فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۱- ۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۲۶ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

کلونینگ و بیان ژن کدکننده آنزیم لاکاز از باکتری باسیلوس پومیلوس سویه GAZ23

پروین زمانی: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، zamani_6413@yahoo.com
محمدعلی آموزگار: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir *
خسرو خواجه: استاد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، ایران، khajeh@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: لاکازها (بنزن دیول اکسیژن اکسیدو ردوکتاز EC 1. 10. 3. 2) یکی از اعضای خانواده مالتی کوپر اکسیدازها هستند که اکسیداسیون طیف گسترده ای از ترکیبات فنولی را با استفاده از اکسیژن مولکولی کاتالیز می‌کنند.

مواد و روش‌ها: ژن کدکننده آنزیم لاکاز از سویه GAZ23 به‌وسیله پرایمرهای کلونینگ اختصاصی ژن تکثیرشد. محصول PCR در ناقل بیانی (pET21a) کلون به باکتری اشریشیاکلی سویه BL21(DE3) انتقال یافت و تحلیل توالی انجام شد. بیان آنزیم با استفاده از سوبسترای معمول لاکاز ABTS سنجیده شد.

نتایج: توالی ژن ۱۶S rDNA سویه بومی GAZ23 که از خاک‌های ایران جدا شده است دارای ۱۰۰ درصد شباهت به باکتری باسیلوس پومیلوس بود. ژن لاکاز در سویه GAZ23 دارای ۱۵۳۳ نوکلئوتید است که ۵۱۰ آمینواسید را کد می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری: ژن لاکاز سویه GAZ23 دارای ۶۷ درصد شباهت آمینواسیدی به پروتئین CotA باکتری باسیلوس سوبتیلیس است. به منظور به دست آوردن مقادیر بالای پروتئین محلول، بیان، تحت شرایط میکروآئروبیک و در دمای پایین انجام شد. ۴ دمین غنی از هیستیدین متصل شونده به مس در توالی آمینواسیدی این پروتئین وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین CotA، لاکاز، باسیلوس پومیلوس، بیان ژن

* نویسنده مسؤول مکاتبات، آزمایشگاه اکستریموفیل‌ها، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران

مقدمه

لاکازها (بنزن‌دیول‌اکسیژن‌اکسیدوردوکتاز EC1. 10. 3. 2)، آنزیم‌های چند مسی از خانواده اکسیدازهای آبی‌اند. اکسیداسیون طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنولی را با استفاده از اکسیژن مولکولی به عنوان پذیرنده نهایی الکترون کاتالیز و آب را به عنوان تنها محصول جانبی تولید می‌کنند (۱).

این آنزیم‌ها دارای ۴ دمین غنی از هیستیدین هستند که به مس اتصال دارند. اتم‌های مس کوئوردینه شده در پروتئین‌ها در سه نوع T1، T2و T3 دسته بندی می‌شوند که از لحاظ خصوصیات اسپکتروسکوپی متفاوت‌اند. مس نوع یک (T1) مرکز تک هسته‌ای را تشکیل می‌دهد و در اکسیداسیون سوبسترا نقش دارد در حالی که مس T2 با یک اتم مس به همراه مس T3 با دو اتم مس، مرکز سه هسته‌ای را تشکیل می‌دهند و با انتقال الکترون‌ها به اکسیژن باعث تشکیل آب می‌شوند (۲). این آنزیم‌ها در گیاهان، قارچ‌ها و در بعضی از باکتری‌ها و حشرات یافت می‌شوند (۳). در گیاهان این آنزیم‌ها در بیوسنتز لیگنین شرکت می‌کنند (۴) و در قارچ‌ها در تجزیه لیگنین، تشکیل پیگمان، سم زدایی و بیماری‌زایی گیاهان دخالت دارند (۵). با توجه به این که لاکازها سوبستراهای زیادی دارند و واکنش‌های شیمیایی مختلفی مانند تخریب پلیمرها، تشکیل مونومرها، شکستن ترکیبات حلقوی و اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک را کاتالیز می‌کنند، کاربردهای زیادی در صنایع بیوتکنولوژیکی دارند (۶). به عنوان مثال در صنایع کاغذسازی و صنایع نساجی برای سم زدایی و حذف رنگ از فاضلاب‌ها به کار می‌روند (۶ و ۷). لاکازها همچنین در صنایع غذایی برای پایدارسازی و بهینه‌سازی کیفیت نوشیدنی‌های مختلف و اکسیژن زدایی محصولات فاسد شدنی حاوی روغن‌های گیاهی کاربرد دارند (۸ و ۹).

