



## جداسازی و کلون سازی ژن آنزیم کوتیناز باکتری ترموبیفیدا فوسکا

الهه پورفخرایی<sup>۱</sup>، مهرداد بهمنش<sup>۲</sup>، مجید عرفانی مقدم<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup>کارشناس ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، <sup>۲</sup>دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، <sup>۳</sup>استادیار گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس

### چکیده

سابقه و هدف: آنزیم کوتیناز متعلق به خانواده سرین هیدرولازها است و به دلیل خواص ساختاری و عملکردی در حذف آلودگی های زیست محیطی اهمیت بسیار زیادی دارد. هدف از این پژوهش، جداسازی و کلون سازی ژن آنزیم کوتیناز از باکتری ترموبیفیدا فوسکا (*Thermobifida fusca*) بود.

مواد و روش ها: نمونه برداری از خاک های جنگلی شمال ایران صورت گرفت. با استفاده از محیط کشت اختصاصی و شرایط محیطی مناسب (pH ۱۰ و دمای ۶۰ درجه سانتی گراد) جداسازی باکتری بومی ترموفیل ترموبیفیدا فوسکا انجام شد. پس از طراحی پرایمر، ژن کوتیناز (*cut1*) از باکتری یاد شده جدا گردید. سپس در وکتور pBluescript sk کلون و به اشتریشیا کلی DH5 $\alpha$  انتقال داده شد. به منظور تایید کلون سازی، هضم آنزیمی انجام و نمونه ها برای تعیین توالی ارسال گردید.

یافته ها: در این تحقیق برای یافتن آنزیم کوتیناز با ویژگی های مطلوب تر، جداسازی و کلونینگ ژن آنزیم کوتیناز از باکتری ترموفیل بومی ترموبیفیدا فوسکا انجام شد. کلون سازی به کمک روش هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تایید قرار گرفت. با توجه به نتایج BLAST بیشترین شباهت با ۹۸٪ همانندی با آنزیم کوتیناز *cut1* و ۹۶٪ شباهت با آنزیم کوتیناز cut-1.KW3 در باکتری ترموبیفیدا فوسکا مشاهده گردید. نتیجه گیری: با استفاده از آنزیم کوتیناز کلون شده در این تحقیق و با توجه به طیف وسیع عملکردی آن در برابر سویستراهای متنوع و قابلیت تجزیه و سنتز انواع ترکیبات پلی استری، این آنزیم می تواند در رفع آلودگی های زیست محیطی نقش مهمی ایفا کند.

کلمات کلیدی: ترموبیفیدا فوسکا، کوتیناز، کلون سازی

دریافت مقاله: خرداد ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: مرداد ۱۳۸۹

### مقدمه

هیدروکسی اسید چرب می باشد که در ساختار کوتیکول گیاهان وجود دارد (۲) و نقشی کلیدی در حفاظت از گیاه در برابر عوامل بیماری زا ایفا می کند (۳). در واقع کوتیکول یک لایه ی محافظ چربی دوست است که برگ ها، ساقه ها و میوه ها را می پوشاند. روی کوتیکول لایه ای از موم پوشیده شده است که علاوه بر این که مانع از تبخیر آب گیاه می شود در برابر عوامل بیماری زا و آفات نیز از گیاه حفاظت می کند (۴).

کوتیناز یک آنزیم هیدرولازی است که کوتین را تجزیه می کند. کوتین در بیشتر گیاهان وجود دارد و دارای ترکیبات پلی استری هیدروکسی و اپوکسی اسید چرب (شکل ۱) است (۱). کوتین یک پلی استر بسیار هیدروفوب غیر محلول در آب و از مشتقات گاما

\* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوفیزیک  
تلفن: ۰۹۱۲۵۷۹۹۴۴۳

مطالعه در این تحقیق، کوتیناز باکتری ترموفیل از گونه ی ترموفییدا فوسکا است که دارای توان مقاومت بالا در برابر pH، دما و حلال های آلی است (۷ و ۸).

هدف از این پژوهش، جداسازی سویه بومی باکتری ترموفیل ترموفییدا فوسکا، کلون سازی و تعیین توالی ژن کوتیناز آن بود.

