جداسازی و همسانه سازی ژن آنزیم کیتیناز از باکتری *Serratia marcescens* B4A جدا شده از استخرهای پرورش میگو

سمیه باباشپور [۱]، سعید امین زاده [۲*]، ناصر فرخی [۳]، محمود خسروشاهلی [۱]، منور کشاورز [۱]

۱- گروه زیست فناوری گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران- ایران.

۲- گروه زیست فناوری دامی و دریایی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران- ایران.

۳- دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود- ایران.

*نویسنده مسئول: aminzade@nigeb.ac.ir

دریافت مقاله: ۱ آبان ۸۹ ، پذیرش نهایی: ۲۰ فروردین ۹۰

چکیده

کیتیناز اهمیت اقتصادی چشمگیری در خصوص تجزیه مواد کیتینی و پاکسازی محیط زیست و تبدیل آن به ترکیبات اولیه سازنده آن دارد و با رشد جمعیت و محدودیت منابع طبیعی، تکنولوژی آنزیم می تواند برای بسیاری از صنایع جهت غلبه بر مشکلات اقتصادی درآینده نزدیک مفید باشد. به همین منظور ژن کد کننده آنزیم اندوکیتیناز حاصل از یک سوش باکتریایی (*Serratia marcescens* B4A) از پساب استخر پرورش میگو جداسازی شد و در باکتری *Escherichia coli* جهت دست یابی به توالی کامل ژن کیتیناز و مقایسه آن با توالی کد کننده کیتیناز باکتری های دیگر همسانه سازی گردید. پس از ثبت توالی در پایگاه اینترنتی، مطالعات بیوانفورماتیکی برای توالی همسانه سازی شده صورت پذیرفت. مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره ۱، ۵۰-۴۱.

واژه های کلیدی: کیتیناز، کلونینگ، *Serratia marcescens*.

Isolation and Cloning of Chitinase Gene from *Serratia marcescens* B4A from Shrimp Farming Ponds

Babashpour, S.[1], Aminzadeh, S.[2*], Farrokhi, N.[3], Khosroshahli, M.[1], Keshavarz, M.[1]

[1]*Department of Plant Biotechnology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Tehran- Iran.*

[2]*Department of Animal & Marine Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Tehran-Iran.*

[3]*Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Shahrood-Iran.*

Abstract

Chitinase has many applications amongst which is its chitinolytic activity towards environmental clean up and converting the chitin into its building blocks. In a world with fast growing population and limited natural resources, the enzyme technology can be helpful to a lot of industries, helping to overcome to the future problems. For this reason, a near full-length endochitinase gene from *Serratia marcescens* B4A, was isolated from shrimp farming pond waste water and cloned in *Escherichia coli*. Subsequent to the deposition of sequence information in GenBank, further bioinformatic analyses were performed. ***J. Vet. Microbiol. 7,1:41-50, 2011.***

Keywords: Chitinase, Cloning, *Serratia marcescens*.

مقدمه

کیتین $(C_8H_{13}O_5N)_n$ پلیمر پلی ساکاریدی بدون شاخه می باشد که از مونومرهای N- استیل- گلوکزآمین تشکیل شده است، این پلیمر غیرمحلول در آب و از آلاینده های محیط زیست محسوب می گردد. مقدار کیتین سخت پوستان در کل محیط های دریایی ۱۵۶۰ میلیون تن تخمین زده شده است (۳۴و۴۰). کیتین سوبسترای آنزیم کیتیناز، قسمت داخلی دیواره سلولی قارچ ها و پوشش خارجی نماتودها و تخم و کیست نماتودها و همچنین پوشش خارجی سخت پوستانی چون میگو و فلس ماهی ها را تشکیل می دهد. آنزیم های کیتیناز نوعی گلیکوزیل هیدرولاز با قدرت کاتالیز می باشند که قادرند پیوند گلیکوسیدی β-1,4 را در بین واحدهای N- استیل- گلوکزآمین (GlcNAc) بشکنند (۳۳و۱۶،۱۱). بدین ترتیب می توانند پلیمر کیتین را به الیگوساکاریدهای کیتینی، دی استیل کیتوبیوز و N استیل- گلوکزآمین تجزیه کنند (۳۹).

کیتیناز ها در تجزیه مواد کیتینی و پاکسازی محیط زیست، تهیه مواد پیش ماده، تولید پروتوپلاست قارچی و تولید پروتئین های تک سلولی برای حیوانات و تغذیه موجودات آبزی کاربرد دارند (۴۶و۱۵). در خصوص کنترل قارچ های پاتوژن گیاهی و آفات دارای اهمیت ویژه‌ای می باشند (۴۱ و ۲۴، ۲۳، ۲). آنزیم کیتیناز کاربرد عمده‌ای در زمینه های کشاورزی، دامداری و شیلات، پزشکی و صنعت دارد. ارگانیسم های تولیدکننده کیتیناز در فرآیند های تبدیل مواد زیستی نظیر ضایعات پوست ماهی به بخش های تک جزئی و در بدست‌آمدن محصولات با ارزشی چون قارچ‌کش زیستی از پوسته خرچنگ و میگو حاصل از ضایعات دریایی نقش دارند (۲۱). کیتیناز ها را در منابع باکتریایی متنوعی می توان یافت که به علت تولید بالای کیتیناز به شدت مورد مطالعه هستند (جدول ۱).