اولین لاکازهای پروکاریوتی گزارش شده مربوط به باکتری آزواسپریلوم لیپوفروم[1] است. این آنزیم تولید پیگمان و مصرف ترکیبات فنولی گیاه و انتقال الکترون‌ها را بر عهده دارد (۱۰). مهم‌ترین لاکاز باکتریایی که تا کنون به خوبی بررسی شده و خصوصیات فیزیکی و بیوشیمیایی آن تعیین شده پروتئین CotA باکتری باسیلوس سوبتیلیس[2] است. CotA پروتئین kDa65 به پوشش خارجی اسپور متعلق است. این پروتئین در بیوسنتز پیگمان قهوه‌ای اسپور که یک محصول شبه ملانین است، شرکت می‌کند و به نظر می‌رسد که مسئول محافظت در برابر نور UV و پراکسید هیدروژن باشد. این پروتئین شباهت‌هایی را با اکسیدازهای چند مسی نشان می‌دهد و پایداری دمایی بالایی دارد (۱۱). لاکازهای دیگری از سویه‌های اشریشیا کلی[3](۱۲)، باسیلوس هالودورانس[4] (۱۳) و باسیلوس لیکنیفورمیس[5](۱۴)، جدا شده است. اکثر لاکازهایی که تا کنون شناسایی شده و دارای کاربردهای بیوتکنولوژیکی هستند از قارچ‌ها جداشده‌اند (۱۵). با این حال بیان کارا و مؤثر لاکازهای نوترکیب قارچی، که بیشتر برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی ضروری است، نسبت به بیان آنزیم‌های باکتریایی سخت‌تر است. از مشکلات و موانع استفاده از این دسته از آنزیم‌ها می‌توان به اطلاعات توالی‌هایی که دست‌یابی به آن‌ها امکان پذیر نیست، وجود ساختار اگزون و اینترون در ژن‌های یوکاریوتی، تغییرات پس از ترجمه، تشکیل پل‌های دی‌سولفیدی، زمان تخمیر طولانی و بازده کم آن‌ها اشاره کرد. با وجود کاربردهای صنعتی باکتری‌ها، تا کنون توجه کمی به لاکازهای باکتریایی شده است. بررسی‌های انجام شده در تجزیه و تحلیل

ژنوم مشخص کرده که این آنزیم‌ها در باکتری‌ها به طور گسترده‌ای توزیع شده‌اند (۱۶). توسعه لاکازهای باکتریایی برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی دارای مزایایی است زیرا پایداری دمایی بالایی دارند و در مدت زمان کوتاهی در محیط‌های ارزان تولید می‌شوند.

هدف این پژوهش، جداسازی و بیان ژن کد کننده آنزیم لاکاز از سویه GAZ23 است که شباهت زیادی به پروتئین CotA سویه باسیلوس سوبتیلیس-که یک پروتئین مقاوم به دما است- دارد.

مواد و روش‌ها

مواد

ایزوپروپیل β-D-1- تیوگالاکتوپیرانوزید [۶](IPTG)، آنزیم‌های محدود کننده *XhoI* و *Nde*I از شرکت فرمنتاز[۷] (آلمان) و ABTS[۸] از شرکت سیگما-آلدریچ[۹] (آمریکا) و سایر مواد از شرکت مرک[۱۰] (آلمان) خریداری شد.

سویه‌ها و محیط کشت

سویه بومی GAZ23 از خاک‌های کشاورزی منطقه فیروز کوه در ایران جدا شده است. باکتری اشریشیلاکلی سویه *XL1-Blue* به عنوان میزبان کلونینگ و باکتری اشریشیلا کلی سویه *BL21(DE3) E* به عنوان سویه بیانی استفاده شد.

بر اساس آزمون‌های میکروسکوپی و فیزیولوژیک، شناسایی اولیه سویه انجام شد (۱۷). رنگ آمیزی گرم بر اساس روش هوکر[۱۱] انجام شد، و شکل میکروسکوپی سویه توسط میکروسکوپ نوری و عدسی چشمی ۱۰۰ مشاهده شد. برای بررسی فعالیت کاتالازی از کشت ۲۴ ساعته سویه و پراکسید هیدروژن ۳ درصد به عنوان معرف استفاده و تولید حباب به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد. برای مشاهده اسپور باکتری از محیط اسپورزایی آگاردار استفاده شد، به علاوه برای تأمین رشد و کاهش میزان آلودگی، کلرید سدیم به میزان ۳ درصد به حجم محیط اضافه شد (۱۸). ابتدا باکتری در محیط تولید اسپور کشت داده، و پس از ۴ روز، رنگ آمیزی اندوسپورها با رنگ فوشین بازی بر اساس روش شافر و فلتون[۱۲] انجام شد (۱۷).

شناسایی تکمیلی سویه منتخب با تکثیر و تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA انجام شد. برای این منظور DNA ژنومی سویه GAZ23 استخراج شد (۱۹) و به عنوان الگو برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای جهانی F: AGAGTTTGATCMTGGCTCA۲۷ و R: GGTTACCTTGTTACGACTT۱۴۹۲ استفاده شد (۲۰).