### مواد و روش ها

الف) جداسازی: برای جداسازی باکتری ترموفییدا فوسکا از خاک جنگل های شمال ایران نمونه گیری شد و کشت در محیط اختصاصی Czapek Pepton و گرم خانه گذاری در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد و pH ۱۰ به مدت ۱۶ ساعت غنی سازی و سپس به محیط کشت جامد کشت مجدد داده شد. بر اساس رنگ آمیزی گرم، اسپور و تست های بیوشیمیایی احیای نیترات، اکسیداز، فسفاتاز، رشد در دامنه های حرارتی و pH و محیط های تک قندی شناسایی مرفولوژی باکتری صورت گرفت (۹).

به کمک کیت استخراج DNA ژنومی از کمپانی فرمنتاز (Fermentas) ژنوم باکتری استخراج شد و واکنش PCR توسط آنزیم DNA پلی مرز Taq از کمپانی فرمنتاز و پرایمرهای طراحی شده از کمپانی سیگما (Sigma) انجام گرفت. پرایمرها به صورت زیر طراحی گردید:

Forward 5'-CGATATTAGGATCCGAAAATCTATATTTCCAAGGAATGGCCAACCCCTACGAGC-3'

Reverse 5'-TGCTCTGAATTCTCAGAACGGGCAGGTGGAGC-3'

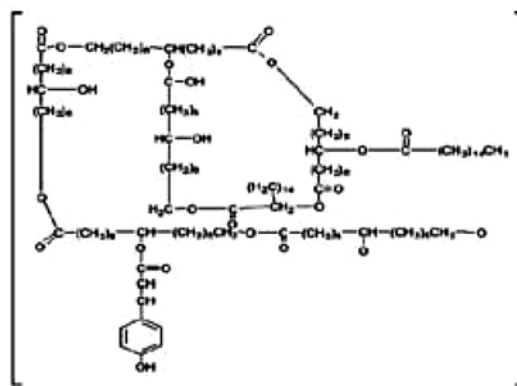
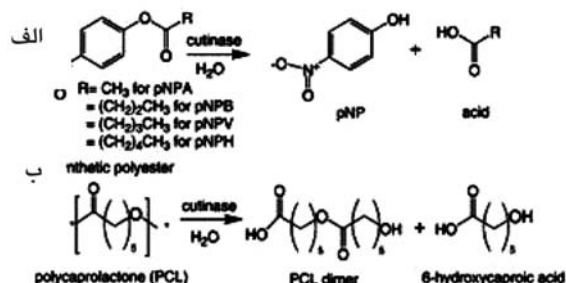
طراحی به کمک ژن کوتیناز ۱ (*cut1*) سویه *Thermobifida*

*fusca* DSM:44342 به شماره ثبت ژنی HQ147787 به کمک

کوتیناز توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی استرهای کوچک را داراست (شکل ۲). یکی از مشکلات زیست محیطی در جوامع امروزی تجزیه ی زباله ها در محیط زیست است. کوتیناز به عنوان یک آنزیم سبز می تواند توانایی از بین بردن زباله های پلی استری را دارا باشد و می توان از آن در سنتز پلی استرهای قابل تجزیه در طبیعت استفاده کرد (۵).

باکتری ترموفییدا فوسکا (*Thermobifida fusca*) یک اکتینومیست ترموفیل است که نقش مهمی در تجزیه ی گیاهان در خاک و تولید کودها بر عهده دارد. از نکات جالب توجه این است که باکتری یاد شده در دمای ۶۰ درجه و pH ۱۰ به رشد خود ادامه می دهد. در حالی که این شرایط برای بیشتر موجودات زنده غیر قابل تحمل است (۶).