Serratia marcescens یک باکتری گرم منفی، متحرک، باسیلی شکل و بی‌هوازی اختیاری است. قطر متوسط این باکتری ۰/۸-۰/۵ نانومتر و طول آن ۲-۰/۹ نانومتر بوده و از نظر تاکسونومیکی متعلق به خانواده Enterobacteriaceae است (جدول۲). کلونی های باکتری روی محیط نوترینت آگار، کدر، گرد، محدب با حاشیه صاف و به رنگ سفید، صورتی یا قرمز می‌باشد. این باکتری در طیف وسیعی از دما (۴۰- ۵ درجه سانتیگراد) و pH (۹-۵) رشد کرده و در محیط های طبیعی (خاک و آب) و در سطح گیاهان یافت می‌شود.

ژن های کیتیناز زیادی از منابع مختلف گیاهی، قارچی و باکتریایی جدا و همسانه‌سازی شده‌اند (۷) (جدول۳). در سال ۱۹۹۷ به منظور افزایش فعالیت حشره کشی باکتری *Bacillus thuringiensis*، ژن کیتیناز جداسازی شده از باکتری TPl *Bacillus licheniformis* در سویه‌ای از *coli E.* همسانه‌سازی شد و به *thuringiensis* subsp. *aizawai* *Bacillus* انتقال یافت و خاصیت حشره کشی این سویه بر روی لارو حشره *Spodoptera exigua* مورد مطالعه قرار گرفت (۴۳). نتیجه تحقیقات بر روی ژن کیتیناز باکتری pakistani subsp. *Bacillus thuringiensis* نشان داد ORF این ژن شامل ۱۹۰۵ نوکلئوتید می‌باشد که ۶۳۵ اسید آمینه (۷۱ کیلو دالتون) را کد می‌کند. مطالعات نشان دهنده یک زیر ساختار کاتالیکی فعال و یک منطقه اسید آمینه‌ای حفاظت شده همانند زیر ساختار متصل شونده به کیتین بود. کیتین کلوئیدی در همان ابتدا به وسیله این آنزیم به واحدهای N-استیل-گلوکزآمین هیدرولیز می‌گردد. این گونه نتیجه گیری شد که این آنزیم اگزوکیتیناز است (۴۱). Huang و همکاران دو کیتیناز (*chi CW* و *chi CH*) را از *cereus* *Bacillus* جدا نمودند و آن را در *E. coli* کلون و بیان نمودند تا اثر بازدارندگی آن را بر عامل بلایت سوسن (*elliptica* *Botrytis*) مطالعه نمایند (۱۸).

تحقیق حاضر در راستای فراهم آوردن زمینه مطالعات آنزیمی، مطالعات بیوشیمیایی و مهندسی پروتئین، آغاز شد. مطالعه بیوانفورماتیکی آنزیم کیتیناز، طراحی پرایمر و تکثیر ژن کیتیناز از سویه بومی *Serratia marcescens* B4A انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی کامل ژن کیتیناز جدا شده از این سویه باکتری، بررسی و در بانک جهانی ژن ثبت گردید.

مواد و روش کار

۱. استخراج DNA ژنومی از سویه جدا شده:

در این پژوهش با توجه به فراوانی کیتین، سوبسترای اصلی این آنزیم، در استخر های پرورش میگو، باکتری B4A *Serratia marcescens* با رعایت کامل شرایط نمونه برداری استریل به منظور استخراج DNA ژنومی از استخر پرورش میگو آبادان جدا گردید. باکتری جدا شده، در طی تحقیقات اولیه به عنوان سویه بومی تولید کننده کیتیناز، شناسایی و معرفی شد (۵۴). کشت از تک کلون باکتری در محیط کشت LB مایع استریل (با ترکیب ۱۰ گرم در لیتر تریپتون، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۱۰ گرم در لیتر نمک طعام) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت صورت گرفت و استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA از شرکت (Germany Metabion (Martinsried, مطابق با توصیه شرکت سازنده انجام پذیرفت. کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراجی به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد تعیین گردید. آگارز از شرکت Fermentas (Canada Burlington,) و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه گردیدند.

تکثیر ژن کیتیناز مربوط به سویه بومی جدا شده:

۱- طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن کیتیناز: با توجه به توالی ژن کیتیناز در گونه‌های نزدیک به باکتری *marcescens* *Serratia* (AY040610.2, EF451957.1, EU753246.1 Accession Number:) آغازگرهای مرتبط با استفاده از نرم افزار

جدول ۱- تعدادی از منابع باکتریایی تولیدکننده آنزیم کیتیناز.

Genuse	References
Aeromonas	(Sitrit et al., 1995; Shiro et al., 1996; Lin et al., 2009)
Alteromonas	(Tsujibo et al., 1993)
Bacillus	(Mostafa et al., 2009; Wang et al., 2009; Yang et al., 2009)
Serratia	et al., 1995; Gal, 1997; Gal et al., 1998; Okay et al., 2008) (Brurberg
Vibrio	(Svitil et al., 1997; Honda et al., 2008; Pantoom et al., 2008)
Enterobacter	et al., 1995; Chernin et al., 1997; Dahiya et al., 2005) (Chernin
Streptomyces	(Kim et al., 2003; Okazaki et al., 2004; Yano et al., 2008)
Pseudamonas	(Neiendam Nielsen and Sorensen, 1999; Suzann, 2001)

5.0 (National Biosciences, Inc, PlymouthMN,USA) Oligo طراحی گردید (جدول ۴).