تکثیر ژن ۱۶S rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، بافر با غلظت X1 در ترکیب نهایی، MgCl2 با غلظت نهایی ۲/۵ تا ۰/۵ میلی‌مول، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مول، آنزیم Taq DNA پلیمراز به میزان U/۲۵۰ میکرولیتر و پرایمرهای رفت و برگشت از هر کدام به میزان ۰/۵ تا ۰/۴ میلی‌مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. در انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نمونه با شرایط مشابه با سایر نمونه‌ها که در آن به جای DNA الگو از آب مقطر استفاده شده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

واکنش واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل: واسرشت سازی با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال پرایمرها در ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول نهایی حاصل از واکنش تعیین توالی شد (شرکت ماکروژن کره جنوبی)[۱۳].

کلونینگ ژن مورد نظر

با توجه به این‌که مهم‌ترین آنزیم لاکازی که تا کنون شناسایی و ویژگی‌های بیوشیمیایی و خصوصیات ساختاری آن به خوبی تعیین شده است به پروتئین CotA اسپور باکتری باسیلوس سوبتیلیس مربوط است، توالی آمینواسیدی و نوکلئوتیدی CotA باکتری باسیلوس سوبتیلیس با کد دسترسی NP_388511 به عنوان الگوی جستجو در بانک اطلاعات ژنی[۱۴] استفاده شد تا لاکازهای باکتریایی شناسایی نشده از این طریق شناسایی شوند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ژن مورد نظر با استفاده از پرایمر رفت با توالی:

5□ATA**CATATG**AACCTA GAAAAATTTGTTGACG 3□

دارای جایگاه برش آنزیم *Nde*I در طرف □5 و پرایمر برگشت با توالی:

5□GTG**CTCGAG**TTACTGG ATGATATCCATCGGCC 3□

دارای جایگاه برش آنزیم *Xho*I در طرف □5 انجام شد. DNA ژنومی استخراج شده از سویه GAZ23 به عنوان الگو استفاده شد. ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. تکثیر ژن مورد نظر با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بافر با غلظت x1 در ترکیب نهایی، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مول، dNTP با غلظت ۰/۴ میلی‌مول از هر کدام، آنزیم Taq DNA پلیمراز U/۲۵۰ میکرولیتر و پرایمرهای رفت و برگشت از هر کدام ۰/۸ تا ۱ میلی‌مول و DNA الگو به میزان مناسب استفاده شد. در انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از نمونه با شرایط مشابه با سایر نمونه‌ها که در آن به جای DNA الگو از آب مقطر تزریقی استفاده شده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از واسرشت سازی اولیه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه تکرار شونده شامل: واسرشت سازی با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال با دمای بین ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد هر کدام به مدت ۶۰ ثانیه و سنتز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۰ چرخه برای سنتز نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با کیت خالص سازی محصول PCR (Bioneer) خالص شد.

محصول PCR خالص شده و پلاسمید بیانی pET21a(+) توسط آنزیم‌های محدود کننده *Nde*I و *Xho*I به شکل جداگانه هضم آنزیمی شدند. محصولات هضم شده توسط کیت خالص سازی محصول PCR (Bioneer) خالص شد و سپس قطعات ژنی و پلاسمید هضم شده با غلظت‌های مناسب توسط آنزیم لیگاز به هم اتصال یافتند. باکتری اشریشیاکلی سویه *XL1-Blue* به عنوان میزبان کلونینگ استفاده شد. پلاسمید حاصل از اتصال قطعات وکتور بیانی و ژن در سویه XL1-Blue ترانسفورم شد و سپس، بر روی محیط LB جامد دارای آمپی‌سیلین کشت داده شدند. کلونی‌های مثبت دارای پلاسمید نوترکیب انتخاب و صحت حضور پلاسمید مورد نظر در این سویه با روش هضم دوگانه با آنزیم‌های محدود کننده و روش کلونی PCR تایید شد. پلاسمید نوترکیب pET21a از این سویه با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، استخراج و برای اطمینان از صحت توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator تعیین توالی شد.

بیان ژن

پس از اطمینان از صحت توالی مورد نظر، پلاسمید نوترکیب pET21a در باکتری اشریشیاکلی سویه BL21(DE3) ترانسفورم و سپس بر روی محیط LB دارای آمپی‌سیلین کشت داده شد. یکی از کلونی‌های BL21 مثبت دارای پلاسمید نوترکیب pET21a که بر روی محیط LB جامد دارای آمپی‌سیلین رشد کرده بود به محیط LB حاوی آمپی‌سیلین به عنوان پیش کشت تلقیح شد و در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۲۲۰ rpm به مدت ۱۲ ساعت گرماگذاری شد. پس از این زمان، از محیط پیش کشت به محیط TB حاوی آمپی‌سیلین تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با شیک ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا به OD 6/0-5/0 برسد. پس از این زمان IPTG با غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مولار و CuSO4 با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار به عنوان القا کننده به محیط افزوده شد. به طور هم‌زمان به عنوان نمونه شاهد، محیط کشتی با شرایط مشابه با شرایط قبل از همان کلونی مثبت تهیه شد. اما پس از رسیدن به OD القا نشد. و یک کلونی از سلول‌های BL21 فاقد پلاسمید نوترکیب با شرایط یکسان با کلونی مثبت حاوی پلاسمید نوترکیب، نیز به عنوان نمونه شاهد منفی به طور هم‌زمان کشت داده شد. سپس، محیط‌های کشت القا شده و القا نشده (حاوی کلونی‌هایی با پلاسمیدهای نوترکیب و غیر نوترکیب) به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۴۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از آن به مدت ۲۰ ساعت بدون دور در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شد. همچنین، نمونه‌های تهیه شده پس از القا شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۴۰ دور در دقیقه (شرایط هوازی) قرار گرفتند.

