مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

همسانه‌سازی و بیان ژن آلکان هیدروکسیلاز از باکتری *Pseudomonas putida*

مهدی حسن شاهیان*[1]، هادی روان[2]

[1] دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، انشگاه شهید باهنر کرمان، ایران
[2] استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۲/۰٤

چکیده

Pseudomonas putida یک باکتری هتروتروف بوده که قابلیت رشد روی طیف وسیعی از سوبستراها که عمده آن ها آلکان‌ها هستند، دارا می باشد. توانایی تجزیه طیف وسیعی از هیدروکربن‌ها، نشان‌دهنده برتری این ارگانیسم نسبت به اعضای دیگر جامعه میکروبی تجزیه کننده نفت می باشد. باکتری P. putida دارای سیستم آلکان هیدروکسیلاز (ژن alk-B) برای تجزیه آلکان‌ها می‌باشد. هدف از اجرای تحقیق حاضر جداسازی و بیان ژن آلکان هیدروکسیلاز باکتری P. putida می باشد. برای این منظور ابتدا همسانه‌سازی در پلاسمید pBluescript انجام شد و سپس ناحیه کدکننده ژن مذکور در پلاسمید pET-26a وارد شد. بیان ژن خارجی در سویه BL-21 از باکتری E. coli صورت پذیرفت. فعالیت آنزیم نوترکیب حاصله با تفاوت جذب اسپکتروسکپی در اثر اکسید کردن NADPH تعیین شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن آلکان هیدروکسیلاز در پلاسمید pBluescript به‌خوبی جایگزین گردید، کلنی PCR نیز این امر را تایید کرد. ژن مربوطه به‌خوبی در وکتور pET-26a کلون شد. با افزایش زمان پس از القاء با IPTG ، بیان پروتئین آلکان هیدروکسیلاز افزایش یافت. پروتئین نوترکیب حاصله دارای فعالیت آنزیمی مناسب می باشد. انتقال این ژن به باکتری سریع الرشد و سوبسترای غذایی وسیع می تواند نوید بخش تولید بیوکاتالیزوری با کارایی برتر باشد.

واژه های کلیدی: *آلکان‌ها، بیوکاتالیز، بیان پروتئین، تجزیه زیستی، کلونینگ.*

.

* *نویسنده مسئول: **مهدی حسن شاهیان** تلفن: ۰۳٤۳۳۳۲۲۰٦۷ Email hasanshahi@gmail.com

مقدمه

نفت خام یکی از مهمترین منابع طبیعی است که سوخت فسیلی عمده منابع صنعتی و ماده مورد نیاز در صنایع پتروشیمی است. آلودگی مزمن محیط با نفت موجب بهم ریختگی اکولوژیکی می‌شود و مانع استفاده پایدار آن توسط بشر است. روش‌های احیای زیستی امروزه به‌عنوان بهترین، کم خطرترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها برای حذف آلودگی‌های نفتی و هیدروکربنی می‌باشند. تاکنون باکتری‌های گوناگونی برای این هدف استفاده شده-اند، ولی باکتری P. putida نه تنها هیدروکربن‌های نفتی را در شرایط آزمایشگاهی تجزیه می کند، بلکه به نظر می‌رسد در خارج کردن نفت از اکوسیستم‌های خشکی اهمیت بسیاری دارد. بنابراین، بدیهی است که پتانسیل تجزیه زیستی سیستم‌های آلوده به نفت را داشته باشد (Hassanshahian *et al*., 2010; Elcia *et al*., 2005). این باکتری قادر به رشد بر روی طیف محدودی از سویستراها است، که عمدتا سوبسترای آن آلکان‌ها می‌باشند (Yateem *et al*., 2002). باکتری P. putida دارای سیستم آلکان هیدروکسیلاز (alk-B) برای تجزیه آلکان‌ها می‌باشد (Vanbeilen *et al*., 2006). اغلب باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های آلیفاتیک دارای سیستم آلکان هیدروکسیلاز وابسته به غشاء می‌باشند. آلکان هیدروکسیلاز متصل به غشاء ابتدا در سودوموناس فلورسنت تجزیه کننده هگزان شناسایی شد که بعداً P. oleovirans نامیده شد و کمی بعدتر به عنوان P. putida تشخیص داده شد. مطالعات بیوشیمی نشان داده که سیستم آلکان هیدروکسیلاز P. putida دارای یک مونواکسیژناز غشاءگذر، ۱ تا ۲ روبرودوکسین و یک روبرودوکسین رودوکتاز می‌باشد. روبرودوکسین رودوکتاز الکترون‌ها را از NADH (نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید) از طریق کوفاکتور FAD به روبرودوکسین منتقل می‌کند که آن نیز الکترون‌ها را به آلکان هیدروکسیلاز منتقل می‌نماید (Sei *et al*., 2003).