یکی از خصوصیات ویژه آنزیم کوتیناز، فعالیت آن با گستره ای از سوبستراهای مختلف می باشد که باعث شده این آنزیم در صنعت و تکنولوژی مورد توجه قرار گیرد. آنزیم کوتیناز قارچ فوزاریوم سولانی پیسی (*Fusarium solani pisi*) که در مقایسه با سایر کوتینازها دارای بیشترین میزان فعالیت می باشد. اما کوتیناز باکتری ترموفییدا فوسکا در برابر دما و حلال های آلی پایداری بسیار بیشتری را از خود نشان می دهد. با توجه به ویژگی های خاص آنزیم کوتیناز و کاربردهای آن در صنعت و بیوتکنولوژی و نیز چشم انداز روشن در فرآیند تجزیه ی پلاستیک و آلاینده های پلی استری موجود در طبیعت، یافتن آنزیمی با شرایط مطلوب تر همواره مورد توجه بوده است. آنزیم های کوتیناز گونه های باکتریایی تاکنون به میزان کمتری مورد بررسی قرار گرفته اند. آنزیم مورد



شکل ۲: توانایی تجزیه (الف) و سنتز (ب) ترکیبات پلی استری توسط آنزیم کوتیناز.

شکل ۱: ساختار کوتین.

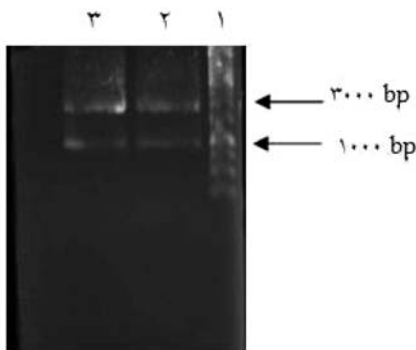


جدول ۲: نتایج بلاست ژن کوتیناز ۱ ترموبیفیدا فوسکا.

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ147787.1	Thermobifida fusca culture-collection DSM:44342 cutinase 1 (cut1) gene,	1380	1380	99%	0.0	98%	
FR727680.1	Thermobifida fusca cut-1.KW3 gene for cutinase	1279	1279	99%	0.0	96%	
FR727681.1	Thermobifida fusca partial cut-2.KW3 gene for cutinase	1238	1238	98%	0.0	95%	
HQ147786.1	Thermobifida cellulositytica culture-collection DSM:44535 cutinase 1 (cut1)	1230	1230	99%	0.0	94%	
A3810119.1	Thermobifida fusca bta1 gene for BTA-hydrolase 1 and bta2 gene for BTA	1222	2419	99%	0.0	95%	
CP000089.1	Thermobifida fusca YX, complete genome	1223	2413	99%	0.0	95%	
HQ147784.1	Thermobifida alba culture-collection DSM:43185 cutinase 1 (cut1) gene,	1203	1203	99%	0.0	94%	
HMI93859.1	Thermobifida fusca strain NTU22 acetylxykan esterase gene, partial cds	1192	1192	95%	0.0	95%	
HQ147786.1	Thermobifida cellulositytica culture-collection DSM:44535 cutinase 2 (cut2)	1186	1186	99%	0.0	93%	
AB445476.2	Thermobifida alba est1, est2 genes for esterase, complete cds	785	1533	98%	0.0	85%	
U03114.2	Streptomyces albus lipase precursor (lip) and LipR genes, complete cds;	267	267	78%	1e-67	75%	
AL939106.1	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segment 3/29	244	244	91%	5e-61	74%	
AF009336.1	Streptomyces coelicolor lipase (lipA), and LipR activator (lipR) genes, com	244	244	91%	5e-61	74%	
CP000750.2	Kineococcus radiotolerans SRS30216, complete genome	239	239	79%	3e-59	74%	
CP002896.1	Amycolatopsis mediterranei S699, complete genome	167	167	91%	1e-37	72%	
CP002000.1	Amycolatopsis mediterranei U32, complete genome	167	167	91%	1e-37	72%	
M86351.1	Streptomyces sp. triacylglycerol acylhydrolase (lipA) and lipA transcriptio	167	167	91%	1e-37	72%	
CP001738.1	Thermomonospora curvata DSM 43183, complete genome	137	137	56%	9e-29	73%	

بدون قطعه مورد نظر است که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است. PCR-cloning: در ردیف ۲ و ۴ ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰bp مشاهده می گردد (شکل ۵). با توجه به سایز قطعه، کلنی های مناسب برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند. نتیجه هضم آنزیمی (*digestion*): با توجه به شکل ۶ در هضم آنزیمی صورت گرفته ژن مورد نظر از داخل پلاسمید خارج شده است که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن کلون سازی ژن مورد نظر می باشد. نتیجه تعیین توالی و بررسی آن: پس از تعیین توالی به کمک نرم افزار The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) زیر در جدول ۲ به دست آمد:

توالی ژن به دست آمده در این تحقیق به صورت زیر بود.  
 -ACTACCGCTCGACCGCCGCCTTCTGAGCC  
 - G C G A G G T C G A A G  
 -CCCGGACCGCGCGACGACTCTTCG  
 - CCGCTACACCCAGTTCCTCTGC

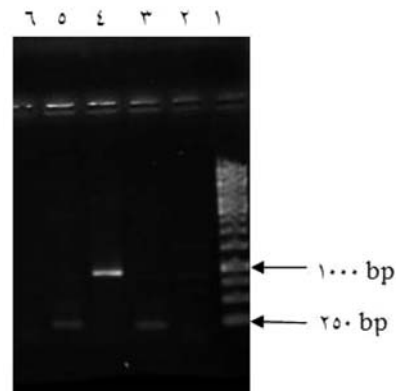


شکل ۶: ردیف (۱) سایز مارکر 1kb، ردیف های ۲ و ۳) نتیجه هضم آنزیمی اندازه وکتور حدود ۳۰۰۰bp و ژن ۱۰۰۰bp.

میکروتیوب سرد منتقل و ۱۰ میکرولیتر محصول الحاق به میکروتیوب اضافه شد و سپس مراحل انتقال با روش شوک دمایی انجام گردید. (ه) غربالگری کلون های مثبت: این مرحله با استفاده از PCR-Cloning و نیز هضم توسط آنزیم های برش دهنده *BamHI* و *EcoRI* انجام شد. (و) تعیین توالی *DNA* کلون شده: پلاسمید دارای ژن مورد نظر توسط کیت کیاژن استخراج و جهت تعیین توالی ارسال گردید.

## نتایج

برای طراحی پرایمر از ژن کوتیناز ۱ (*cut1*) سویه *Thermobifida fusca* DSM:44342 به شماره ثبت ژنی HQ147787 به عنوان الگو استفاده شد. نتیجه PCR پس از الکتروفورز به صورت زیر در ژل مشاهده شد (شکل ۴). در ردیف ۳ و ۴ ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰bp دیده می شود. ردیف ۲ وکتور



شکل ۵: ردیف (۱) سایز مارکر 1kb، ردیف های ۲ و ۴) ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰bp، (۳) پلاسمید فاقد ژن، (۵) کنترل مثبت و (۶) کنترل منفی.

کوچک را داراست. یکی از مشکلات زیست محیطی در جوامع امروزی تجزیه ی زباله های پلی استری و پلاستیک در محیط زیست است. کوتیناز به عنوان یک آنزیم سبز می تواند قادر به از بین بردن زباله های پلی استری باشد و می توان از آن ها در سنتز پلی استرهای قابل تجزیه در طبیعت استفاده کرد.

باکتری ترموفییدا فوسکا یک اکتینومایست ترموفیل است که نقش مهمی در تجزیه ی گیاهان در خاک و تولید کودها بر عهده دارد. آنزیم کوتیناز در باکتری ترموفیل ترموفییدا فوسکا در مقایسه با گونه ی فوزاریوم سولانی دارای پایداری بسیار بالا در حلال های آلی و همچنین پایداری دمایی بیشتری می باشد، در حالی که فعالیت نزدیک به کوتیناز قارچی مذکور در برابر سورفاکتانت ها و یون های فلزی را از خود نشان می دهد.

با توجه به رشد باکتری در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد و شرایط قلیایی (pH ۱۰)، انجام تست گرم و اسپور، باکتری جدا شده گرم مثبت بوده و دارای اسپور انتهایی می باشد که با خصوصیات باکتری ترموفییدا فوسکا مطابقت دارد.