از آن‌جایی که پروتئین‌های بیان شده در داخل سلول مجتمع می‌شوند، سلول‌ها پس از ۲۰ ساعت گرماگذاری، با سانتریفیوژ در ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جمع‌آوری شدند. رسوب به دست آمده در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته۷/۶ حاوی مهار کننده پروتئاز PMSF[۱۵] یک میلی‌مولار حل و سپس، بر روی یخ سونیکیت شد. بقایای سلول‌های شکسته شده با سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب داده شدند. محلول رویی در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرما گذاری و سپس، برای حذف پروتئین‌های دناتوره شده در ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. عصاره سلولی به دست آمده برای هر دو نمونه کنترل و آزمون، (به منظور سنجش بیان آنزیم و ارزیابی میزان فعالیت آنزیم بیان شده) سنجش آنزیمی شد.

سنجش بیان آنزیمی

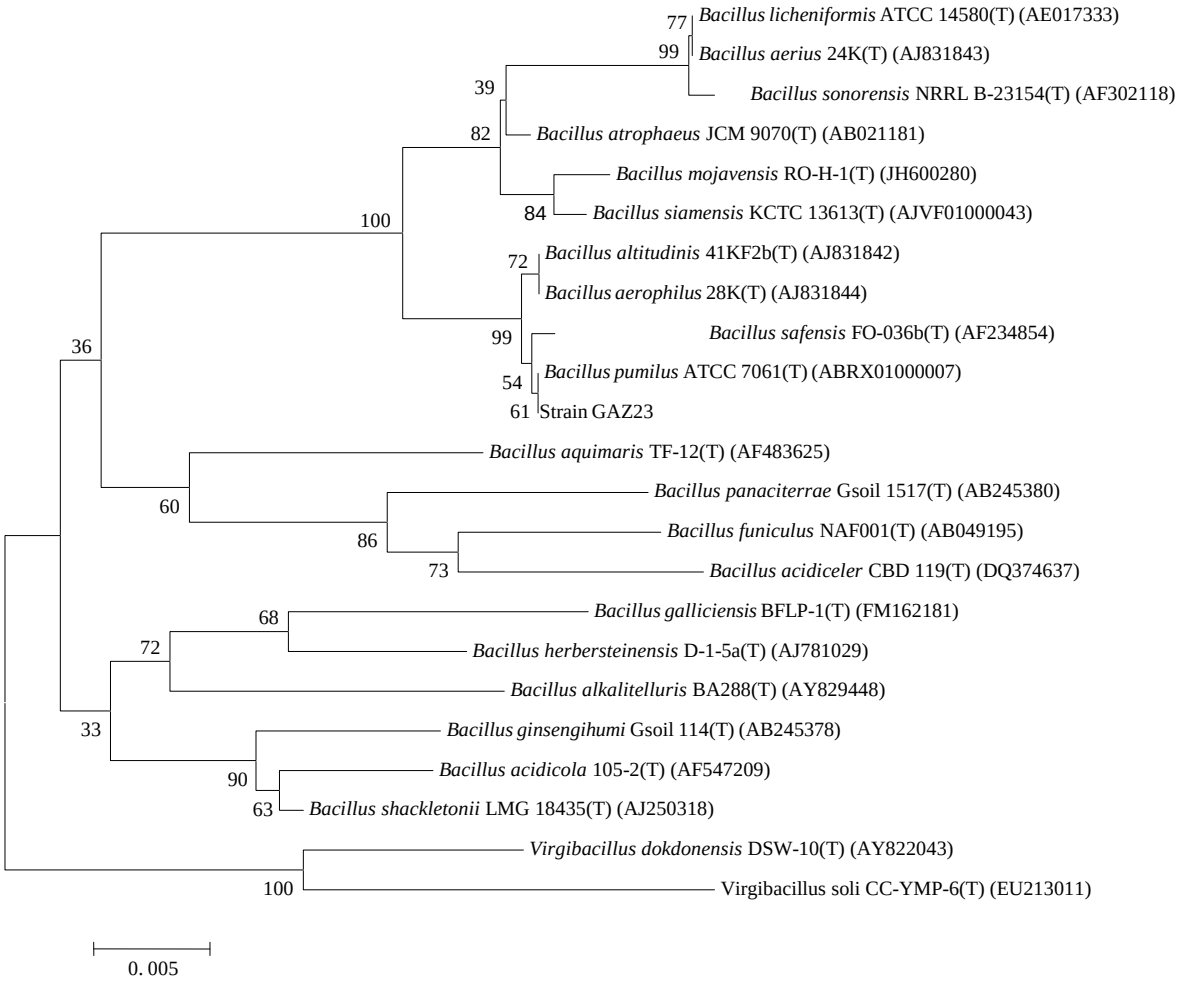
فعالیت آنزیمی در دمای اتاق در حضور سوبسترای معمول این آنزیم ABTS سنجیده شد. اکسیداسیون (ABTS) ۲ میلی‌مولار در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۴ توسط افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه اندازه گیری شد.