۲. تکثیر ژن کیتیناز از DNA ژنومی الگو جهت استفاده در فرایند کلونینگ: مخلوط واکنش PCR با استفاده از محلول $MgCl_2$ (25 mM) به حجم ۱/۵ میکرولیتر، یک میکرولیتر از محلول dNTPs (۵ mM) ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x PCR، یک میکرولیتر آغازگر fEc1 (20pmol)، یک میکرولیتر آغازگر Rec2 (20pmol)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (5Unit/ml) دو میکرولیتر و یک میکرولیتر الگو که با اضافه نمودن آب دیونیزه به حجم ۲۵ میکرولیتر رساندیم، آماده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد برای واسرشت سازی اولیه و ۳۵ سیکل به صورت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد جهت واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد جهت اتصال آغازگرها و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت فرایند تکثیر تکرار شد. ۵ دقیقه دمای درجه سانتیگراد برای فرآیند گسترش نهایی برنامه ریزی شد و در نهایت در دمای ۴ درجه سانتیگراد سرد شد. پس از انجام PCR، محصول آن بر روی ژل آگارز (w/v) یک درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، تکثیر ژن کیتیناز بررسی شد.

۳. تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

باند اختصاصی از ژل با استفاده از کیت Purification High Pure PCR Product از شرکت (Indianapolis, USA) Roche مطابق با توصیه سازنده، تخلیص شد و برای انجام کلونینگ آماده گردید.

۴. انجام واکنش الحاق محصول PCR با پلاسمید:

ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T دو میکرولیتر، بافر الحاق ۱۰x

جدول ۲- تاکسونومی باکتری *Serratia marcescens*.

سلسله	Bacteria
شاخه	Proteobacteria
رده	Gamma Proteobacteria
راسته	Enterobacteriales
خانواده	Enterobacteriaceae
جنس	Serratia
گونه	S. marcescens

دو میکرولیتر، محصول PCR تخلیص شده ۱۳ میکرولیتر، ۰/۷ میکرولیتر از یک T4DNA Ligase Unit/m و ۰/۳ میکرولیتر از ATP 10 mM با آب دیونیزه به حجم ۲۰ میلی لیتر رساندیم، ورتکس کوچکی انجام گرفت و مخلوط Ligation در دمای ۱۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد.

۵. ترانسفورماسیون محصول الحاق به باکتری *E. coli*:

از سویه مستعد شده DH5α باکتری *E. coli* به عنوان میزبان در مراحل کلون سازی و جهت تکثیر DNA پلاسمیدی استفاده گردید. به باکتری‌های مستعد، مقدار ۲۰ میکرولیتر محصول الحاق بر روی یخ اضافه شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه درون یخ قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان، به منظور ایجاد یک شوک حرارتی، میکروتیوب‌ها ۲ دقیقه درون بن ماری ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بلافاصله میکروتیوب‌ها به مدت ۵ دقیقه درون یخ قرار داده شدند. ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB بدون آنتی بیوتیک به هر کدام از تیوبها اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. پلیت‌های LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین با غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر به مدت ۳۰ دقیقه قبل از استفاده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. محتوای میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۰ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد و حدود ۳۰۰ میکرولیتر از سوپ رویی برداشته شد، طوری که ۳۰۰-۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت به همراه توده باکتریایی باقی ماند. توده باکتری باقی مانده بر روی سطح LB آگار واجد آنتی بیوتیک آمپی سیلین پخش گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. انتخاب کلون‌های حاوی پلاسمید pTZ57R/T نوترکیب براساس تشکیل کلونی‌های آبی و سفید صورت گرفت. کلونی‌های آبی رنگ فاقد پلاسمید نوترکیب هستند؛ زیرا آنزیم β-گالاکتوزیداز (lac Z) تولیدی آنها X-gal را به محصول رنگی هیدرولیز می‌کند. کلونی‌های سفید حاوی

جدول ۳ - پیشینه تحقیق درمورد کلون سازی ژن آنزیم کیتیناز.

منبع آنزیم	میزبان کلون سازی	هدف	رفرانس
Bacillus lichenif ormis TPl	*E. coli* (DH5α)	افزایش فعالیت حشره کشی باکتری *Bacillus thuringiensis*	Tantimavanich et al., 1997
Bacillus Circulans WL-12	*E. coli* (DH5α)	بررسی خواص بیوشیمیایی و ساختمانی زیر ساختار متصل شونده به کیتین (chBD) در آنزیم کیتیناز	Hashimoto, 2000
Bacillus cereus CH	*E. coli* XL1-Blue MRF	بررسی خواص ساختمانی آنزیم کیتیناز و مقایسه توالی های اسید آمینه ای بدست آمده با بقیه کیتیناز های باکتریایی	Mabuchi and Araki, 2001
Bacillus thuringiensis HD- 1B	*E. coli* B121 (DE3)	مطالعات بیوشیمیایی آنزیم و بررسی خاصیت حشره کشی بر علیه لارو نئونانت *Spodoptera litura*	Arora, 2003
Aeromonas sp. No.los-24	*E .coli* B121 (DE3)	معرفی نوع جدیدی از کیتیناز های فامیل ۱۹ از جهت ساختمانی و عملی	Ueda et al., 2003
Streptomyces sp. J- 13-3	*E .coli* B121 (DE3)	بررسی ساختمان نوکلئوتیدی کیتیناز و جلوگیری از توسعه هیف های قارچ *Tricoderma reesei*	Okazaki et al., 2004
Ficus awkeotsang	*E .coli* B121 (DE3)	بررسی فعالیت ضد قارچی کیتیناز روی *Colletotrichum gloeosporioides*	Li et al., 2005
قارچ *Chaetomium cupreum*	*E .coli* B121 (DE3)	بررسی خواص بیوشیمیایی و ساختمانی آنزیم کیتیناز	Wang and Yang, 2009

جدول ۴ - آغازگر های مورد استفاده در تکثیر ژن کیتیناز مربوط به سویه بومی ایزوله شده.

