

## غربالگری و کلونینگ ژن کد کننده آنزیم دکستراناز از *استرپتومایسس* های خاک جهت استفاده در موارد دندان پزشکی

اشکان گودرزی<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲\*</sup>، محدثه لاری پور<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. استاد تمام، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران

### چکیده

**مقدمه:** دکستراناز یکی از مهم ترین آنزیم های درمانی و صنعتی است. به دلیل اهمیت و کاربرد گسترده این آنزیم، هدف از این مطالعه تعیین مولکولی، کلونینگ و کینتیک آنزیم دکستراناز از *استرپتومایسس* های خاک جهت استفاده در دندان پزشکی بود.

**روش کار:** پس از شناسایی و انجام تست های بیوشیمیایی و مولکولی، *استرپتومایسس* های خاک جداسازی شدند. از طریق واکنش PCR سوبه های *استرپتومایسس* دارای ژن آنزیم دکستراناز مشخص شدند. اسیدپتته و دمای بهینه به منظور تولید دکستراناز نیز تعیین گردید. ژن دکستراناز سوبه های مثبت از طریق وکتور به باکتری میزبان *اشرشیا کلی* الحاق و از طریق تکنیک TA کلونینگ کلون شد. در پایان از طریق تکنیک Real Time PCR، بیان ژن دکستراناز در *اشرشیا کلی* XL\blue سنجیده شد.

**نتایج:** از غربالگری نمونه های خاک که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی تعیین هویت شدند، در مجموع ۱۲ ایزوله *استرپتومایسس* جداسازی شد. از ۱۲ ایزوله تنها ۳ ایزوله *استرپتومایسس کویلی کالر* دارای ژن دکستراناز بودند. اسیدپتته بهینه دکستراناز ۵/۲ و دمای بهینه در محدوده ۶۵-۵۵ درجه سانتی گراد تعیین شد. صحت کلونینگ از طریق کلنی سلکشن، PCR و توالی یابی محصول PCR تایید شد. نتایج Real time PCR نیز بیان ژن دکستراناز را در باکتری *اشرشیا کلی* XL\blue تایید نمود.

**نتیجه گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد بررسی *استرپتومایسس* خاک بدلیل پتانسیل بالا در تولید دکستراناز، این سوبه می تواند زمینه ساز مطالعات آینده باشد و می توان این ایزوله ها را به عنوان کاندیدای مناسبی در طراحی و ساخت سوبه های تولید کننده ی آنزیم معرفی نمود.

**واژگان کلیدی:** *استرپتومایسس* خاک، دکستراناز، کلونینگ

## Screening and cloning of the gene encoding dextranase enzyme from soil *Streptomyces* for use in dental cases

Ashkan Gooderzi<sup>1</sup>, Kiumarss Amini<sup>2\*</sup>, Mohaddeseh Larypoor<sup>3</sup>

1. PhD. student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Full Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

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

### Abstract

**Introduction:** This study aimed to explore the molecular, cloning, and kinetic properties of the dextranase enzyme produced by *Streptomyces* isolated from soil, for potential applications in dentistry. *Dextranase* is an enzyme that breaks down dextran, a polysaccharide, and is important in both therapeutic and industrial fields, including use in blood substitutes, vasodilators, and the sugar industry.

**Methods:** Microbial enzymes, such as those from soil bacteria, are preferred over plant and animal-derived enzymes due to their variety, lower cost, and greater stability. Soil bacteria, in particular, are abundant sources of biologically active compounds with minimal toxicity, making them suitable for human treatment.

**Results:** The study isolated 12 *Streptomyces* strains from soil samples. After biochemical and molecular analysis, three strains, identified as *Streptomyces quilicolor*, were found to contain the dextranase gene. The optimal conditions for dextranase production were determined to be a pH of 5.2 and a temperature range of 55-65°C. The dextranase gene was successfully cloned into *Escherichia coli* using a TA cloning technique, and its expression was confirmed through Real-Time PCR.

**Conclusion:** The results suggest that *Streptomyces* from soil, with its high potential for dextranase production, could serve as a valuable resource for future industrial and therapeutic applications. The isolated strains are promising candidates for the development of efficient dextranase-producing strains, particularly for use in dental treatments and other clinical fields.

**Key words:** Soil *Streptomyces*, Dextranase, Cloning

## مقدمه

و مجموعه‌ای از پلی ساکاریدهای با جرم مولکولی کم می‌باشند (۲). دکستراناز به طور گسترده در تولید دکستران‌های بالینی خاص استفاده شده است (۳، ۴). مولکول‌های دکستران تولید شده توسط دکستراناز با جرم مولکولی متوسط با وزن نسبتاً کم ۲۰ تا ۷۰ کیلو دالتون می‌توانند به عنوان گشاد کننده عروق خونی استفاده شوند و مولکول‌های با جرم مولکولی ۶ تا ۸ کیلو دالتون می‌توانند کمپلکس‌هایی با آهن برای درمان کم‌خونی شدید تشکیل دهند (۵). در کاربردهای بالینی، دکستران بالینی خاص تولید شده توسط دکستراناز می‌تواند به عنوان یک جایگزین خون در مواقع اضطراری استفاده شود. در صنعت قند، از دکستراناز برای رفع شفافیت و بازده ضعیفی که دکستران می‌تواند در آب نیشکر ایجاد کند استفاده شده است (۶-۸). شایان ذکر است که این آنزیم را می‌توان با دکستران تجاری برای سنتز مستقیم ایزومالتوز و ایزومالتوالیگوساکاریدهایی که اثرات پری‌بیوتیکی از خود نشان می‌دهند، استفاده نمود (۶). گزارش‌های قبلی پیشنهاد کرده است که دکستراناز ممکن است قادر به درمان پلاک‌های دندانی باشد. از آنجایی که دکستراناز می‌تواند به طور موثر دکستران را در پلاک‌های دندانی تجزیه کند، استفاده از این آنزیم به روشی موثر برای درمان پوسیدگی دندان تبدیل شده است (۷، ۹-۱۱). به همین دلیل، استفاده از دکستراناز برای درمان پوسیدگی دندان، به ویژه با توجه به تخریب دکستران در پلاک‌های دندانی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۴-۱۲). سلول‌های باکتریایی بیوفیلیم‌هایی را به‌عنوان یک سد محافظ در برابر شرایط خارجی تشکیل می‌دهند و به عنوان مکانیسمی برای بهبود بقا و پراکندگی عمل می‌کنند (۱۵). استریپتوکوکوس موتانس عامل اصلی پوسیدگی دندان در دندان‌های انسان و تعدیل کننده کلیدی توسعه بیوفیلیم‌های پوسیدگی‌زا است. تجمع این باکتری پوسیدگی‌زا در بیوفیلیم ممکن است منجر به شروع التهاب پرودنتال شود