استفاده از باکتری P. putida جهت تجزیه زیستی دارای محدودیت‌هایی است که شامل کند رشد بودن آن و عدم استفاده از کربوهیدرات‌ها جهت رشد می‌باشند. یکی از راه حل‌ها برای این محدودیت‌ها انتقال ژن‌های تجزیه کننده آلکان‌ها از این باکتری به باکتری های سریع الرشد است (Hassanshahian *et al*., 2012a; Hassanshahian *el al*., 2012b).

آلکان هیدروکسیلاز بزرگترین بالا خانواده آنزیم‌های حاوی هم است و توالی ژنی آن در ارگانیسم‌های متعددی، از قبیل پستانداران، گیاهان آلی، جلبک ها، قارچ ها و باکتری ها شناسایی شده است. در پژوهشی Vanbeilen *et al*. (2006) با طراحی یک وکتور پلی سیسترونی ژن alk-B را با

ژن فرودوکسین و فرودوکسین روداکتاز به P. putida انتقال دادند، که سویه های نوترکیب قادر به رشد روی آلکان بودند (Vanbeilen *et al.*, 2006). در پژوهشی دیگر Vanbeilen *et al.* (2004) ۱۶ ژن alk-B را از محیط‌های مختلف از قبیل خاک آلوده به نفت، آب‌های زیر زمینی و همچنین P. putida جداسازی کردند. یکی از فرضیات این تحقیق این است که ژن آلکان هیدروکسیلاز از این باکتری قابلیت بیان در میزبان E. coli را دارد. هدف از انجام این تحقیق همسانه سازی و بیان یکی از ژن های مهم باکتری P. Putida در تجزیه زیستی آلکان‌ها می‌باشد. هدف دیگر این تحقیق کاربرد ژن و پروتئین آلکان هیدروکسیلاز همسانه شده از این باکتری به‌عنوان کاتالیزور زیستی جهت هیدروکسیله کردن آلکان‌ها بود.

مواد و روش ها

میزبان های باکتریایی، پلاسمیدها و پرایمرها

در این تحقیق از سویه P. putida به‌عنوان تولید کننده پروتیئن آلکان هیدروکسیلاز (alk-B) برای کلیه مطالعات به کار گرفته شد. سویه DH5α باکتری E. coli به عنوان میزبان در مراحل همسانه سازی سازی و جهت تکثیر DNA پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت و سویه BL21(DE3) به عنوان میزبان بیان کننده مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق ناقل پلاسمیدی pBluescript برای کلون سازی ژن رمز کننده alk-B بکار رفت. همچنین از پلاسمید pET-26a نیز برای بیان ژن alk-B استفاده گردید. در این تحقیق از پرایمرهای alk-F 5'- GAG ACA AAT CGT CTA AAA CGT AA-3′ و alk-R: TTG TTA TTA TTC CAA CTA 5'- TGC TC-3 جهت تکثیر ژن alk-B استفاده شد.