نام آغازگر	توالی آغازگر	Tm
FEc1	5'-ATGCGCAAATTTAATAAACCGCTG-3'	۵۵°C
REc2	5'-TTATTGAACGCCGGCGCTATTGCC-3'	۵۵°C

پلاسمیدهای نوترکیب هستند، زیرا با ورود قطعه DNA هدف به جایگاه کلونینگ، توالی کد کننده آنزیم β - گالاکتوزیداز (Z lac) مختل شده و باکتری دیگر قادر به تجزیه X-gal نخواهد بود (۸). IPTG ایزوپروپیل β - تیوگالاکتوپیرانوزید، ۰/۸M، W/V ۲۰ درصد به غلظت نهایی ۰/۰۳۲ درصد در هر پلیت و به عنوان القا گر بیان ژن lac Z به محیط ها اضافه شد و X-Gal (۵- برومو-۴ کلرو- ۳- ایندولیل گالاکتوپیرانوزید، W/V ۲ درصد) به غلظت نهایی ۰/۰۰۳۲ درصد به ازای هر پلیت و به عنوان سوبسترای رنگزا به محیط های کشت LB جامد (با ترکیب ۱۰ گرم در لیتر تریپتون، ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۱۰ گرم در لیتر نمک طعام و ۱۵ گرم در لیتر آگار) اضافه شد.

۶. تأیید کلونی های نوترکیب صحیح:

در این مرحله از روش های آزمایش اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز، روش هضم آنزیمی و واکنش PCR از پلاسمیدهای نوترکیب استخراجی برای غربالگری کلونی هایی که حاوی قطعه DNA هدف صحیح بودند استفاده شد.

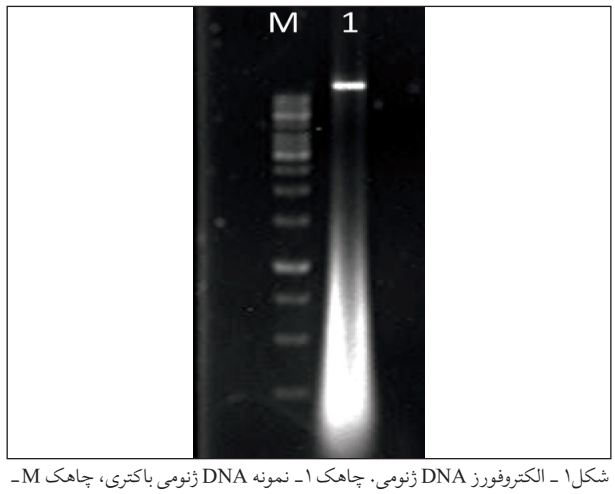
۷. روش هضم آنزیمی:

برای این منظور پلاسمید pTZ57R/T پس از استخراج از کلونی های مثبت، طبق واکنش زیر مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. پلاسمید نوترکیب به حجم ۶ میکرولیتر، یک میکرولیتر بافر Tango ۱۰x، یک میکرولیتر (۱۰ واحد در میکرولیتر) SacI، را با اضافه نمودن آب دیونیزه به حجم بیست میکرولیتر رساندیم و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. همچنین برای هضم همزمان توسط دو آنزیم و خارج شدن ژن کلون شده، ۶ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب، یک میکرولیتر بافر Tango 10x، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (۱۰ واحد در میکرولیتر) SacI، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (۱۰ واحد در میکرولیتر) Hind III، را با اضافه نمودن آب دیونیزه به حجم ۲۰ میلی لیتر رساندیم و سپس به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس محصول هضم آنزیمی به همراه ۲ میکرولیتر از پلاسمید غیر هضم شده بر روی ژل آگارز (w/v) یک درصد الکترو فورز گردید.

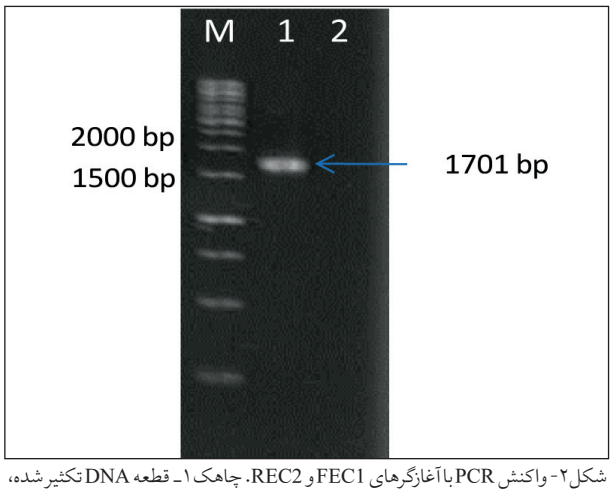
۸. تعیین توالی ژن کیتیناز سویه بومی:

۱- تخلیص پلاسمید نوترکیب با کیت استخراج پلاسمید جهت تعیین توالی: طبق دستورات راهنمای همراه کیت اجرا گردید و نمونه برای تعیین توالی به شرکت (Korea, Seoul) Macro gen ارسال گردید.

