

بررسی مولکولی و همسان سازی ژن متیونیناز از باسیلوس های هالوفیل در سلول مستعد جهت استفاده در صنعت

فروغ سهی راد^۱، منصور بیات^{۲*}، محدثه لاری پور^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی صنعتی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه و فناوری های نوین،

دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استاد قارچ شناسی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳- دانشیار قارچ شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال،

تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۳۰

چکیده

متیونیناز آنزیمی است که در زمینه ی داروسازی به ویژه کانسرتراپی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. باسیلوس های هالوفیلیک گروهی از باکتری های گرم مثبتی هستند که در محیط نمکی زندگی می کنند. این ارگانسیم ها مخازن بالقوه آنزیم هایی هستند که به وفور در صنایع مختلف کاربرد دارند. از این رو هدف این مطالعه بررسی مولکولی و همسان سازی ژن متیونیناز از باسیلوس های هالوفیل در سلول مستعد جهت استفاده در صنعت می باشد. سویه های جنس باسیلوس از مجموع ۲۰ نمونه آب شور از بندرعباس-خلیج فارس جداسازی و تعیین هویت شدند و سپس با روش PCR، ژن متیونیناز از این باسیلوس ها جدا گردید. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ به وکتور انتقالی pTG19 وارد شد. در مرحله بعد وکتور نو ترکیب به اشریشیا اوریکامی استاندارد ترانسفورم شد از ۱۲ سویه باسیلوس جدا شده تنها ۲ سویه واجد ژن متیونیناز بود. به منظور تعیین هویت مولکولی جنس باسیلوس حامل ژن متیونیناز از پرایمر خانه دار استفاده گردید. در نهایت با سکانس محصول PCR بیان ژن متیونیناز در باکتری اشریشیا کلی اوریکامی تایید شد. بیان آنزیم متیونیناز با استفاده از روش real-time PCR ارزیابی شد. در نتیجه این پژوهش موفق به پیدا کردن باسیلوس های هالوفیل بومی مولد آنزیم متیونیناز شده و ژن آن با موفقیت از باکتری باسیلوس سوبتلیس به باکتری اشریشیا اوریکامی به منظور بازدهی تولید بالا، وارد گردید که طبق نتایج، بهینه دمایی فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه بود.

کلمات کلیدی: متیونیناز، باسیلوس، همسان سازی، مولکولی، هالوفیل، PCR

*نویسنده مسئول: منصور بیات

آدرس: استاد قارچ شناسی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

پست الکترونیک: m.bayat@srbiau.ac.ir

مقدمه

ال- متیونین-گاما-لیاز (EC 4.4.1.11) که به عنوان متیوناز، متیونیناز، L-متیونین- γ -دمتیولاز و L-متیونین متانتیول-لیاز شناخته می شود. متیونین گاما لیاز (MGL) دارای وزن مولکولی در حدود ۱۴۹ تا ۱۷۳ کیلو دالتون بوده و از چهار زیر واحد یکسان (تقریباً ۴۱ تا ۴۵ کیلو دالتون) تشکیل شده است. متیونیناز یک آنزیم وابسته به پیریدوکسال-۵-فسفات (PLP) است که یک مزیت منحصر به فرد در مهار سرطان دارد. متیونیناز توانایی هدف قرار دادن انتخابی و مهار رشد سلول های سرطانی، بدون آسیب رساندن به سلول های سالم را دارد. چرا که سلول های تومور فاقد یک آنزیم ضروری به نام متیونین سنتاز هستند که سلول های سالم از آن برای ساخت اسید آمینه حیاتی متیونین استفاده می کنند. مطالعات اخیر نشان می دهد که بسیاری از متابولیت ها می توانند خودشان به عنوان یک مولکول پیام رسان عمل کنند و برنامه رشد سلول را کنترل کنند. مطالعات بسیاری، بویژه توسط پژوهشگران سرطان شناسی به این مطلب اشاره داشته اند که «متیونین» ممکن است یک متابولیت پیام رسان باشد. تحقیقات نشان می دهد که بسیاری از سلول های سرطانی برای رشد، به متیونین وابسته هستند. متابولیسم غیرعادی سرطان یک پدیده تکرارشونده در طول پیشرفت سرطان است. بنابراین، جذب متیونین خارج سلولی تغییر یافته ممکن است باعث تومورزایی و پیشرفت شود (Abozeid, A.A, 2023).