باکتری‌ها متابولیت‌های ثانویه را برای دفاع در برابر میکروارگانیسم‌های دیگر تولید می‌کنند و این متابولیت‌های ثانویه به عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی برای استفاده های درمانی در انسان عمل می‌نمایند. آنزیم‌های میکروبی نسبت به آنزیم‌های مشتق شده از منابع گیاهی و جانوری مزیت‌هایی دارند که از آن جمله می‌توان به تنوع فعالیت‌های کاتابولیکی، هزینه ارزانتر، منابع فراوان، مستمر و حتی کمیت و پایداری نسبی بیشتر آن‌ها اشاره نمود. باکتری‌های خاک-زی آنزیم‌های متفاوتی را بر اساس زیستگاه و ساختار اکولوژیکی‌شان تولید می‌کنند. از آنجایی که خاک به طور طبیعی مملو از باکتری‌های مختلف می‌باشد، بنابراین محصولات میکروبی خاک به ویژه آنزیم‌ها، ایمنی بیشتر و سمیت‌زایی سلولی کمتری داشته و در مجموع برای کارهای درمانی در انسان مناسب‌تر می‌باشند. میکروارگانیسم‌های خاک منابع عظیم و پایداری برای استحصال ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند (۱). دکستراناز (E.C.۳.۲.۱.۱۱ $\alpha$ -d-glucan-۱,۶-glucanohydrolase) یک آنزیم القایی است و می‌تواند به طور خاص، اندوهیدرولیز پیوندهای  $\alpha$ -D-(۱,۶)-گلیکوزید را در مکان‌های تصادفی دکستران کاتالیز کند. محصولات اصلی شامل ایزومالتوز، ایزومالتوتریوز، مقادیر کمی دی‌گلوکز

نویسنده مسئول: استاد تمام، گروه

میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه

آزاد اسلامی واحد ساوه

آدرس الکترونیک:

Dr\_kumarss\_amin@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

(۱۶، ۱۷). بنابراین، برداشتن بیوفیلم درمان اصلی التهاب پریودنتال است. دکستراناز قلیایی ممکن است برای درمان پوسیدگی دندان مناسب باشد زیرا انتظار می رود محصولات قلیایی دندان شویه نسبت به محصولات اسیدی با مینای دندان سازگارتر باشند. علاوه بر این، دکستراناز در دمای حدود ۳۷ درجه سانتی گراد به طور موثر عمل می کند و همچنین ممکن است به تخریب پلاک های دندانی انسان کمک کند (۱۸). در حال حاضر باکتری ها و قارچ ها دو منبع اصلی برای تولید دکستراناز هستند (۱۹). دکسترانازهای باکتری معمولاً پایداری حرارتی مطلوبی دارند اما فعالیت دکستراناز نسبتاً

کمی دارند. با این حال، قارچ ها، رایج ترین منبع دکستراناز، دکسترانازهای اسیدی و مگاگرمی تولید می کنند که در مقادیر اسیدیته از ۵ تا ۶/۵ و دمای بالای ۵۰ درجه سانتی گراد کاتالیز می کنند و در شرایط قلیایی ناپایدار هستند. دکسترانازها به ندرت قادر به کاتالیز در شرایط قلیایی و دمای متوسط هستند (۶). در تحقیق حاضر تلاش شد تا باکتری های *استریپتومایسس* تولید کننده دکستراناز از منابع خاک جداسازی شده و سپس ژن کد کننده ی دکستراناز جهت افزایش تولید این آنزیم، کلون گردد.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری و جداسازی *استریپتومایسس* از خاک

نمونه برداری از خاک بر اساس مطالعات مشابه (۲۰) و همچنین فرمول کوکران، از ۵ ایستگاه در تهران انجام شد و از هر ایستگاه ۱۲ نمونه خاک از سطح تا عمق ۵ سانتی متری جمع آوری شد. جداسازی *استریپتومایسس* با روش هایاکاوا و نونومورا انجام شد (۲۱). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از هر مقدار از رقت های نهایی روی سطح هیومیک اسید-ویتامین آگار (اسید هیومیک محلول در آگار باکتریولوژیک ۲۰ گرم،  $MgSO_4 \cdot 0/5$  گرم،  $Na_2HPO_4$  ۵ گرم،  $CaCO_3$  ۰/۲ گرم، اسید هیومیک ۱۰ گرم، KCL ۲۰ گرم، سیکلوهگزیماید ۵ گرم و آب مقطر ۱ لیتر) کشت داده شد.

