. Biochemical properties were investigated using common laccase substrates ABTS.

Key words: laccase, multicopper oxidase, cloning, *Bacillus anthracis*

www.SID.ir