باکتری ترموفییدا فوسکا دارای دو ایزوآنزیم کوتیناز با شباهت (identity) ۹۳٪ در اسیدهای آمینه است. یکی از این دو دارای ۳۱۹ زیر واحد است. ۵۸ اسید آمینه به عنوان سیگنال پپتید از رشته ی پلی پپتیدی جدا می شود. در دیگری ۳۰۱ اسید آمینه شناسایی شده که ۴۰ اسید آمینه به صورت پپتید نشانه از پیکره ی آنزیم جدا می شود. در نهایت، هر دو دارای ۲۶۱ زیر واحد و وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون خواهند بود (۷).

در این تحقیق به کمک توالی های مشابه در گونه های شناخته شده باکتری ترموفییدا فوسکا طراحی پرایمر صورت گرفت و با توجه به عدم وجود سایت برش آنزیم های محدود کننده *EcoRI* و *BamHI* در داخل ژنوم آنزیم یاد شده و عملکرد آنزیم ها با بافر مشابه، سایت برش این آنزیم ها بر روی پرایمر تعبیه شد. وکتور *pBluescript sk* برای کلون سازی انتخاب شد زیرا دارای اندازه ۲۹۵۸ نوکلئوتید بوده و سایت های برش آنزیمی *EcoRI* و *BamHI* بر روی آن وجود داشت. اندازه کوچک و میزان تکثیر بالا از خصوصیات این وکتور است. انتخاب این وکتور به کمک مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین صورت می گیرد. پس از

-CTGGCTCAAGCGGTTGTCGACAACGACAC  
 -CAACAAGATCATCGGCAAGTACAGCGTCGC  
 -GCGCAACCCACTTCGCCCGAACATCCC  
 -CAGCAAGGCCTACCTGGAGCTGGACG  
 -GCCCTTCTACAACAGCCTCCCGACCTCGAT  
 -CATCGCTCCGGTCCTCACCCACGCCCG  
 -CACCTCATCATCGGTGCTGACCTGGACAC  
 -AAGA ACTGGAGCAGTGTGCGGGTTCC  
 -CATCCCGCTCACCCCGTGGCACCTCAAC  
 -GCCTCCAGCGTCCCGACCTGAAGGCCGC  
 -TCCATGGGCGGCGGGCAGCCTGCGTCTG  
 -CAGCCGACTGGCGGTCATGGGCCAC  
 -TCCTCCACGGTGCAGCCGGATCGACAG  
 -GCCGCGCTGAACCACATGATCAACCGGGCG  
 -CCGGACAGCCGGGCAGAGCAGCTCAAC  
 -CATCGACACCATCACACCCTCGACCAG  
 -CGCCTCCACGGCTTCGTCGTCATCAC  
 -GCTTCCATCGCCTGGCTGGGCGAGCGCAT  
 -GCGATCTCCCCGGCTACACCGGCACTGAG  
 -CCGCGGGAGAACAACACCTACGGTGCGGTG  
 -CGGCTTCGGCGGGCACCATCTACTAC  
 -CGAGGAGAACGTCTCCCGTTGAGCGCCAG  
 -GCCCGCAGCGGCCCTTCTCCGTCAG  
 -CCGAACCCACGGACGCCCTCCTCGAT  
 ATCGCCAACGCCTACGACCGGGGC

## بحث

آنزیم کوتیناز از خانواده ی سرین هیدرولازها بوده و دارای پیچش  $\alpha/\beta$  هیدرولاز می باشد. زیر خانواده ی رایج کوتینازها شامل ۲۰ عضو است که دارای توالی آمینو اسیدی مشابه هستند. آنزیم کوتیناز در قارچ ها و باکتری ها یافت شده است. اگر چه کوتینازهای قارچی و باکتریایی دارای خصوصیات کاتالیتیکی و مکانیسم عمل مشابه هستند اما از نظر توالی و ساختار متفاوتند، از این رو پیشنهاد می شود به دو زیر خانواده ی کوتینازهای یوکاریوتی و پروکاریوتی تقسیم شوند. بیشتر مطالعات بر روی آنزیم های قارچی صورت گرفته است. اما آنزیم های باکتریایی از پایداری و مقاومت بیشتری برخوردارند. کوتیناز توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی استرهای

سوبستراهای مختلف، کاربرد بیشتر این آنزیم در بیوتکنولوژی و صنعت می تواند مورد توجه قرار گیرد. آنزیم کوتیناز به دلیل طیف وسیع عملکرد در برابر سوبستراهای متنوع و قابلیت تجزیه و سنتز انواع ترکیبات پلی استر می تواند در رفع آلودگی های زیست محیطی نقش مهمی ایفا کند.