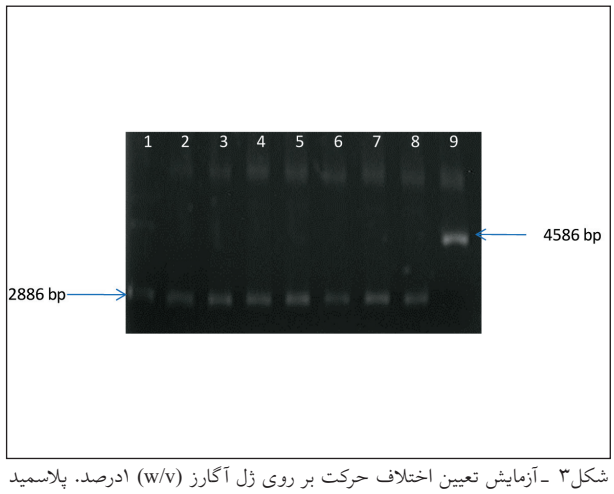
۲- بررسی توالی حاصل از تعیین توالی و تأیید آن: پس از دریافت نتیجه تعیین توالی، کیفیت توالی از روی ارتفاع امواج ثبتی حاصل بررسی شد. سپس توالی حاصل با استفاده از نرم افزار BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، جهت اطمینان از



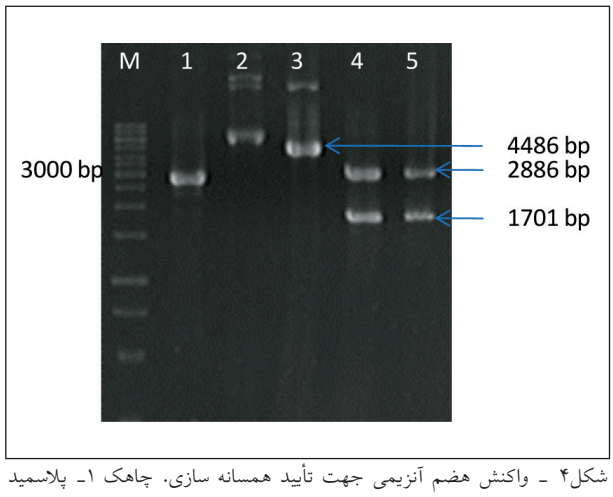
شکل۱ ـ الکتروفورز DNA ژنومی. چاهک ۱ـ نمونه DNA ژنومی باکتری، چاهک M ـ مارکر 1 Kb.



شکل۲- واکنش PCR با آغازگرهای FEC1 و REC2. چاهک ۱ـ قطعه DNA تکثیر شده، چاهک ۲ ـ کنترل منفی، چاهک M ـ مارکر . 1 Kb.



شکل۳ ـ آزمایش تعیین اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز (w/v) ۱درصد. پلاسمید نوترکیب سنگین‌تر از پلاسمید غیر نوترکیب می‌باشد، بنابراین در صورت همسانه شدن، قطعه مورد نظر بالاتر از پلاسمید غیر نوترکیب می‌ایستد. چاهک ۱- pTZ57R/T غیر نوترکیب به عنوان کنترل منفی، چاهک ۹ ـ همسانه نوترکیب، چاهک‌های ۲-۳-۴-۵-۶-۷-۸ ـ همسانه‌های غیر نوترکیب.



شکل۴ ـ واکنش هضم آنزیمی جهت تأیید همسانه سازی. چاهک ۱ـ پلاسمید pTZ57R/T غیر نوترکیب، چاهک ۲ ـ همسانه نوترکیب هضم نشده به عنوان کنترل منفی، چاهک ۳ ـ همسانه نوترکیب هضم شده با آنزیم Sac و مشاهده قطعه ۴۴۸۶ جفت بازی (مجموع طول پلاسمید pTZ57R/T و ژن کیتیناز)، چاهک ۴ و ۵ ـ همسانه نوترکیب هضم شده با آنزیم‌های (SacI و Hind III) و مشاهده قطعه‌هایی به طول ۱۷۰۱ جفت بازی (طول ژن کیتیناز همسانه شده) و ۲۸۸۶ جفت بازی (طول پلاسمید pTZ57R/T)، چاهک M ـ مارکر 1 Kb.

کسب قطعه توالی کامل کد کننده آنزیم کیتیناز، مورد بررسی قرار گرفت.

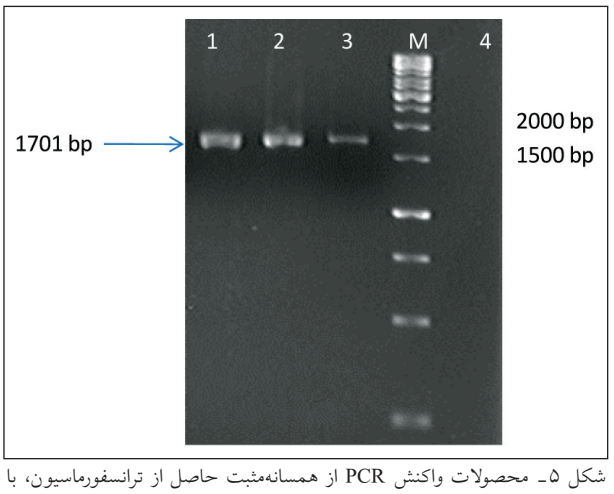
نتایج

۱. استخراج DNA ژنومی از سویه ایزوله شده و تکثیر ژن کیتیناز:

پس از تهیه کشت تازه از سویه ایزوله شده، DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA استخراج شد (شکل ۱). پس از تعیین کیفیت و کمیت DNA برای تکثیر به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از پرایمرهای FEc 1 و REc2 مورد استفاده قرار گرفت و باند اختصاصی معادل ۱۷۰۱bp در روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۲). واکنش الحاق بین ژن کیتیناز تخلیص شده از ژل و پلاسمید pTZ57R/T انجام گرفت.