پلیت های کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی تا اسپوراسیون کلنی های باکتری به مدت دو هفته انکوبه شدند. کلنی های باکتری بر اساس ویژگی های مورفولوژیکی با میکروسکوپ نوری شناسایی شدند. کلنی های نماینده *استریپتومایسس* برداشته شدند و روی پلیت های آگار Bennet تازه (گلوکز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم، پپتون ۲ گرم، عصاره گوشت گاو ۱ گرم، آگار باکتریولوژیک ۲۰ گرم و آب مقطر ۱ لیتر) کشت داده شد تا کلنی های *استریپتومایسس* خالص به دست آمد (۲۲).

## تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به

## استریپتومایسس

در خصوص تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی از خصوصیات ماکروسکوپی کلنی، خصوصیات میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم)، تست‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی استفاده شد. تست‌های بیوشیمیایی شامل تست حرکت، ایندول، متیل رد، VP، سیترات، تولید پیگمان، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز نشاسته، تست سوکروز و تست تولید SH<sub>2</sub> بودند. در نهایت جهت تایید نهایی، شناسایی مولکولی نیز انجام گردید. برای

این منظور از پرایمرهای عمومی برای تکثیر ۱۶srDNA (پرایمر ۸F و ۱۵۴۱R) به روش PCR استفاده گردید (۲۳). سپس محصول PCR پس از ارزیابی کمی و کیفی با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، به منظور توالی‌یابی برای شرکت Bioneer ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس NCBI، BLAST شد تا سوییچی مذکور شناسایی گردد.

## جداسازی باکتری‌های تولید کننده دکستراناز

جهت مشخص کردن ایزوله‌هایی که توانایی تولید آنزیم دکستراناز را داشتند، از واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی برای ژن کد کننده دکستراناز استفاده گردید. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Primer<sup>3</sup> طراحی شدند و با بلاست در پایگاه داده NCBI صحت عملکرد آن‌ها ارزیابی شد. توالی پرایمر رفت و برگشت به ترتیب ۵'-<sup>۳'</sup> GAATCCATGCAGACTCTCCTTGTGAGC-<sup>۵'</sup> و ۳'-<sup>۵'</sup> AGGCTTTCCTGTCATGGAAGCATAATC-<sup>۳'</sup> بود.

سپس واکنش PCR با یک دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، انلینگ به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

## سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت دکستراناز با تعیین سرعت هیدرولیز دکستران اندازه گیری شد. مخلوط واکنش مورد استفاده در سنجش دکستراناز حاوی ۱ میلی‌لیتر دکستران ۲ درصد در بافر استات ۲۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۵/۲) (۲۰ میکرولیتر (۰/۸ میکروگرم) از محلول آنزیمی رقیق شده مناسب بود. پس از تسهیل تجزیه آنزیمی دکستران در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰

دقیقه، قندهای احیاکننده آزاد شده با استفاده از روش ۳،۵-دی نیتروسالیسیلیک اسید تعیین شدند. یک واحد (I U) از فعالیت آنزیم به عنوان مقدار آنزیمی تعریف شد که بازده دکستران را هیدرولیز کرد و قندهای احیا کننده معادل ۱ میکرومول از مالتوز در دقیقه تحت شرایط فوق مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۴).

## تعیین شرایط بهینه فعالیت دکستراناز

۲۰ تا ۸۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دکستران ۰/۲٪ به عنوان سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت (۲۴). شایان ذکر است مقدار دکستراناز با منحنی استاندارد گلوکز تعیین گردید.

تأثیر اسیدیته در محدوده ۳-۹ و در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ۰/۲٪ دکستران به عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴). اثر دما با انکوبه کردن دکستراناز در اسیدیته بهینه آن (۵/۲) در دماهای مختلف (از

کلون کردن ژن دکستراناز در باکتری اشریشیا کلی  
x1\blue

میزبان اشریشیا کلی x1\blue انتقال یافت. پس از ترانسفورماسیون، باکتری روی پلیت LB آگار کشت داده شده و به مدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و در نهایت صحت کلونینگ از طریق غربالگری سفید/آبی تایید گردید. همچنین با استفاده از پرایمر M۱۳ که در وکتور وجود داشت، یک واکنش PCR برای تایید نهایی کلونینگ انجام شد (۲۵).

به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning (سیناکلون-ایران) استفاده شد. در این روش از یک وکتور خطی بنام PTG۱۹-T که در انتهای ۳' آن باز تیمین قرار دارد استفاده می شود. این وکتور بعلاوه دارای ژن LacZ بمنظور غربالگری سفید/آبی، پرایمر M۱۳ برای PCR و توالی یابی و آنزیم محدود کننده BamH۱ می باشد. مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، اتصال محصول PCR در وکتور کلونینگ PTG۱۹-T انجام شد. سپس وکتور به

## بررسی بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده

میکرولیتتر از Rox dye و ۲ میکرولیتتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه BIO-RAD با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد (۲۶).

با استفاده از واکنش real time-PCR بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده ارزیابی گردید. برای این منظور در حجم ۲۰ میکرولیتتر با استفاده از کیت SMOBIO LOT:IQ۱۱۰۰۲۱۰۸۹۰۱ کره جنوبی انجام شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتتر از Prime Qmaster mix (۲x) with syber green، ۵ میکرولیتتر از DEPC water، ۱ میکرولیتتر از پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتتر از پرایمر ریورس، ۱

یافته ها

## غربالگری نمونه‌های خاک به منظور جداسازی استرپتومایسس

استرپتومایسس رنگ آمیزی گرم انجام و از لحاظ وجود باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت بررسی شدند. بررسی نتایج تست های بیوشیمیایی مورد نظر در خصوص تعیین هویت جدایه ها نیز در جدول ۱ ذکر شده است.