متیونین (L-Methionine) با (cas number 3-68-63) یکی از هشت اسید آمینه ی ضروری برای بدن است. متیونین به عنوان یک اسید آمینه ضروری برای مهره داران، با کاربرد های بیوتکنولوژیکی، از جمله در صنایع غذایی، خوراک دام و داروسازی، بسیار مورد

توجه است (Neubauer, C. and Landecker, H., 2021).

در محیط سلولی، متیونین نه تنها برای شروع بیوسنتز پروتئین، بلکه برای تاخوردگی و پایداری پروتئین نیز حیاتی است. علاوه بر این، نقش مهمی به عنوان نقطه شروع فرآیندهای متابولیکی مختلف، از جمله - Sآدنوزیل متیونین (SAM)، یک دهنده برجسته گروه متیل در واکنش های متیلاسیون سلولی، ایفا می کند (Bernasocchi, T. and Mostoslavsky, R., 2024).

بسیاری از رده های سلولی بدخیم انسانی نیازمند متیونین بیشتری برای افزایش سنتز پروتئین و تنظیم بیان DNA هستند. در دسترس بودن بیشتر متیونین باعث فراهمی زیستی بیشتر S-آدنوزیل متیونین برای اهدای گروه های متیل به DNA می شود که این می تواند منجر به هیپرمتیلاسیون در DNA می شود (Vaccaro, J.A. and Naser, S.A., 2021).

از اولین تغییرات اپی ژنتیکی شناسایی شده در سرطان، تغییر در متیلاسیون DNA است. شواهد زیادی وجود دارد که محدودیت متیونین می تواند رشد سلول های سرطانی را مهار کند (Bandaru, N., et al 2025).

توانایی متیونیناز در کاهش سطح متیونین بدن، دلیل اصلی اثرات ضد سرطانی قوی آن است. متیونین نقش مهمی در رشد و تکثیر بسیاری از سلول های سرطانی، به ویژه آن هایی که در انواع خاصی از تومورها دیده می شوند، ایفا می کند. متیونیناز می تواند با کاهش در دسترس بودن این اسید آمینه حیاتی، ضمن حفظ سلول های طبیعی که کمتر به متیونین وابسته هستند، اثرات کشنده ای در سلول های سرطانی ایجاد کند. کاهش متیونین چندین اثر پایین دستی دارد. اول، باعث آپوپتوز می شود؛ کاهش سطح متیونین ممکن است باعث شود سلول های سرطانی مسیرهای آپوپتوز را آغاز کنند



هویت مولکولی جنس باسیلوس حامل ژن متیونیناز از پرایمرهای عمومی ۱۶srRNA به روش PCR استفاده گردید.

جداسازی باسیلوس های تولید کننده آنزیم متیونیناز به منظور شناسایی ژن کد کننده ی آنزیم متیونیناز (mdeA) از کیت دی ان ای اکسترکشن و آزمون PCR با استفاده از زوج پرایمرهای اختصاصی سنتز شده توسط sinacolon انجام گرفت و محصول توسط ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان می دهد که تنها ۲ سویه حامل ژن mdeA می باشد.