۲. همسانه سازی پلاسمید نوترکیب در باکتری (*E. coli* DH5α):

پلاسمید نوترکیب به سلول‌های مستعد تهیه شده از باکتری (*E. coli* DH5α) با استفاده از روش شوک حرارتی منتقل گردید. کلونی‌های نوترکیب که به رنگ سفید بودند، انتخاب شدند و پس از تکثیر ناقل pTZ57R/T در باکتری (*E. coli* DH5α) در محیط LB حاوی آمپی سیلین، استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید انجام شد و از روش‌های آزمایش اختلاف حرکت بر روی ژل آگارز (شکل ۳)، آزمایش هضم آنزیمی (شکل ۴) و PCR از پلاسمیدهای نوترکیب با آغازگرهای وکتور



شکل ۵ـ محصولات واکنش PCR از همسانه‌مثبت حاصل از ترانسفورماسیون، با آغازگرهای وکتور pTZ57R/T. چاهک ۱ـ قطعه DNA تکثیر شده توسط PCR با دمای اتصال 50درجه سانتیگراد، چاهک ۲ـ قطعه DNA تکثیر شده توسط PCR با دمای اتصال 53درجه سانتیگراد، چاهک ۳ـ قطعه DNA تکثیر شده توسط PCR از ژنوم باکتری B4A *Serratia marcescens* با پرایمرهای ژن به عنوان کنترل مثبت، چاهک ۴ـ کنترل منفی، چاهک Mـ مارکر.

pTZ57R/T(شکل۵)، به منظور تأیید مراحل همسانه سازی استفاده شد.

۳. تعیین توالی و ثبت ژن کیتیناز کلون شده از باکتری *Serratia marscecens* در بانک جهانی:

پس از تأیید کلون شدن محصول PCR حاصل از ایزوله *Serratia marscecens* در پلاسمید pTZ57R/T، پلاسمیدهای نوترکیب تخلیص شده، جهت تعیین توالی ارسال گردیدند. برای تعیین توالی از پرایمرهای جهانی برای وکتور pTZ57R/Tاستفاده شد. ژن کیتیناز کلون شده از باکتری بومی ((*Serratia marcescens* B4A در بانک جهانی ثبت گردید (Accession Number:HM473183). همان طور که انتظار می‌رفت تشابه زیادی با آنزیم کیتیناز strain C8-8 *Serratia marcescens* داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم‌ها، ابزار عملی مهمی در پزشکی، صنعت، شیمی، پردازش موادغذایی و کشاورزی می‌باشند. در چند دهه اخیر به عنوان مناسبترین ماده در تغییر و تبدیل ترکیبات در صنایع مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در جهان امروز با افزایش سریع جمعیت و با مصرف فراگیر اکثر منابع طبیعی، تکنولوژی آنزیمی پتانسیل بزرگی برای کمک به بسیاری از صنایع ایجاد کرده است. بسیاری از آنزیم‌ها از میکرو ارگانیسم‌ها استخراج می‌شوند و در صنعت نیز کاملاً متداول و مفید هستند. از جمله این آنزیم‌ها که در مقیاس وسیع تولید می‌شوند، کیتیناز باکتریایی است. *Serratia marcescens* که در طیف وسیعی از دما (۴۰-۵درجه سانتیگراد) و pH (۹-۵) رشد می‌کند و در محیط های طبیعی (خاک و آب) و در سطح گیاهان یافت می‌شود، از جهت دارا بودن ژن کدکننده آنزیم کیتیناز دارای اهمیت است. بنابراین در ادامه مطالعات اولیه در مورد شناسایی و معرفی باکتری B4A *Serratia marcescens* به عنوان میکروارگانیسم بومی تولید کننده آنزیم کیتیناز (۵۴)، جهت دست یابی به توالی کامل ژن کیتیناز و مقایسه آن با توالی کد کننده کیتیناز باکتری های دیگر، حفظ این ژن به صورت هموژن در یک میزبان تکثیری مناسب جهت مطالعات بعدی و به منظور صنعتی نمودن تولید این آنزیم، با طراحی پرایمرهای مناسب، همسانه‌سازی صورت پذیرفت.

آنزیم Taq پلیمراز به خاطر داشتن فعالیت داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفرازی خود مبادرت به اضافه کردن یک نوکلئوتید به انتهای ۳ بدون استفاده از الگو می‌کند. این نوکلئوتید اضافی معمولاً یک نوکلئوتید آدنین (A)است. با اتکا به این خصوصیت Taq پلیمراز، پلاسمید تجاری pTZ57R طراحی شده است. این پلاسمید پس از بدست آمدن محصول PCR جهت کلونینگ به روش T/A مورد استفاده قرار گرفت. تعیین توالی ژن کیتیناز بصورت دو طرفه، دو مرتبه بطور کامل انجام گرفت. دو توالی بدست آمده بطور مجازی در نرم افزار GenRuner ترجمه و مقایسه گردیدند. نتیجه حاصل نشان داد که هیچ اختلاف بین مرتبه اول و دوم وجود ندارد. در ترجمه مجازی توالی ژن کیتیناز تعیین توالی شده پروتیئن سالم آن بدست آمد. ژن کیتیناز جدا شده از سویه بومی B4A *Serratia marcescens* دارای ۹۶درصد همولوژی با ژن کیتیناز *Serratia marcescens* strain C8-8 می‌باشد. علی رغم اینکه توالی نوکلئوتیدی این دو ژن ۹۶درصد identity داشته است ولی تفاوتی در توالی پروتیئنی مشاهده نگردید و این حاکی از آن است که موتاسیون انجام شده، موتاسیون خاموش بوده‌اند. پیشنهاد می‌شود دو کپی از ژن مذکور در کروموزوم این باکتری همسانه گردد و تأثیر آن در میزان بیان ژن بررسی شود. انتقال ژن کیتیناز های میکروبی به گیاهان برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی و آفات و انجام مطالعات ساختاری، بیوانفورماتیکی گسترده‌تر بر روی آنزیم جهت بررسی دقیق‌تر خصوصیات صنعتی این آنزیم مورد پیشنهاد