از غربالگری نمونه های خاک ارسالی به آزمایشگاه که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند در مجموع ۱۲ ایزوله استرپتومایسس جداسازی شد. از کلنی های مشکوک به

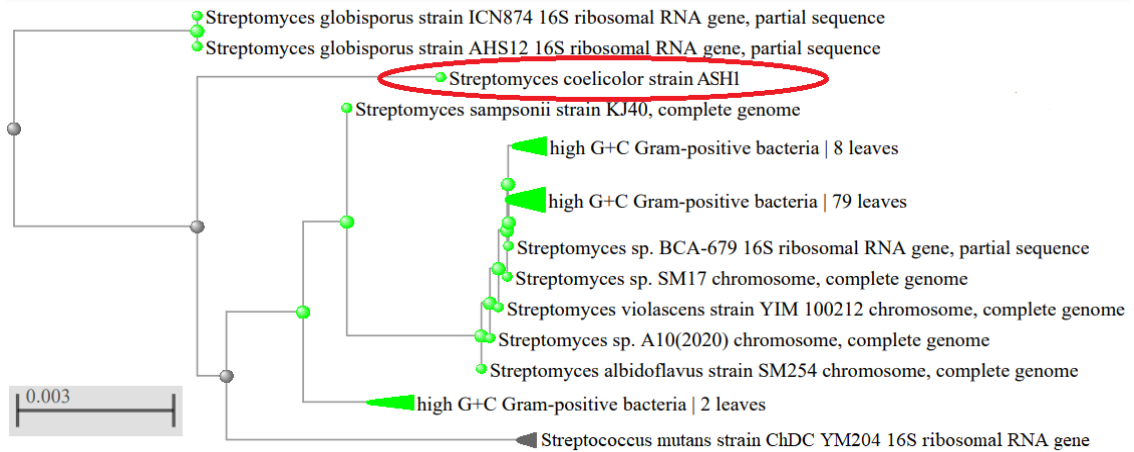
جدول ۱- نتیجه تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی جنس استرپتومایسس

تست‌های بیوشیمیایی	رنگ آمیزی گرم	متیل رد	VP	سیترات	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز کازئین	احیای نیتрат	اکسیداز	کاتالاز
نتایج	+	-	-	+	متفاوت در ایزوله‌ها	+	-	+	+

## شناسایی مولکولی ایزوله‌های استرپتومایسس

بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه مورد بررسی با بوت استرپ ۱۰۰۰ و شباهت بالای ۹۹ درصد، استرپتومایسس کویلی کالر می‌باشد (شکل ۱).

برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار clustalX و Mega5 استفاده شد. در این مرحله از روش neighbor joining برای رسم درخت استفاده گردید. بررسی درخت فیلوژنی گونه‌های مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه، روابط فیلوژنی بین گونه‌های استرپتومایسس با استفاده از ژن ۱۶SrDNA مورد



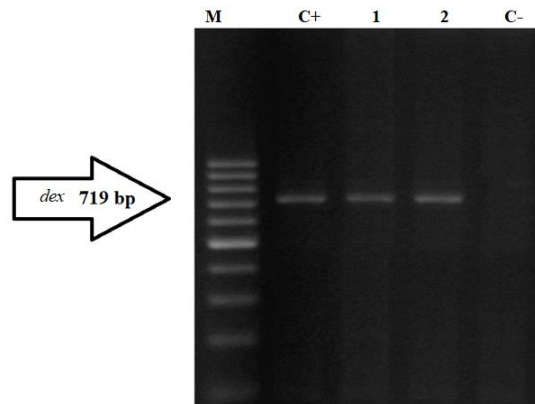
شکل ۱- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن ۱۶SrDNA (گونه مورد مطالعه با دایره قرمز نشان داده شده است)

### نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی ایزوله‌های

### دارای ژن دکستراناز

واکنش PCR برای ژن دکستراناز با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که از ۱۲ سویه

استریومایسس جدا شده، ۳ سویه استریپتومایسس کویلی کالر واجد ژن دکستراناز بودند (شکل ۲).



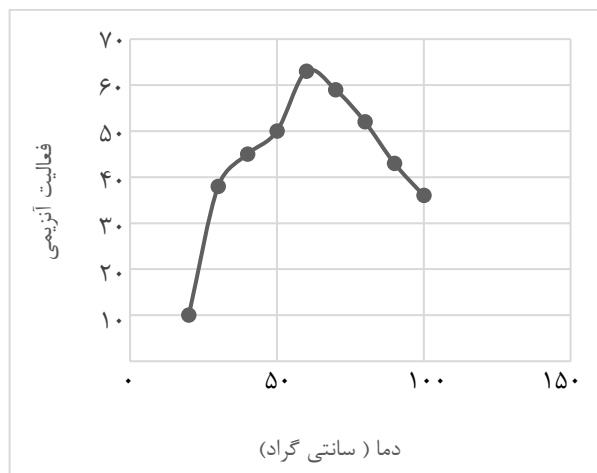
شکل ۲- نتیجه PCR ژن های دکستراناز، C<sup>+</sup>: کنترل +، C<sup>-</sup>: کنترل منفی، نمونه ۱ و نمونه ۲: ژن دکستراناز مثبت، M: مارکر ۱۰۰ bp