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

سایز باند	توالی ژن	نام ژن
190	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'	M13-FP
1420	F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' R 5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'	16s rRNA

کلون کردن ژن کد کننده ی آنزیم متیونیناز (mdeA) در اشریشیا کلی اورینگامی

باکتری E.Coli سویه اورینگامی از بانک میکروارگانسیم ها تهیه گردید. در این پژوهش به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده شد. کیت TA کلونینگ از شرکت Sinaclon تهیه گردید. همانطور که در پروتکل کیت آمده بود از یک وکتور خطی بنام PTG19-T که در انتهای ۳' آن باز تیمین قرار دارد استفاده شد. استفاده از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ۳' خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می گردد، سپس آنزیم ligase T4 DNA با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم می کند، در نتیجه یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر ماست تشکیل شده که توانایی تکثیر خود بخود را در میزبان مناسب مانند E.coli دارا می باشد.

و در نتیجه مرگ برنامه ریزی شده سلولی رخ دهد. دوم، با کاهش تأمین یک ماده مغذی حیاتی، رشد سلول های سرطانی را کند یا متوقف می کند که تکثیر سلولی را محدود می کند (Wahib., et al 2025). متیونیناز، متیونین را به α-کتوبوتیرات، متانتیول و آمونیاک کاتالیز می کند (George, S. and Narayanan, D.P., 2025) مطالعات نشان می دهد MGL از منابع مختلف از جمله: باکتری ها، قارچ ها و گیاهان جدا شده است. اما انسان ها فاقد این آنزیم هستند. در میان منابع MGL که قبلاً توضیح داده شد، باسیلوس های آزری و هالوفیل بهترین منبع باکتریایی برای تولید MGL گزارش شده است (Abozeid, A.A., 2023).

مواد و روش ها

نمونه برداری

این مطالعه از نوع توصیفی-تحلیلی می باشد و به صورت مطالعه علوم پایه انجام شده است. نمونه برداری از آب شور در بندرعباس-خلیج فارس انجام شد که در مجموع ۲۰ نمونه آب از سطح تا عمق ۱۰ سانتی متری نمونه برداری و بعد از بسته بندی در ظروف شیشه ای که از قبل استریل شده به آزمایشگاه ارسال گردید. نمونه ها با دور 8000 rpm سانتریفیوژ شد و از قسمت رسوب آن در محیط لوریا برتانی آگار به صورت چهار منطقه ای کشت انجام گردید. از قسمت کلنی های رشد یافته مشکوک به باسیلوس از نظر ماکروسکوپی، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفتند. از سویه استاندارد باسیلوس به عنوان کنترل مثبت در تمامی مراحل کار استفاده شد. برای غربالگری ۲۰ نمونه آب شور ارسالی به آزمایشگاه کلنی های مشکوک به باسیل های گرم مثبت جداسازی شده که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی تحت عنوان باسیلوس تعیین هویت شدند. به منظور تایید



انتقال وکتور به میزبان اشرشیاکلی اورینگامی

باکتری E.coli سویه اورینگامی در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بمدت ۱۷-۱۶ ساعت کشت داده شد و سپس در دستگاه سانتریفوژ لوله ای بمدت ۱۰ دقیقه در دور 10000g سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شده و رسوب باکتری بدست آمد. ۱۰۰ میکرولیتر از بافر S به رسوب باکتری اضافه کرده سپس بمدت ۱ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار در دور ۱۲۰۰۰g قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از بافر S روی رسوب ریخته و بمدت ۵ دقیقه در یخ قرار گرفت. دوباره در دور 12000g بمدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شده، این بار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر S روی رسوب ریخته و پیپتاژ شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن را به محلول Ligation اضافه کرده و بمدت ۳۰ دقیقه دیگر در یخ قرار داده شد. سپس ۹۰ ثانیه در ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت و دوباره ۱۰ دقیقه دیگر بر روی یخ قرار داده شد. در نهایت محلول بدست آمده در حجم ۷۵ میکرولیتر در تیوب های ۱/۵ میلی لیتری درب پیچ دار مخصوص ذخیره گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد بصورت بلند مدت نگهداری شد. ۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ساخته شده برداشته و در ویال ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و مواد transfer شده را که در یخ قرار دارند به آن اضافه شد. پس از پیپتاژ کردن بمدت ۶۰-۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. به محیط کشت آنتی بیوتیک آمپی سیلین اضافه شد تا باکتری بتواند در محیط رشد کند و وکتوری که دریافت کرده را نگه دارد. سپس محتویات بمدت ۱ دقیقه در دور 650g سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری روی پلیت LB کشت داده شد و بمدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و در نهایت انجام کلونینگ تایید گردید.