نتایج

جستجوی پروتئینی برای لاکازهای باکتریایی شناسایی نشده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی پروتئین Cot A باکتری باسیلوس سوبتیلیس به عنوان الگو انجام شد. همولوگ‌های متعددی از این پروتئین در توالی کامل ژنوم باکتری باسیلوس پومیلوس شناسایی شد. در نتیجه ژن cot A باکتری باسیلوس پومیلوس برای کلونینگ و بیان ژن cotA در باکتری اشریشیاکلی انتخاب شد.

شناسایی سویه

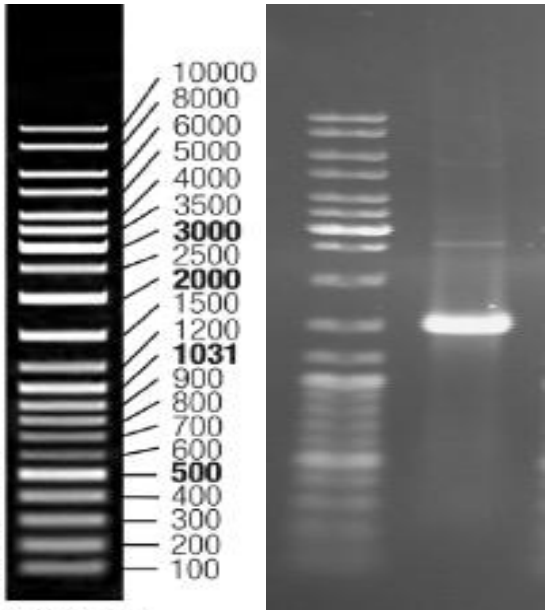
نتایج بررسی صفات اولیه در سویه GAZ23 نشان داد که این سویه، سویه‌ای گرم مثبت، دارای اندوسپور و کاتالاز مثبت است. نتایج حاصل از تعیین توالی ژن ۱۶S rDNA با استفاده از نرم افزار Chromas Pro ویرایش شد و با استفاده از ابزار BLAST در دو بانک اطلاعاتی NCBI و پایگاه اطلاعاتی EzTaxon-e server[16] بررسی شد. سویه GAZ23 از نظر میزان شباهت در توالی ژن ۱۶S rDNA بررسی شد و درخت فیلوژنتیک این سویه با الگوریتم Neighbor joining (۲۱) و ضریب Boot Strap 1000 (۲۲) و با نرم افزار مگا ۵ (ویرایش پنجم)[17] (۲۳) رسم شد. بررسی توالی ژن ۱۶S rDNA سویه GAZ23 نشان داد که این سویه دارای ۱۰۰ درصد شباهت به باکتری باسیلوس پومیلوس سویه ATCC 7061^{T} است (شکل ۱).



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک سویهGAZ23 با روش Neighbor-joining و با استفاده از معیار Boot strap 1000

تکثیر اختصاصی ژن لاکاز

ژن لاکاز در سویه GAZ23 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی ژن تکثیر شد. شکل ۲ تصویر ژل محصول PCR ژن مورد نظر را نشان می‌دهد.



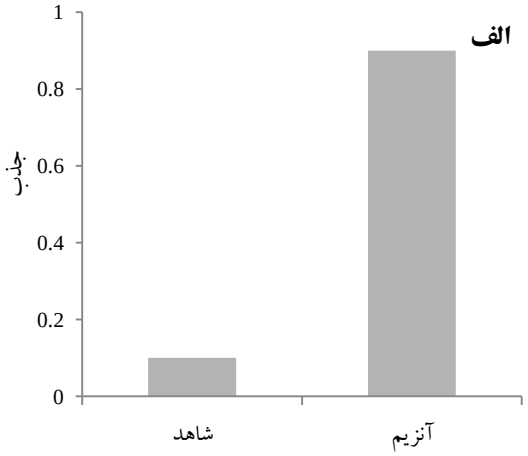
شکل ۲- تصویر ژل محصول PCR. 1 باند ژن مورد نظر سویه GAZ23 با پرایمرهای دارای جایگاه برش. M) شاخص وزنی (فرمنتاز SM0331)