## اثرات اسیدیته و دما بر فعالیت آنزیم

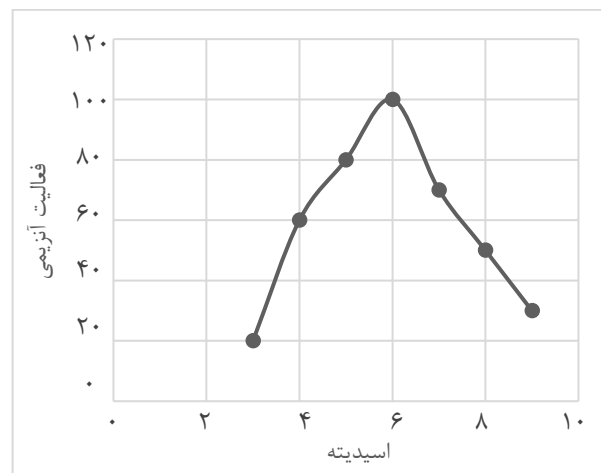
مشاهده شد (شکل ۳-الف). دکستراناز حداکثر فعالیت را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد و بیش از ۸۵ درصد از حداکثر فعالیت خود را در محدوده دمایی ۶۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد (شکل ۳-ب).

اثرات اسیدیته و دمای واکنش بر فعالیت آنزیمی در محدوده اسیدیته از ۳ تا ۹ و محدوده دمایی ۲۰ تا ۸۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دکستران به عنوان سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت. اسیدیته بهینه دکستراناز تقریباً ۵/۲ بود و بیش از ۸۵ درصد از حداکثر فعالیت آن در محدوده اسیدیته برابر با ۴-۶



دما (سانتی‌گراد)

ب



اسیدیته

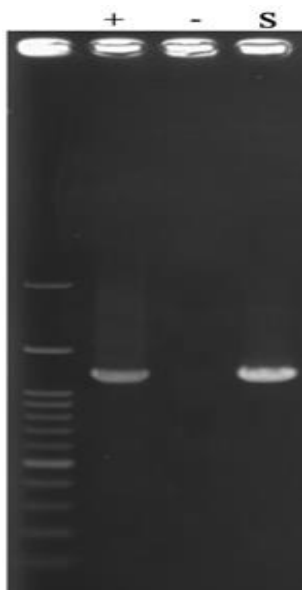
الف

شکل ۳- فعالیت آنزیم دکستراناز در اسیدیته‌های مختلف (الف) و در دماهای مختلف (ب)

## تایید کلونینگ ژن دکستراناز

باکتری‌ها تایید گردید (شکل ۴-ب). محصول PCR توالی یابی شده و در نهایت با بلاست توالی محصول PCR در پایگاه داده NCBI، حضور ژن دکستراناز در باکتری *شریشیا کلی* x1\blue تایید شد (شکل ۴-ج).

پس از کلون کردن ژن دکستراناز، توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه‌های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۴-الف). همچنین با استفاده از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی M13 که در وکتور وجود داشت، حضور وکتور در



ب



الف

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 7 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces coelicolor strain KPS dextranase (dex2) gene, complete cds</a>	<a href="#">Streptomyces c...</a>	1810	1810	100%	0.0	100.00%	1882	<a href="#">DQ497801.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces coelicolor dextranase (aod2) gene, complete cds</a>	<a href="#">Streptomyces c...</a>	1783	1783	98%	0.0	100.00%	1863	<a href="#">AY769086.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. KQ11 dextranase gene, complete cds</a>	<a href="#">Streptomyces c...</a>	1760	1760	98%	0.0	99.59%	1863	<a href="#">KJ571608.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces coelicolor genes for gluco-dextranase and endodextranase, complete cds</a>	<a href="#">Streptomyces c...</a>	1123	1123	100%	0.0	87.36%	8516	<a href="#">D88362.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces coelicolor DNA for endodextranase, complete cds</a>	<a href="#">Streptomyces c...</a>	305	305	85%	7e-78	73.74%	3801	<a href="#">D88361.2</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces coelicolor var. dextranlyticum dexG gene, dexT gene for isomaltotrio-dextranase precursor and...</a>	<a href="#">Streptomyces c...</a>	267	267	85%	3e-66	72.86%	4506	<a href="#">AB025195.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Streptomyces sp. gene for dextranase precursor, complete cds</a>	<a href="#">Streptomyces li...</a>	261	261	79%	2e-64	73.27%	2380	<a href="#">D00834.1</a>

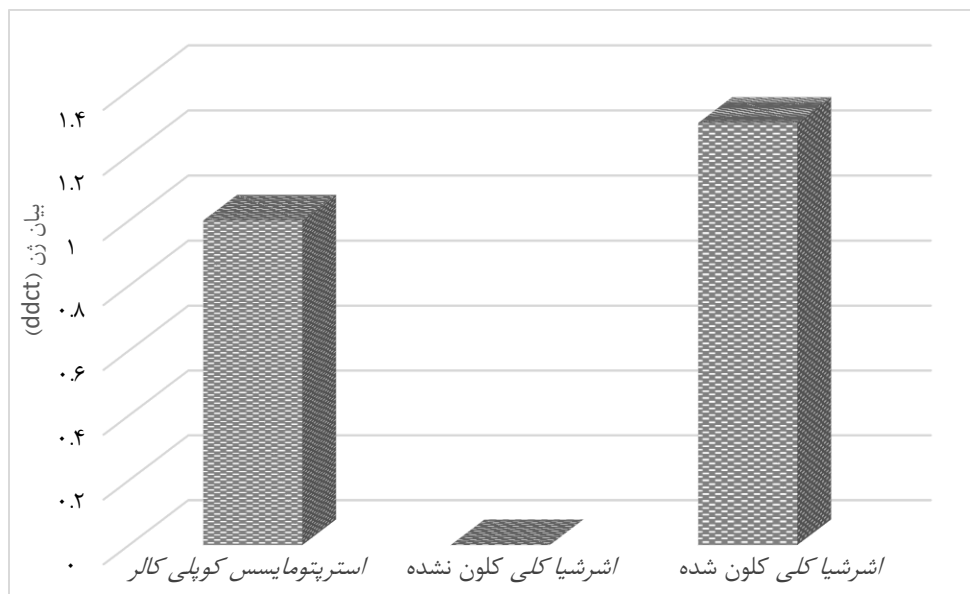
۴- تایید کلونینگ ژن آنزیم دکستراناز در باکتری *اشریشیا کلی* از طریق کلنی سلکشن (الف)، واکنش PCR اختصاصی با پرایمر M۱۳ (ب) و بلاست توالی محصول PCR در پایگاه داده NCBI (ج) (در شکل ب +: کنترل مثبت، -: کنترل منفی، S: باکتری ترانسفورم شده).