می‌باشند.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و موسسه تحقیقات شیلات ایران که طی طرح شماره ۳۸۸ از انجام این پروژه حمایت نمودند؛ صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع

1. Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R., Bhatnagar, R. K. (2003) A constitutively expressed 36- kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Comminucations*, **307**: 620-625.
2. Bakkers, J. W., Spaink, H. P. (1999) Function of chitin oligosaccharides in plant and animal development. *EXS*, **87**: 71-83.
3. Brurberg, M. B., Eijsink, V. G., Haandrikman, A. J., Venema, G., Nes, I. F. (1995) Chitinase B from *Serratia marcescens* BJL200 is exported to the periplasm without processing. *Microbiology*, **141**: 123-131.
4. Chen, X. D. G. P., Xie, Z. X., Shen, P. (2001) A convenient and rapid method for genetic transformation of *E. coli* with plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **80 (3-4)**: 297-300.
5. Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S., Chet, I. (1995) Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* Antagonistic to Fungal Plant Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 1720-1726.
6. Chernin, L. S., De la Fuente, L., Sobolev, V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B., Chet, I. (1997) Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 834-839.
7. Chye, M. L., Zhao, K. J., He, Z. M., Ramalingam, S., Fung, K. L. (2005) An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. *Planta*, **220**: 717-730.
8. Clark, J. M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, **16**: 9677-9686.
9. Dahiya, N., Tewari, R., Tiwari, R. P., Hoondal, G. S. (2005) Chitinase production in solid-state fermentation by *Enterobacter* sp. NRG4 using statistical experimental design. *Current Microbiology*, **51**: 222-228.
10. Duo-Chuan, L. (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, **161**: 345-360.
11. Flach, J., Pilet, P. E., Jolles, P. (1992) What's new in chitinase research? *Experientia*, **48**: 701-716.
12. Gal, S. W., Choi, J. Y., Kim, C. Y., Cheong, Y. H., Choi, Y. J., Lee, S. Y., Bahk, J. D., Cho, M. J. (1998) Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, **160**: 151-158.
13. Gal, S. W., Choi, J. Y., Kim, C. Y., Cheong, Y. H., Choi, Y. J., Bahk, J. D., Lee, S. Y., Cho, M. J (1997) Isolation and characterization of the 54-kDa and 22-kDa chitinase genes of *Serratia marcescens* KCTC2172. *FEMS Microbiology Letters*, **151**: 197-204.
14. Gokul, B., Lee, J. H., Rhee, S. K., Panda, T (2000) Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Bioprocess Engineering*, **23**: 691-694.
15. Hashimoto, M., Ikegami, T., Seino, S. H., Ohuchi, N., fukada, H., Sugiyama, J., Shirakawa, M., Watanabe, T. (2000) Expression and Characterization of the Chitin- Binding domain of chitinase a1 from Bacillus circulans WL- 12. *Journal of Bacteriology*, **182(11)**: 3045-3054.
16. Henrissat, B., Bairoch, A. (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemistry Journal*, **293**: 781-788.
17. Honda, Y., Taniguchi, H., Kitaoka, M (2008) A reducing-end-acting chitinase from *Vibrio*

proteolyticus belonging to glycoside hydrolase family 19. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **78**: 627-634.

18. Huang, C. J., Wang, T. K., Chung, S. C., Chen,C. Y. (2005) Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **38**: 82-88.
19. Kim, K. J., Yang, Y. J., Kim, J. G. (2003) Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* M-20. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **36**: 185-189.
20. Kobayashi, S., Kiyosada, T., Shoda, S. I. (1997) A novel method for synthesis of chitobiose via enzymatic glycosylation using a sugar oxazoline as glycosyl donor. *Tetrahedron Letters*, **38**: 2111-2112.
21. Kramer K. J., Muthukrishnan, S. (1997) Insect Chitnases: Molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38**: 740-748.
22. Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., Gelfand, D. H. (1989) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 6427-6437.
23. Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I., Mundy, J. (1991) Biochemical and nolecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *The Journal of Biological Chemistry*, **266**: 1564-1573.
24. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Fritig, B. (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, **84**: 6750-6754.
25. Li, Y. C., Yang, Y. C., Hsu, J. S., Wu, D. J., Wu, H. H., Tzen, J. T. (2005) Cloning and immunolocalization of an antifungal chitinase in jelly fig (Ficus awkeotsang) achenes. *Phytochemistry*, **66**: 879-886.
26. Lin, F. P., Chuang, H. H., Liu, Y. H., Hsieh, C. Y., Lin, P. W., Lin, H. Y. (2009) Effects of C terminal amino acids truncation on enzyme properties of Aeromonas caviae D1 chitinase. *Archives of Microbiology*, **191**: 265-273.
27. Mabuchi, N., Araki, Y. (2001) Cloning and sequencing of two genes encoding chitinases A and B from *Bacillus cereus* CH. *Canadian Journal of Microbiology*, **47**: 895-902.
28. Mostafa, S. A., Mahmoud, M. S., Mohamed, Z. K., Enan, M. R. (2009) Cloning and molecular characterization of chitinase from *Bacillus licheniformis* MS-3. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **55**: 241-246.
29. Neiendam Nielsen, M., Sorensen, J. (1999) Chitinolytic activity of *Pseudomonas fluorescens* isolates from barley and sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, **30**: 217-227.
30. Okay, S., Tefon, B. E., Ozkan, M., Ozcengiz, G. (2008) Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*, **104**: 161-170.
31. Okazaki, K., Yamashita, Y., Noda, M., Sueyoshi, N., Kameshita, I., Hayakawa, S. (2004) Molecular cloning and expression of the gene encoding family 19 chitinase from *Streptomyces* sp. J-13-3. Bioscience, *Biotechnology and Biochemistry*, **68**: 341-351.
32. Pantoom, S., Songsiriritthigul, C., Suginta, W. (2008) The effects of the surface-exposed residues on the binding and hydrolytic activities of *Vibrio carchariae* chitinase A. *BMC Biochemistry*, **9**: 2.
33. Patil, R. S., Ghormade, V. V., Deshpande, M. V. (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**: 473-483.
34. Robertus, J. D., Monzingo, A. f. (1999) The structure and action of chitinases. *EXS*, **87**: 125-135.
35. Sheng, L., Zhi-An, Z., Ming, L., Zhen-Rong, G., Chen, B. and Wei-Da, H. (2004) Purification and characterization of a novel chitinase from *Bacillus brevis*. *Acta Biochimic et Biophysica Sinica*, **34(6)**: 690-696.