و در نهایت به منظور تایید کلونینگ مرحله زیر انجام شد:

۱. کلونال سلکشن (کلونی های سفید و آبی)

۲. پرایمر M13

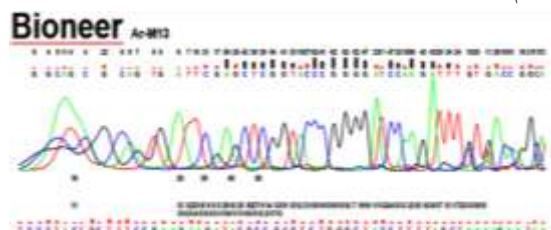
۳. سکانس و توالی یابی جانکشن ها

محصول PCR برای سکانس و بررسی بیان به شرکت Bioner ارسال گردید و BLAST شد.



تایید کلونینگ با روش کلونال سلکشن آبی و سفید

توالی های به دست آمده از نظر تشابه ژنتیکی با سایر توالی های ثبت شده در سایت NCBI هم ردیف شده و درخت فیلوژنی ترسیم گردید. به این صورت که ابتدا توالی DNA و mRNA ژن ۱۶srRNA در سایت NCBI شناسایی شد. سپس توالی چندین ژن ۱۶srRNA از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد و با استفاده از نرم افزار clustalX توالی های این ژن با سایر باکتری ها هم تراز گردید. در ادامه تعداد جهش ها، تنوع نوکلئوتیدی، درصد تفرق ژنی و ... با استفاده از قسمت آنالیز ژنی در سایت NCBI انجام گردید. برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار Mega5 استفاده شد.



محل ایجاد جانکشن و سکانس مربوط به آن توسط شرکت بیونر

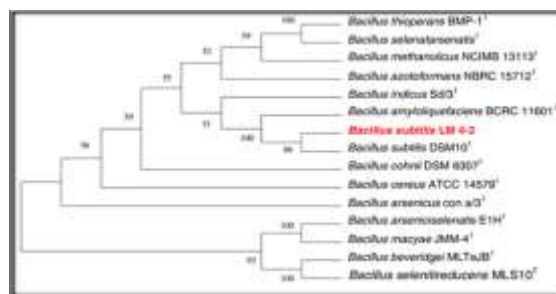
اطلاعات پرایمر متیونیناز سنتز شده توسط شرکت سیناکلون به سفارش پژوهشگر

Oligo name	Seq.(5-3)	MW	OD (1000μl)	nmol	Water/ tube (μl)	TM	GC%	Mer
Methioninase-F- 1042bp	ATGAGCATCACCCAGAAC	5461.6	2	12.08	120.84	53.69	50	18
Methioninase-R	TCATTTTCCAATCTTCCAT	5967.9	2	11.06	110.59	49.10	30	20

کلونینگ نشان داد که این ژن در اشریشیا کلی اورینگامی بطور موفقیت آمیزی کلون شده است. بررسی درخت فیلوژنی گونه های مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه در بخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیکی بین گونه های باسیلوس با استفاده از ژن ۱۶srRNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (Neighbor-Joining) نشان می دهد که نمونه ما با گونه های باسیلوس سوبتیلیس با بوت استرپ ۹۹٪ در یک کلاسد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن ها با هم بود.