بررسی گردید (شکل ۵). همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد در باکتری‌های ترانسفورم شده بیان دکستراناز مشاهده می‌گردد در حالی که در باکتری کنترل منفی که ترانسفورم نشده بود، بیان مشاهده نشد. همچنین از خود

بررسی بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده به منظور اطمینان از بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده، RNA کلنی‌ها استخراج شده و پس از سنتز cDNA، با تست Real time PCR میزان بیان ژن دکستراناز در آن‌ها

مشاهده می شود بیان دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده نسبت به *استرپتومایسس کویلی کالر* بیشتر بود.

باکتری *استرپتومایسس کویلی کالر* به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و داده ها با آن نرمالایز شد. همان طور که



شکل ۵- بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده در مقایسه با باکتری ترانسفورم نشده و سویه ی *استرپتومایسس کویلی کالر*

## بحث

دکستراناز تعیین شد. سپس ژن کد کننده ی دکستراناز به باکتری *اشرشیا کلی* وارد شد و مشخص گردید که ژن مذکور در باکتری ترانسفورم شده بیان می گردد. تحقیقات قبلی در مورد دکسترانازها بیشتر بر روی جهش (۱۹)، غربالگری (۲۷)، ساخت باکتری های دستکاری شده ژنتیکی (۲۸، ۲۹)، بهینه سازی محیط تخمیر (۳۰) و شرایط تخمیر (۳۱) و خواص خالص سازی و آنزیمی متمرکز شده بود (۳۲-۳۴)، در حالیکه در مطالعه حاضر به بررسی بیان ژن دکستراناز پرداخته شد. مطالعات کمی در مورد چگونگی تنظیم جرم مولکولی دکستران در طول تولید وجود دارد. از آنجایی که جرم مولکولی دکستران تا حد زیادی کاربرد آنها را تعیین می کند، یافتن راهی کارآمد برای کنترل این پارامتر ضروری است.

با توجه به کاربردهای گسترده ی آنزیم دکستراناز در پزشکی و صنعت، جداسازی این آنزیم از منابع میکروبی توجه محققان را به خود جلب کرده است. در تحقیق حاضر از منابع خاک جهت غربالگری باکتری های *استرپتومایسس* تولید کننده ی دکستراناز استفاده گردید. در ابتدا ۱۲ ایزوله ی *استرپتومایسس* بر اساس ویژگی های مورفولوژی و بیوشیمیایی جداسازی شدند و ارزیابی مولکولی نیز گونه های *استرپتومایسس کویلی کالر* را تایید نمود. در مرحله ی بعد واکنش PCR اختصاصی نشان داد که از این ۱۲ ایزوله، ۳ ایزوله دارای ژن دکستراناز می باشند. فعالیت آنزیمی در اسیدپتیه ها و دماهای مختلف بررسی شد و اسیدپتیه بهینه ۵/۲ و دمای بهینه در محدوده ۶۵-۵۵ درجه سانتی گراد برای

چندین نقطه ایزوالکتریک بین ۵/۶ و ۶/۱۱ نشان داده شد که تمام اشکال ایزوالکتریک فعال و از نظر کاتالیستی مشابه بودند. دکستراناز حاوی یک بخش کربوهیدرات (۰/۸٪) بود. فعالیت بهینه آنزیم در اسیدیته برابر ۵ مشاهده شد با این حال این دکستراناز بین اسیدیته ۲/۵ و ۷ در دماهای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد نیز پایدار بود (۳۶).

Abdel-Naby و همکاران (۱۹۹۹) تولید دکستراناز در کشت استاتیک پنی سیلیوم فانیکولوسوم ۲۵۸ را مورد بررسی قرار دادند. حداکثر فعالیت آنزیم در اسیدیته برابر ۸ به دست آمد. آن‌ها آنزیم را بر روی حامل‌های مختلف با تکنیک‌های متفاوت تثبیت کردند. آنزیم تهیه شده با اتصال کووالانسی روی کیتوزان با استفاده از گلوکارآلدئید دارای بالاترین فعالیت بود و تا ۶۳٪ از فعالیت ویژه اولیه خود را در مقایسه با دکستراناز آزاد حفظ کرد. آنزیم تثبیت شده اسیدیته بهینه، دمای واکنش بهینه، انرژی فعال سازی، ثابت میکائیلیس بالاتر و پایداری حرارتی بهبود یافته و همچنین مقادیر بالاتر ثابت نرخ غیرفعال سازی را نشان داد.