کلون سازی و تعیین توالی و با توجه به نتایج BLAST از جدول ۲ بیشترین شباهت با ۹۸٪ همانندی با آنزیم کوتیناز *cut1* که توسط ژانگ (Zhang) و همکارانش در ۱۹۹۸ گزارش شده (۱۰) و ۹۶٪ شباهت با آنزیم کوتیناز *cut-1.KW3* که توسط وی (Wei) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ تعیین توالی شده است در باکتری ترموبیفیدا فوسکا مشاهده گردید (۱۱).

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانم نیلوفر نیک نام، آقای ترکزاده و خانم دکتر محبوبه نظری به دلیل همکاری های ارزنده کمال امتنان را دارند.

## نتیجه گیری

با بیان آنزیم کوتیناز کلون شده در این تحقیق و بررسی های ساختاری-عملکردی متعاقب آن و فعالیت آنزیم در واکنش با

## References

1. Carvalho CML, Aires-Barros MR, Cabral JMS. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electron J Biotechnol.* 1998; 1(3): 160-173.
2. Heredia A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1620(1-3): 1-7.
3. Degani O, Salman H, Gepstein S, Dosoretz CG. Synthesis and characterization of a new cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methyl sulfone ester) hexadecanoate. *J Biotechnol.* 2006; 121(3): 346-350.
4. Xia Y, Yu K, Navarre D, Seebold K, Kachroo A, Kachroo P. The glabra1 mutation affects cuticle formation and plant responses to microbes. *Plant Physiol.* 2010; 154(2): 833-846.
5. Liu Z, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong XP, Gross R, Montclare JK. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: Enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc.* 2009; 131(43): 15711-15716.
6. Billig S, Oeser T, Birkemeyer C, Zimmermann W. Hydrolysis of cyclic poly (ethylene terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 87(5): 1753-1764.
7. Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J, Wu J. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *J Mol Catal B Enzym.* 2010; 63(3-4): 121-127.
8. Gonçalves AP, Cabral JM, Aires-Barros MR. Immobilization of a recombinant cutinase by entrapment and by covalent binding. Kinetic and stability studies. *Appl Biochem Biotechnol.* 1996; 60(3): 217-28.
9. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. Third Edition. USA: Springer Science-Business Media, Inc. 2006.
10. Zhang Z, Wang Y, Ruan J. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1998; 48(2): 411-422
11. Wei R, Oeser T, Zimmermann W. Cloning, expression and mutagenesis of cutinases isolated from *Thermobifida fusca* KW3 and their applications for polyethylene terephthalate hydrolysis. Submitted to the EMBL/GenBank/DBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE. 2010.



## Isolation and cloning of the *cutinase* gene obtained from indigenous thermophiles *Thermobifida fusca* bacteria

Elahe Pourfakhraei<sup>1</sup>, Mehrdad Behmanesh<sup>2</sup>, Majid Erfani Moghadam<sup>3</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

---

### Abstract

**Background and Objectives:** Cutinase belongs to serine hydrolase family that is used for elimination of environmental pollutions due to its special structural and functional properties and applications. In this study, cutinase gene was isolated from indigenous thermophiles *Thermobifida fusca* and was cloned in *E. coli*.

**Material and Methods:** Sampling was performed from forest soils in the north of Iran. *Thermobifida fusca* bacteria were isolated with suitable cultures under optimized conditions (pH 10 and T=62 °C). After primer designation, *cut1* gene was isolated from bacterium and then, was cloned in pBluescript sk vector and was introduced into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The colonization was confirmed based on enzymatic digestion and sequencing.

**Result:** Based on BLAST software, there was 98% and 96% similarities were obtained with *cut1* and cut-1.KW3, respectively.

**Conclusions:** Based on broad functions of the enzyme on various substrates and its ability for synthesis of various polyester compounds, this enzyme has an important role in environmental decontamination.

**Keywords:** *Thermobifida fusca*, Cutinase, Cloning