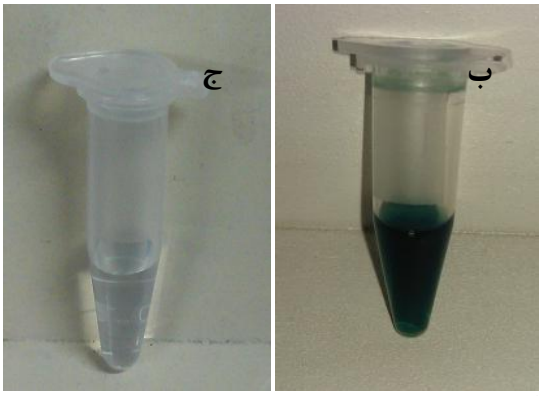
پس از تایید کلون شدن ژن مورد نظر در وکتور pET21a(+)، پلاسمیدهای نوترکیب تخلیص شد و با استفاده از پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator تعیین توالی شد. نتیجه تعیین توالی ژن بررسی شد. توالی نوکلئوتیدی در پروتال منابع بیوانفورماتیک[۱۸] به توالی آمینواسیدی تبدیل شد و مشخص شد توالی بدون جهش بود.

بیان آنزیم لاکاز

فعالیت آنزیمی لاکاز در دمای اتاق در حضور سوبسترای معمول این آنزیم ABTS انجام شد. سنجش فعالیت آنزیمی شامل: اکسیداسیون (ABTS) ۲ میلی‌مولار در بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۴ با افزایش جذب در ۴۲۰ نانومتر انجام شد (ε=36000$M^{-1}cm^{-1}$).

از بین کلونی‌های بررسی شده تنها عصاره سلولی کلونی دارای پلاسمید نوترکیب pET21a که تحت شرایط القا با IPTG و $CuSO_4$ قرار گرفته بود فعالیت آنزیمی نشان داد. همچنین، در اثر اکسیداسیون ABTS با آنزیم لاکاز در مخلوط واکنش رنگ سبز ایجاد شد، که نشانگر حضور آنزیم لاکاز در مخلوط واکنش بود. اما برای عصاره‌های سلولی کلونی دارای پلاسمید نوترکیب بدون القا با IPTG و کلونی فاقد پلاسمید نوترکیب افزایش جذب و تغییر رنگ مشاهده نشد (شکل ۳).





شکل ۳- الف) افزایش جذب در اثر اکسیداسیون ABTS در طول موج ۴۲۰ نانومتر، پس از زمان ۵ دقیقه میزان جذب به ۰/۹ رسید. نمونه شاهد ۰/۱ افزایش جذب به علت شکستن خودبه خودی ABTS نشان می‌دهد.

ب) ایجاد رنگ سبز در اثر اکسیداسیون ABTS با آنزیم لاکاز برای نمونه مثبت.

ج) نمونه کنترل که عدم تغییر رنگ را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیان ژن لاکاز تحت شرایط معمول یعنی کشت سلول تحت شرایط هوازی جواب مطلوبی در بر نداشت. همان‌طور که قبلاً گزارش شده است تحت شرایط هوازی تنها بخش کمی از آنزیم بیان شده به شکل فعال باقی می‌ماند و بیشتر محصول بیان به شکل جسم توده‌ای[۱۹] است که این اتفاق ممکن است به علت جایگزینی ناقص یون مس در ساختار آنزیم باشد (۲۴). همان‌طور که دورائو[۲۰] و همکاران به این نکته اشاره کردند که محتوای مس CotA وابسته به غنی سازی محیط کشت با یون مس و وجود اکسیژن در محیط کشت است (۲۵). تغییر شرایط آئروبیک به میکروآئروبیک محتوای داخل سلولی مس را افزایش می دهد. افزایش یون مس داخل سلولی و همچنین، وجود شرایط میکروآئروبیک به ایجاد وضعیتی مناسب برای تاخوردگی و تشکیل هولوآنزیم منجر می‌شود.

توالی آمینواسیدی CotA، سویه GAZ23 که دارای ۵۱۰ آمینواسید است با توالی آمینواسیدی پروتئین CotA باکتری باسیلوس سوبتیلیس که دارای ۵۱۳ آمینواسید است در NCBI Blast بررسی شد. توالی آمینواسیدی CotA، سویه GAZ23، ۷۹ درصد شباهت[۲۱] و ۶۸ درصد همسانی[۲۲] ا به توالی آمینو اسیدی باکتری باسیلوس سوبتیلیس دارد. لیگاندهای متصل شونده به مس T1 در باکتری باسیلوس سوبتیلیس یعنی M502، H419، H497، C492 و در مس T2 یعنی: H105، H422 و در مس T3 یعنی: H107، H153، H155، H424، H491، H493 در توالی آمینواسیدی CotA، سویه GAZ23 کاملاً حفاظت شده است. ریشه اسید آمینه سیستئین C229 و C322 که فرض شده، در تشکیل باندهای دی سولفیدی در پروتئین CotA باکتری باسیلوس سوبتیلیس نقش دارند. همچنین، در توالی CotA، سویه GAZ23 حفظ شده است.