آنزیم تثبیت شده حدود ۸۰٪ از فعالیت کاتالیزوری اولیه را حتی پس از ۱۲ دوره استفاده، حفظ کرد (۳۷). با توجه به مطالعاتی که به آن‌ها اشاره شد مشخص می‌گردد که تلاش برای یافتن دکسترانازهایی با بیشترین فعالیت آنزیمی یکی از موضوعات مورد توجه محققان بوده است و سویه‌های میکروبی مختلف تا کنون توانایی متفاوتی را در تولید انواع دکستراناز نشان داده‌اند. در تحقیق حاضر نیز باکتری مولد ژن دکستراناز از بستر خاک جدا و ژن مورد نظر تخلیص شد و از طریق وکتور Ptg۱۹، الحاق ژن به باکتری *اشرشیا کلی* (x1\blue صورت گرفت و کلونینگ انجام شد. کلونینگ در واقع برای افزایش تولید آنزیم مذکور انجام شد تا بتوان سویه‌های مهندسی شده‌ی تولید کننده‌ی دکستراناز با توانایی بالا رو توسعه داد.

هدف از مطالعه حاضر تعیین مولکولی، کلونینگ و کینتیک آنزیم دکستراناز از استرپتومایسس‌های خاک جهت استفاده در دندان پزشکی بود. Ren و همکاران (۲۰۱۸) توانایی یک دکستراناز از یک باکتری دریایی به نام *کاتینولوم* را ارزیابی کردند. آن‌ها نشان دادند که یک دکستراناز قلیایی و سازگار با دمای پایین به نام کادیکس توسط این باکتری تولید می‌شود که می‌تواند برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌های استرپتوکوکوس موتانس، یک پاتوژن اولیه در پوسیدگی دندان، استفاده شود. در این تحقیق نشان داده شد که کادکس دارای فعالیت ویژه ۲۳۰۹ U/mg و وزن مولکولی ۷۵ کیلو دالتون بود. کادکس حداکثر فعالیت را در اسیدیته برابر ۸ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد و در دماهای زیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته بین ۵ تا ۱۱ نیز پایدار بود. در این گزارش بیان شده است که چندین معرف محصول شستشوی دندان، از جمله کربوکسی بنزن، اتانول، سدیم فلوراید و زایلیتول هیچ تاثیری بر فعالیت کادکس نداشتند (۳). در مطالعه‌ی Park و همکاران (۲۰۱۲) یک دکستراناز به نام TPDex را از *ترموانیروباکتر سودوتانولیکوس* جداسازی کردند. آن‌ها نشان دادند که TPDex دارای جرم مولکولی ۷۰ کیلو دالتون و فعالیت آنزیمی ۷۳۷ U/mg می‌باشد. اسیدیته بهینه آن ۵/۲ بود و آنزیم در اسیدیته بین ۳/۱ و ۸/۵ در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایدار بود. TPDex بدون توجه به انواع دکستران، از جمله دکستران ۲۰۰۰T، دکستران ۷۴۲CB، و آلترن، فعالیت دکستراناز وسیعی را نشان داد. TPDex بالاترین پایداری حرارتی را در بین دکسترانازهای مشخص شده نشان داد و می‌تواند آنزیمی مناسب برای استفاده در تولید قند بدون کاهش دما باشد (۳۵).

دکستراناز تولید شده توسط *لیپومایسس استارکیوز* توسط KOENIG و DAY جداسازی گردید. آنزیم خالص شده چهار باند را روی ژل SDS/PAGE با جرم تخمینی ۷۴ کیلو دالتون، ۷۱ کیلو دالتون، ۶۸ کیلو دالتون و ۶۵ کیلو دالتون نشان داد.

## نتیجه گیری

خاک به دلیل پتانسیل بالا در تولید دکستراناز، می تواند زمینه ساز مطالعات آینده باشد و با مطالعه بیشتر متابولیت های فعال *استرپتومایسس های خاک* می توان گامی پیشرو در جهت توسعه آنزیم های موثر برای درمان بیماری های عفونی ناشی از میکروارگانیزم های مقاوم و درمان پوسیدگی های حاصل از میکروب های بیماری زا برداشت. در مطالعه حاضر تولید آنزیم دکستراناز از طریق وکتور نو ترکیب و TA کلونینگ صورت گرفت و مطالعات بعدی می تواند در راستای بهینه سازی شرایط مختلف برای تولید این آنزیم باشد.

با توجه به شرایط ویژه حاکم بر خاک بخش اعظمی از آن دست نخورده است و میکروارگانیزم هایی که در آن زندگی می کنند قادر به تولید متابولیت های ثانویه منحصر به فردی هستند که این متابولیت ها می توانند برای فعالیت های خاصی به کار روند. در این مطالعه با ارزیابی پتانسیل ضد میکروبی *استرپتومایسس های جدا شده از بستر خاک تهران*، باکتری *استرپتومایسس* به عنوان منبع غنی از آنزیم دکستراناز معرفی و به عنوان یک سویه بومی به منظور تولید آنزیم دکستراناز شناخته شد. نتایج این تحقیق نشان داد *استرپتومایسس*

## Reference

- Himmel ME, Xu Q, Luo Y, Ding S-y, Lamed R, Bayer EA. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*. 2010;1(2):323-41.
- Bashari M, Eibaid A, Wang J, Tian Y, Xu X, Jin Z. Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(1):155-61.
- Ren W, Cai R, Yan W, Lyu M, Fang Y, Wang S. Purification and characterization of a biofilm-degradable dextranase from a marine bacterium. *Marine drugs*. 2018;16(2):51.
- Shahid F, Aman A, Nawaz MA, Karim A, Ul Qader SA. Chitosan hydrogel microspheres: an effective covalent matrix for crosslinking of soluble dextranase to increase stability and recycling efficiency. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2017;40(3):451-61.
- Chan YJ, Chong MF, Law CL. An integrated anaerobic-aerobic bioreactor (IAAB) for the treatment of palm oil mill effluent (POME): Start-up and steady state performance. *Process Biochemistry*. 2012;47(3):485-95.
- Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2005;69(2):306-25.
- Ren W, Wang S, Lü M, Wang X, Fang Y, Jiao Y, et al. Optimization of four types of antimicrobial agents to increase the inhibitory ability of marine *Arthrobacter oxydans* KQ11 dextranase mouthwash. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2016;34(2):354-66.
- Wang D, Lu M, Wang S, Jiao Y, Li W, Zhu Q, et al. Purification and characterization of a novel marine *Arthrobacter oxydans* KQ11 dextranase. *Carbohydrate Polymers*. 2014;106:71-6.
- Walker GV, Heng NC, Carne A, Tagg JR, Wescombe PA. Salivaricin E and abundant dextranase activity may contribute to the anti-cariogenic potential of the probiotic candidate *Streptococcus*