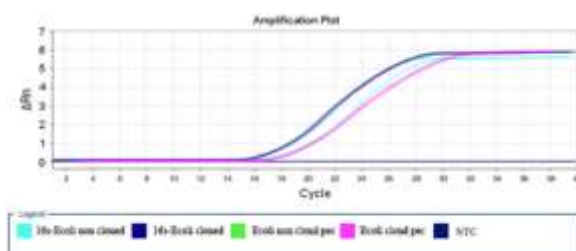
بحث

سلول های سرطانی در مقایسه با سلول های طبیعی، برای رشد و تکثیر سریع به مقدار زیادی گلوکز نیاز دارند. اما درمان های بر پایه ی حذف، گلوکز به علت اینکه سلول های طبیعی نیز برای زنده ماندن و رشد به گلوکز نیاز دارند غیر ممکن است. یکی دیگر از ضروریات متابولیکی سلول های سرطانی، وابستگی آن ها به سطوح بالای اسیدهای آمینه خاص، از جمله متیونین برای رشد و تکثیر است. به همین جهت آنزیم متیونیناز به عنوان یک عامل محدودیت متیونین بسیار مورد توجه واقع شده است (Qoura, L.A. et al., 2024). Mohkam و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای اولین بار، تولید ال-متیونیناز از یک جنس جدید Alcaligenes را گزارش کرد که از نمونه های خاک جدا و شناسایی شد. در این مطالعه



درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16srRNA با

استفاده از نرم افزار Mega5



میزان بیان ژن متیونیناز توسط سویه ی نوترکیب به وسیله ی آزمون Real time PCR بررسی شد

نتایج

در نتیجه غربالگری ۲۰ نمونه آب ارسالی به آزمایشگاه در مجموع ۱۲ کلنی مشکوک به باسیل های گرم مثبت جداسازی شد. الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که تنها ۲ سویه حامل ژن mdeA می باشد. پس از کلون کردن سویه حامل ژن متیونیناز توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند و برای تایید حضور پرایمر M13 از کلنی های مشکوک DNA استخراج شد. توسط آزمون PCR و الکتروفورز محصول PCR، ورود ژن های پلازمید به باکتری اشریشیا کلی اورینگامی تایید شد. در نتیجه آزمون

نمونه‌ها از خاک باغ‌های مختلف شهر شیراز در استان فارس، ایران، جمع آوری شده بود. Ghalehno و همکاران در سال ۲۰۱۸ "به بررسی جداسازی و شناسایی سویه های تولیدکننده مواد فعال ضد میکروبی در طی غربالگری باکتری‌های گرم مثبت تشکیل دهنده ی آندوسپور هالوفیل جدا شده از دریاچه‌های شور ایران پرداختند. تعداد ۶۲ ایزوله از دریاچه‌های شور مختلف ایران جداسازی شدند." استخراج آنزیم متیونیناز از باکتری های تولید کننده این آنزیم، یکی از روش های دستیابی به این آنزیم است که در این مورد نیز تحقیقات متعددی انجام یافته است. در این مورد Azizi, E و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه ای "تحت عنوان جداسازی و شناسایی اکستروموفیل های مولد ضد سرطان آنزیم های ال-گلوتامیناز و ال-متیونیناز از چشمه آب گرم ییل گنبد که در قزوین، ایران انجام شده بود دریافتند که از مجموع ۲۰ نمونه آب گرم یله گنبد قزوین ۱۲ کلنی رشد کرد اما تنها ۱ ایزوله دارای متیونیناز فعال بود. در این مطالعه، باسیلوس لیکینی فورمیس به عنوان یک سویه غالب و یک سویه بومی برای تولید متیونیناز شناسایی شد." در مطالعه ی دیگری که در اندونزی توسط Prihanto, A.A در سال ۲۰۱۸ تحت عنوان باسیلوس سوبتیلیس UB Tn7، یک تولیدکننده بالقوه L-متیوناز جدا شده از گیاه حرا، Rhizophora mucronata انجام گرفت. "هدف از این مطالعه به دست آوردن باکتری اندوفیت مولد ال متیونیناز جدا شده از ریشه، ساقه و برگ درختان حرا بود که بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، بهترین تولید کننده باسیلوس سوبتیلیس بود." تولید آنزیم متیونیناز توسط سایر گونه های میکروبی مانند قارچ ها نیز انجام می گیرد. در مطالعه ای که در عربستان توسط Alzahrani و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام گرفت "از