36. Shinshi, H., Mohnen, D., Meins, F. (1987) Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, **84**: 89-93.
37. Shiro, M., Ueda, M., Kawaguchi, T., Arai, M. (1996) Cloning of a cluster of chitinase genes from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1305**: 44-48.
38. Sitrit, Y., Vorgias, C. E., Chet, I., Oppenheim, A. B. (1995) Cloning and primary structure of the chiA gene from *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, **177**: 4187-4189.
39. Suzann, E. T., Smith, M., Wilkinson, M. C., Peek, K. (2001) Identification and Characterization of a Chitinase Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Strain 385. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4001-4008.
40. Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B., Watanabe, T. (1999) The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochemistry Journal*, **343(3)**: 587-596.
41. Suzuki, S., Nakanishi, E., Furihata, K., Miyamoto, K., Tsujibo, H., Watanabe, T., Ohnishi, Y., Horinouchi, S., Nagasawa, H., Sakuda, S. (2008) Chitinase inhibitor allosamidin promotes chitinase production of *Streptomyces generally*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **43**: 13-19.
42. Svitil, A. L., Chadhain, S., Moore, J. A., Kirchman, D. L. (1997) Chitin Degradation Proteins Produced by the Marine Bacterium *Vibrio harveyi* Growing on Different Forms of Chitin. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 408-413.
43. Tantimavanich, S., Pantuwatana, S., Bhumiratana, A., Panbangred, W. (1997) Cloning of a chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai for enhanced insecticidal activity. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **43**: 341-347.
44. Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S, Tantimavanich, S., Panbangred, W. (2001) Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. Pakistani. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**: 395-401.
45. Tsujibo, H., Orikoshi, H., Tanno, H., Fujimoto, K., Miyamoto, K., Imada, C., Okami, Y., Inamori, Y. (1993) Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Altermonas* sp. strain O-7. *Journal of Bacteriology*, **175**: 176-181.
46. Ueda, M., Miyabe, H., Teramachi, M., Miyata, O., Naito, T. (2003) Novel intermolecular carbon radical addition to a nitrone: asymmetric synthesis of alpha-amino acids. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, **7(3)**: 426-427.
47. Wang, S. L., Chao, C. H., Liang, T. W., Chen, C. C. (2009) Purification and characterization of protease and chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and conversion of marine wastes by these enzymes. *Journal of Marine Biotechnology*, **11**: 334-344.
48. Wang, S. L., Hsiao, W. J., Chang, W. T. (2002) Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**: 2249-2255.
49. Wang, Y. J., Yang, Q. (2009) Cloning and expression of a novel chitinase chi58 from Chaetomium cupreum in Pichia pastoris. *Biochemical Genetics*, **47**: 547-558.
50. Wen, C. M., Tseng, C. S., Cheng, C. Y., Li, Y. K. (2002) Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **35**: 213-219.
51. Xiao, Y. H, Li, X. B., Yang, X. Y., Luo, M., Hou, L., Guo, S. H., Luo, X. Y., Pei, Y. (2007) Cloning and characterization of a balsam pear class I chitinase gene (Mcchit1) and its ectopic expression enhances fungal resistance in transgenic plants. Bioscience, *Biotechnology and Biochemistry*, **71**: 1211-1219.
52. Yang, C. Y., Ho, Y. C., Pang, J. C., Huang, S. S.,

Tschen, J. S. (2009) Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel *Bacillus subtilis* isolate from Taiwan potato field. *Bioresource Technology*, **100**: 1454-1458.

53. Yano, S., Rattanakit, N., Honda, A., Noda, Y., Wakayama, M., Plikomol, A., Tachiki, T. (2008) Purification and characterization of chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: an enzyme participates in protoplast formation from *Schizophyllum commune* mycelia. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **72**: 54-61.
54. Zarei, M., Aminzadeh, S., Zolgharnein, H., Safahieh, A., Ghoroghi, A., Motallebi, A., Daliri, M., Lotfi, A. S. (2010) *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. *Iranian Journal of Biotechnology*, **8**: 252-262.