ژن مورد نظر در سویه GAZ23 همانند سایر لاکازهای قارچی و باکتریایی که تاکنون شناسایی شده، دارای ۴ ناحیه متصل شونده به مس غنی از هیستیدین است و شباهت زیادی به پروتئین‌های متصل شونده به مس دارد (۱۵).

جدول ۱- هم تراز سازی ۴ دمین متصل شونده به مس در توالی آمینواسیدی لاکاز برخی سویه‌های باسیلوسی و سویه‌های قارچی و مقایسه آن‌ها با توالی آمینواسیدی لاکاز سویه GAZ23. ریشه‌های آمینواسیدی حفاظت شده و متصل شونده یون‌های مس نوع ۱، ۲ و ۳ با سایه نشان داده شده است.

نام و شماره دسترسی	۳ ۲	۳ ۳	۳ ۲ ۱	۱ ۳۱۳
Pr: Q01679	TIHWHG ۸۳	TFWYHSH ۱۲۶	HPFHLHGHTFSVV ۴۱۸	NFLHCHIDW HL ۴۷۰
AAL00887 :Tvi	SIHWHG ۸۲	TFWYHSH ۱۲۵	HPFHLHGHAFAVV ۴۱۵	NFLHCHIDF HL ۴۸۹
AAD30964 Cc:	SIHWHG ۸۰	TFWYHSH ۱۲۳	HPFHLHGHAFSVV ۴۱۴	NFFHCHIEF HL ۴۶۶
Po: Q12793	SIHWHG ۹۶	TFWYHSH ۱۳۹	HPFHLHGHTFDVI ۴۲۷	NFLHCHIDWHL ۴۸۰
Tvi: AAB47735	TIHWHG ۸۵	TFWYHSH ۱۲۸	HPFHLHGHTFSVV ۴۲۵	NFL HCHIDF HL ۴۷۷
Bs CotA: NP_388511	VV HLHG ۱۰۳	ILWYHDH ۹ ۱۴	HPIHLHLVSFRVI ۴۱۹	YVWHCHILE HE ۴۸۶
Bh 2082: NP_ 242948	ALHLHG ۱۰۳	TYWYHSH ۱۴۳	HPMHLHGDFFHVI ۴۱۳	NMFHCHEF HA ۴۶۲
B lich: YP_077905	VVHLHG ۱۰۰	ALWYHDH ۱۴۶	HPIHLHLVQFM ۴۱۷	YVWHCHILE HED ۴۸۷
GAZ23	VVHLHG ۱۰۳	TLWYHDH ۱۴۶	HPIHLHIVQFR ۴۲۱	YVWHCHILE HED ۴۸۸

Pr: *Phlebia radiate*, **Tv:** *Trametes versicolor*, **Cc:** *Coprinus cinereus*, **Po:** *Pleurotus ostreatus*, **Tvi:** *Trametes villosa*
Bs: *B. Subtilis*, **Bh:** *B. Halodurans*, GAZ23, **Blich:** *B. Licheniformis*

از مهم‌ترین ویژگی‌های CotA پایداری دمایی این پروتئین است، لاکازهای قارچی بیشتر در دماهای پایین فعال هستند (۲۳). در نتیجه پایداری دمایی CotA مزیتی برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی است. اگرچه بیان آنزیم با افزودن مس به محیط کشت، کاهش دما و ایجاد شرایط میکروآئروبیک، نسبت به شرایط هوازی افزایش می‌یافت، اما تنها بخش کمی از آنزیم بیان شده به شکل فعال بود.

بهینه سازی شرایط بیان برای تولید آنزیمی با فعالیت بیشتر، بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در شرایط مختلف دما و اسیدیته، تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی مانند تعیین وزن مولکولی دقیق پروتئین و تعیین ساختار آنزیمی برای ادامه کار پیشنهاد می‌شود.

References

(1) Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol*1994; 140 (1): 19–26.

(2) Messerschmidt A, Huber R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin-modeling and structural relationships. *Eur J Biochem* 1990; 187(2): 341–52.

(3) Claus H. laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol* 2003; 179(3): 145-50.

(4) Omalley DM, Whetten R, Bao WL, Chen CL, Sederoff RR. The role of laccase in lignification. *Plant* 1993; 4(5): 751–57.

(5) Geiger JP, Nicole M, Nandris D, Rio B. Root-rot diseases of Hevea brasiliensis,1. Physiological and biochemical aspects of host aggression. *Eur J Forest Pathol* 1986; 16(1): 22–37

(6) Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 2002; 60: 551–65

(7) Yaropolov A. I, Skorobogat'ko O. V, Vartanov S. S, Varfolomeyev M. W. Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Biotechnol* 1994; 49(3): 257-80.

(8) Minussi RC, Pastore GM, Durán N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* 2002; 13(6-7): 205–16.

(9) Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J Cereal Sci* 2006; 43(2): 152–59.