۲۴ گونه قارچی که از ریزوسفر گیاهی جدا شده بود ۸ جدایه توانایی تولید آنزیم را داشتند که در مقایسه با باسیلوس های جدا شده در این مطالعه از توانایی بالایی در این زمینه برخورد بودند. آن ها همچنین توالی srRNA ۱۶ جدایه های قارچی را آنالیز کردند و گزارش دادند که اکثر این قارچ ها از نوع آسپرژیلوس و پنی سیلیوم بوده اند."

نتیجه گیری

تولید دارو از طریق فناوری DNA نو ترکیب و اثرات درمانی آن از مباحث روز جوامع علوم پزشکی جهان است. ایران دارای تنوعی از محیط های شور با غلظت های مختلف است. این محیط ها شامل معادن نمکی، بیابان های شور، رودخانه های نمکی و به ویژه دریاچه های نمک است. دریاچه ارومیه بزرگ ترین و شور ترین دریاچه دائمی ایران و یکی از دریاچه های فوق اشباع از نمک دنیا است که از این نظر با دریاچه نمک بزرگ آمریکا شباهت دارد. همچنین خلیج فارس به عنوان یکی از شور ترین آب های آزاد شناخته می شود. میکروارگانیسم های هالوفیل (نمک دوست) میکروارگانیسم هایی هستند که در محیط های شور و غنی از نمک زندگی می کنند. این موجودات به دلیل توانایی تحمل شرایط سخت و نقش در چرخه های زیستی، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. متیونیناز یکی از آنزیم های صنعتی با ارزش درمانی بالا است و به عنوان یک عامل ضد سرطانی قوی در برابر انواع مختلف رده های سلولی تومور به حساب می آید. بسیاری از رده های سلولی سرطانی انسان و تومورهای اولیه نیاز مطلق به L-متیونین، یک اسید آمینه ضروری برای بقا و تکثیر دارند. از سوی دیگر، سلول های طبیعی به دلیل متیونین سنتاز فعال، توانایی رشد بر روی هموسیستین، به جای متیونین را دارند. بسیاری از سلول های تومور فاقد متیونین سنتاز