- salivarius JH. Microbiology. 2016;162(3):476-86.
10. Qiu Y-x, Mao M-y, Jiang D, Hong X, Yang Y-m, Hu T. Co-operative effect of exogenous dextranase and sodium fluoride on multispecies biofilms. Journal of Dental Sciences. 2016;11(1):41-7.
  11. Marotta M, Martino A, De Rosa A, Farina E, Carteni M, De Rosa M. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. Process Biochemistry. 2002;38(1):101-8.
  12. Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. Process Biochemistry. 2005;40(5):1881-94.
  13. Bowler G, Wones S. Application of dextranase in UK sugar beet factories. Zuckerindustrie. 2011;136(12):780-3.
  14. Park T-S, Jeong H-J, Ko J-A, Ryu Y-B, Park S-J, Kim D-M, et al. Biochemical characterization of thermophilic dextranase from a thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*. Journal of microbiology and biotechnology. 2012;22(5):637-41.
  15. Bertrand E, Pierre G, Delattre C, Gardarin C, Bridiau N, Maugard T, et al. Dextranase immobilization on epoxy CIM® disk for the production of isomaltooligosaccharides from dextran. Carbohydrate polymers. 2014;111:707-13.
  16. Purushe S, Prakash D, Nawani NN, Dhakephalkar P, Kapadnis B. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. Bioresource technology. 2012;115:2-7.
  17. Goulas AK, Cooper JM, Grandison AS, Rastall RA. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. Biotechnology and bioengineering. 2004;88(6):778-87.
  18. Majeed A, Grobler SR, Moola MH. The pH of various tooth-whitening products on the South African market: scientific. South African Dental Journal. 2011;66(6):278-81.
  19. Wang X, Lu M, Wang S, Fang Y, Wang D, Ren W, et al. The atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) method on the dextranase activity and structure. International journal of biological macromolecules. 2014;70:284-91.
  20. Dehnad A, Esmaili E, Solouki M. Isolation and molecular identification chitinase-producing *Streptomyces* strains and examination of their in-vitro antagonistic effects. Biological Journal of Microorganism. 2015;4(15):123-34.
  21. Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J Ferment Tech. 1987;65:501-9.
  22. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology E-book: Elsevier Health Sciences; 2020.
  23. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and environmental microbiology. 2008;74(8):2461-70.
  24. Erhardt FA, Stammen S, Jördening H-J. Production, characterization and (co-) immobilization of dextranase from

- Penicillium aculeatum*. *Biotechnology letters*. 2008;30(6):1069-73.
25. Kang HK, Kim SH, Park JY, Jin XJ, Oh DK, Soo Kang S, et al. Cloning and characterization of a dextranase gene from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2005;22(15):1239-48.
26. García B, Rodríguez E. Carbon source regulation of a dextranase gene from the filamentous fungus *Penicillium minioluteum*. *Current Genetics*. 2000;37(6):396-402.
27. Cai R, Lu M, Fang Y, Jiao Y, Zhu Q, Liu Z, et al. Screening, production, and characterization of dextranase from *Catenovulum* sp. *Annals of microbiology*. 2014;64(1):147-55.
28. Crawford B, Kasmidi M, Korompis F, Pollnac RB. Factors influencing progress in establishing community-based marine protected areas in Indonesia. *Coastal Management*. 2006;34(1):39-64.
29. Kim Y-M, Kim D. Characterization of novel thermostable dextranase from *Thermotoga lettingae* TMO. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;85(3):581-7.
30. Li K, Lu H, Hang F, Li S, Liu J. Improved dextranase production by *Chaetomium gracile* through optimization of carbon source and fermentation parameters. *Sugar Tech*. 2017;19(4):432-7.
31. Zohra RR, Aman A, Zohra RR, Ansari A, Ghani M, Qader SAU. Dextranase: hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate polymers*. 2013;92(2):2149-53.
32. Smith KV, Loughran J, Berry A, Dimitrakopoulos C. Developing scientific literacy in a primary school. *International Journal of Science Education*. 2012;34(1):127-52.
33. Sufiate BL, Soares FEdF, Moreira SS, Gouveia AdS, Cardoso EF, Braga FR, et al. In vitro and in silico characterization of a novel dextranase from *Pochonia chlamyosporia*. *3 Biotech*. 2018;8(3):1-9.
34. Matt C, Hess T, Benlian A. Digital transformation strategies. *Business & information systems engineering*. 2015;57(5):339-43.
35. Park TS, Jeong HJ, Ko JA, Ryu YB, Park SJ, Kim D, et al. Biochemical characterization of thermophilic dextranase from a thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;22(5):637-41.
36. KOENIG D, DAY D. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. *European journal of biochemistry*. 1989;183(1):161-7.
37. Abdel-Naby MA, Ismail A-MS, Abdel-Fattah AM, Abdel-Fattah AF. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochemistry*. 1999;34(4):391-8