(10) Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant ML, Bally R. Polyphenol oxidase in Azospirillum lipoferum isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of Azospirillum lipoferum. *FEMS Microbiol Lett* 1993; 108(2): 205-10

(11) Driks A. The Bacillus subtilis spore coat. *Phytopathology* 2004; 94(11): 1249–51.

(12) Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT, Rouch DA. Molecular gene and transport analysis of the copper resistabcse determinant (pco) from Escherichia coli plasmid pRJ 1004. *Mol Microbiol* 1995, 17(6):1153-66.

(13) H. J. Ruijssenaars. S. Hartmans. A cloned Bacillus halodurans multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 65(2): 177–82.

(14) Renate Reiss, Julian Ihssen, Linda Thöny-Meyer. Bacillus pumilus laccase: a heat stable enzyme with a wide substrate spectrum. *BMC Biotechnology* 2011; 11(1): 9.

(15) Feng Xu, Damhus T, Danielsen S, Ostergaard LH. *Modern biooxidation: Enzyme, Reaction and Apllication*. Edited by Rolf D. Schmid, Valada B. urlacher. Weinheim: Wiley; 2007.

(16) Sharma P, Goel R, Capalash N. Bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol* 2007. 23: 823–32.

(17) Gerhardt P, Murray R. G. E. *Methods for general and molecular bacteriology*. 3rd Edition. Washington. D. C: American Society for Microbiology; 1994.

(18) Atlas R. M, Bartha R. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. 4th Edition. Addison: Wesley; 1998.

(19) Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, B. R. Ausubel FM, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, editor. New York: *John Wiley & Sons*; 1987.

(20) Spencer J. *Environmental microbiology: methods and protocols*. US: Humana Press Inc; 2004.

(21) Saitou N, Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 1987; 4: 406-25.

(22) Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985, 39(4): 783-91.

(23) Kumar S, Stecher G, Peterson D, and Tamura K. MEGA-CC: Computing Core of Molecular Evolutionary Genetics Analysis Program for Automated and Iterative Data Analysis. *Bioinformatics* 2012; 28:2685-86.

(24) Koschorreck K, Richter SM, Ene AB, Roduner E, Schmid RD, Urlacher VB. Cloning and characterization of a new laccase from Bacillus licheniformis catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 79(2):217-24.

(25) Durao P, Chen Z, Fernandes AT, Hildebrandt P, Murgida DH, Todorovic S, et al. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from Bacillus subtilis: characterization of fully copper loaded enzymes. *J Biol Inorg Chem* 2008; 13(2):183–93.

---

[1]. *Azospirillum lipoferum*
[2]. *Bacillus subtilis*
[3]. *E. coli*
[4]. *B. halodurans*
[5]. *B. licheniformis*
[6]. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
[7]. Fermentase
[8]. 2,2□-azino-bis(3-ethylbenzothioazolin-6-sulphonic acid
[9]. Sigma-Aldrich
[10]. Merck
[11] Hucker
[12] Schaeffer-fulton
[13] Macrogen korea
[14]. http://blast. ncbi. nlm. nihi. gov
[15]. Phenyl methanesul fonyl fluoride or phenyl methyl sulfonyl fluoride
[16]. http://eztaxon-e. ezbiocloud. net/
[17] MEGA5
[18] www.expasy.ch
[19]. Inclosion body
[20] Durao
[21]. similarity
[22]. Identity

Cloning and Expression of Laccase Enzyme from *B. pumilus* strain GAZ23

Parvin Zamani
MSc of Microbiology, University of Tehran, Iran, zamani_6413@yahoo.com
Mohammad Ali Amoozegar *
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Khosro Khajeh
Professor of Biochemistry, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, khajeh@modares.ac.ir

Abstract

Introduction: : Laccases (benzene diol oxygen oxidoreductase: EC 1.10.3.2 are one of the multicopper oxidase family members that catalyze the oxidation of various phenolic compounds by using molecular oxygen

Materials and methods Laccase gene was from strain GAZ23 amplified by cloning primers. PCR product cloned in the expression vector (pET21a) and transferred to BL21 strain of *E. coli* and sequence analysis were carried out. Biochemical properties were investigated using common laccase substrates, 2,2 -azino-bis(3-ethylbenzothioazolin-6-sulphonicacid (ABTS).

Results: 16S rRNA gene of strain GAZ23 isolated from Iran soils, showed high similarity to *Bacillus pumilus* (100%). The gene of the GAZ23 has an open reading frame composed of 1533 bases, which encode 510 amino acid residues.

Discussion and conclusion: The laccase gene from GAZ23 shows 67% similarity with CotA from *B. subtilis*. The expression was performed under microaerobic condition and decreased temperature in order to obtain high amounts of soluble protein. This protein contains four histidine rich copper-binding domains.

Key words: laccase, CotA protein, *B. pumilus*, Gene expression

* Corresponding author, Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran
Received: May 15, 2012 / **Accepted:** November 6, 2013