- achievements, gaps, and future directions. *Microorganisms*, 9(10), p.2021.
5. Azizi, E., FARAHMAND, M. and Shahhosseini, M.H., 2018. Isolation and Identification of extremophiles producing anticancer L-glutaminase and L-Methioninase enzymes from Yale Gonbad hot spring in Qazvin, Iran.
 6. Bandaru, N., Noor, S.M., Kammili, M.L., Bonthu, M.G., Gayatri, A.P. and Kumar, P.K., 2025. Methionine restriction for cancer therapy: From preclinical studies to clinical trials. *Cancer Pathogenesis and Therapy*.
 7. Bernasocchi, T. and Mostoslavsky, R., 2024. Subcellular one carbon metabolism in cancer, aging and epigenetics. *Frontiers in epigenetics and epigenomics*, 2, p.1451971.
 8. Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E. and Soerjomataram, I., 2021. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), pp.3029-3030.
 9. George, S. and Narayanan, D.P., 2025. Biocatalytic Properties of Mangrove Microbiome. In *Mangrove Microbiome: Diversity and Bioprospecting* (pp. 297-308). Singapore: Springer Nature Singapore.
 10. Ghalehno, A.D., Ghavidel-Aliabadi, M., Shahmohamadi, Z., Mehrshad, M., Amoozegar, M.A. and Danesh, A., 2018. Isolation and Discovery of New Antimicrobial-agent Producer Strains Using Antibacterial Screening of Halophilic Gram-positive Endospore-forming Bacteria Isolated from Saline Lakes of Iran. *Arak. Med. Univ. J*, 20, pp.10-23.
 11. Javia, B.M., Gadhvi, M.S., Vyas, S.J., Ghelani, A., Wirajana, N. and Dudhagara, D.R., 2024. A review on L-methioninase in cancer therapy: Precision targeting, advancements and diverse applications for a promising future. *International Journal of*
- فعال هستند بنابراین به مکمل متیونین خارجی از طریق رژیم غذایی وابسته هستند. در نتیجه، متیونین هدف اصلی تومور های خاص برای درمان است؛ بنابراین، بهره برداری درمانی از L-متیونیناز برای تخلیه متیونین پلاسما یک روش امیدوار کننده به نظر می رسد. علاوه بر این، توزیع محدود L-متیونیناز به عنوان آنزیم درون سلولی در بین همه پاتوژن های میکروبی، اما نه در انسان، این آنزیم را به یک هدف دارویی امیدوار کننده برای درمان های ضد باکتری، ضد قارچ و ضد تک یاخته تبدیل می کند. با توجه به اهمیت این مسئله و استفاده دارویی از آنزیم متیونیناز، در این مطالعه تلاش شد تا تولید این آنزیم از طریق روش کلونینگ توسط باکتری سریع رشد اشیشیا کلی اورینگامی انجام بگیرد تا قدمی در راستای تولید انبوه از این آنزیم با کمک باکتری ها صورت پذیرد. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که ژن آنزیم میونیناز در باسیلوس های هالوفیل موجود در آب های بندرعباس-خلیج فارس وجود دارد و با کلونینگ آن در اشیشیا کلی اورینگامی می توان به میزان گسترده تر و با صرفه اقتصادی بیشتر این آنزیم صنعتی را تولید نمود.
- منابع**
1. Abozeid, A.A., 2023. Short review on microbial L-methioninase and its applications. *Bulletin of Faculty of Science, Zagazig University*, 20 (4), pp.107-139.
 2. Aledo, J.C., 2019. Methionine in proteins: The Cinderella of the proteinogenic amino acids. *Protein Science*, 28(10), pp.1785-1796.
 3. Alshehri, W.A., 2020. Bacterium Hafnia alvei secretes L-methioninase enzyme: Optimization of the enzyme secretion conditions. *Saudi journal of biological sciences*, 27(5), pp.1222-1227.
 4. Alzahrani, K.J., 2021. Microbiome studies from Saudi Arabia over the last 10 years:



20. Neubauer, C. and Landecker, H., 2021. A planetary health perspective on synthetic methionine. *Lancet Planet Health* 5 (8): e560–e569 [online]
21. Prihanto, A.A., 2018, April. *Bacillus subtilis* UBTn7, a potential producer of L-Methioninase isolated from mangrove, *Rhizophora mucronata*. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 137, No. 1, p. 012077). IOP Publishing.
22. Qoura, L.A., Balakin, K.V., Hoffman, R.M. and Pokrovsky, V.S., 2024. The potential of methioninase for cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, **1879**(4), p.189122.
23. Raboni, S., Faggiano, S., Bettati, S. and Mozzarelli, A., 2024. Methionine gamma lyase: Structure-activity relationships and therapeutic applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1872**(3), p.140991.
24. Suganya, K., Govindan, K., Prabha, P. and Murugan, M., 2017. An extensive review on L-methioninase and its potential applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **12**, pp.104-115.
25. Vaccaro, J.A. and Naser, S.A., 2021, December. The role of methyl donors of the methionine cycle in gastrointestinal infection and inflammation. In *Healthcare* (Vol. 10, No. 1, p. 61). MDPI.
26. Wahib, Z.M., Muslim, S.N. and Shafi, F.A.A., 2025. Production, Purification, and Characterization of L-Methioninase Produced by *Escherichia coli* Isolates: Potential Application in Cancer Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Biology*, **10** (2), pp.285-292.
27. Wanders, D., Hobson, K. and Ji, X., 2020. Methionine restriction and cancer biology. *Nutrients*, **12**(3), p.684.
- Biological Macromolecules*, 265, p.130997.
12. Kaiser, P., 2020. Methionine dependence of cancer. *Biomolecules*, **10**(4), p.568.
13. Kavya, D. and Nadumane, V.K., 2020. Identification of highest L-Methioninase enzyme producers among soil microbial isolates, with potential antioxidant and anticancer properties.
14. Kharayat, B. and Singh, P., 2018. Statistical optimization of reaction condition of L-methioninase from *Bacillus subtilis*. *Research Reports*, **2**(2018), pp.1-9.
15. Lauinger, L. and Kaiser, P., 2021. Sensing and signaling of methionine metabolism. *Metabolites*, **11**(2), p.83.
16. Ma, C., Xu, A., Zuo, L., Li, Q., Fan, F., Hu, Y. and Sun, C., 2025. Methionine Dependency and Restriction in Cancer: Exploring the Pathogenic Function and Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals*, **18**(5), p.640.
17. Mohkam, M., Taleban, Y., Golkar, N., Berenjian, A., Dehshahri, A., Mobasher, M.A. and Ghasemi, Y., 2020. Isolation and identification of novel L-methioninase producing bacteria and optimization of its production by experimental design method. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **26**, p.101566.
18. Navik, U., Sheth, V.G., Khurana, A., Jawalekar, S.S., Allawadhi, P., Gaddam, R.R., Bhatti, J.S. and Tikoo, K., 2021. Methionine as a double-edged sword in health and disease: Current perspective and future challenges. *Ageing research reviews*, **72**, p.101500.
19. Navik, U., Sheth, V.G., Khurana, A., Jawalekar, S.S., Allawadhi, P., Gaddam, R.R., Bhatti, J.S. and Tikoo, K., 2021. Methionine as a double-edged sword in health and disease: Current perspective and future challenges. *Ageing research reviews*, **72**, p.101500.



Molecular study and cloning of Methioninase gene from halophilic bacilli in cells susceptible to industrial application

Forough sahirad¹, Mansour bayat^{*2}, mohaddeseh larypoor³

1. Master's degree in Industrial Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences and New Technologies, Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Professor of Veterinary Mycology, Pathobiology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Associate Professor of Medical Mycology, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 21 August 2025

Accepted: 14 October 2025

Abstract

Methioninase is an enzyme that has been widely studied in the field of pharmacy, especially cancer therapy. Halophilic bacillus are a group of gram-positive bacteria that live in saline environments. These organisms are potential reservoirs of enzymes that are widely used in industries. Therefore, the aim is molecular investigation and cloning of the methioninase gene from halophilic bacilli in the susceptible cell for use in industry. Bacillus strains were isolated and identified from a total of 20 saline water samples in Persian Gulf-Bandarabbas, and then the methioninase gene was isolated from the bacilli by PCR method. The amplified fragment was inserted into the pTG19 transfer vector by TA cloning method. In the next step, the recombinant vector was transformed into E.coli uragami. The expression level of pectinase enzyme was evaluated using real-time PCR method. Out of 12 Bacillus strains isolated, only 2 strains had methioninase gene. In order to determine the molecular identity of the Bacillus genus carrying the methioninase gene, housekeeping primers were used. Finally, the expression of methioninase gene in Escherichia coli Oragami bacteria was confirmed by PCR product sequence. As a result of this research, it was possible to find local halophilic bacilli producing methioninase enzyme and its gene was successfully transferred from Bacillus bacterium to E.coli bacterium for high production efficiency. According to the results, the optimal temperature of enzyme activity is at 37 degrees.

Keywords: Methioninase, Bacilli, cloning, Molecular, Halophile, PCR

*Corresponding author: Mansour bayat

Address: Professor of Veterinary Mycology, Pathobiology Department, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

E. mail: m.bayat@srbiau.ac.ir