تکثیر ژن alk-B

با استفاده از پرایمرهای طراحی شده، ژن alk-B با PCR تکثیر یافت. این ژن به طول ۳۳۰ جفت باز می‌باشد. مواد مورد استفاده در واکنش تکثیر با حجم 25 µl عبارت بود از: dNTP 1.5μl (10 µM)، Buffer pfu DNA poly 2.5μl (20 mM)، $MgCl_2$ 1μl (5 mM)، Primer alk-F 1μl (10 PMol)، Primer alk-R 0.5μl (10 PMol)، pfu polymerase (1 unit)، Template- DNA 1μl (20 ng) و H_2O 16.5μl. برنامه PCR با ۳۰ سیکل بصورت زیر بود: دناتوراسیون در دمای ۹٤ درجه به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ٥٤ درجه به مدت یک دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه بود. محصول حاصله از PCR روی ژل آگارز یک درصد قرار گرفت و برای استخراج DNA (قطعه‌ی ۳۳۰ جفت بازی) از ژل آگارز، کیت استخراج DNA (شرکت فرمنتاس، کره جنوبی K0513) طبق دستورالعمل همراه باکیت بکار رفت (Sambrook & Russel, 2001).

همسانه سازی ژن alk-B داخل پلاسمید pBluescript

پلاسمیدpBluescript با استفاده از کیت Metabion طبق دستورالعمل کیت از میزبان باکتریایی (DH5α) استخراج شد. واکنش هضم تک آنزیمی توسط آنزیم EcoRV برای خطی کردن پلاسمید pBluescript به‌کار رفت. واکنش اتصال[1] جهت وارد نمودن ژن alk-B درون پلاسمید pBluescript انجام شد. روش کار بدین صورت بود که در حجم واکنش 25 µl میزان 0.4µg از ژن alk-B با0.2µg از پلاسمید همراه با 1Unit از آنزیم T4 DNA ligase و بافر آن به مدت یک شب در دمای ١٦ درجه گرم‌خانه گذاری[2] گردید. سلول‌های مستعد جهت پذیرش DNA پلاسمیدی خارجی طبق دستورالعمل (Sambrook and Russel, 2001) تهیه شد. با استفاده از روش شوک حرارتی پلاسمید به سلول های مستعد منتقل گردید و واکنش تبدیل[3] صورت گرفت. به منظور غربالگری، میزان ٥٠ µl از باکتری‌های E. coli DH5α ترانسفورم شده (مخلوط باکتری‌های نوترکیب و باکتری های حاوی پلاسمید pBluescript) در محیط کشت LB حاوی X-gal، IPTG و آنتی بیوتیک Amp پخش شد و پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. برای اطمینان از این‌که کلنی‌های سفید حاصل واجد پلاسمید نوترکیب می‌باشند، کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن alk-B انجام شد.

انتقال ژن alk-B به پلاسمید pET-26a

ابتدا پلاسمید pET-26a از درون میزبان باکتریایی آن (E.Coli BL-21) با استفاده از کیت Metabion استخراج شد. همچنین پلاسمید pBluscript که دارای ژن alk-B بود نیز از باکتری E.coli DH5α استخراج گردید. یک واکنش هضم دو آنزیمی برای هر دو پلاسمید گذاشته شد. در واکنش هضم دو آنزیمی از آنزیم-های محدودالاثر NdeI و XhoI استفاده گردید. زیرا آنزیم NdeI دارای جایگاه اثر در پرایمر F ژن alk-B و آنزیم XhoI دارای جایگاه اثر تنها در پلاسمید pBluscript است. بنابراین، با این واکنش آنزیمی ژن alk-B از درون پلاسمید pBluscript بصورت چسبنده خارج می‌گردد. بطور همزمان با همین دو آنزیم پلاسمید pET-26a نیز برش داده شد. محصول حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pET-26a و پلاسمید pBluescript در ژل آگارز یک درصد قرار گرفت. سپس با کیت استخراج DNA از ژل پلاسمید خطی شده pET-26a و ژن alk-B خالص سازی گردید. واکنش اتصال دو قطعه طبق روش شرح داده شده در قسمت ٢-٣ انجام شد.

1. Ligation
2 . Incubation
3 . Transformation

بیان ژن alk-B

باکتری E.coli BL-21 بعنوان میزبان بیان کننده پروتئین نوترکیب بکار رفت. سلول‌های مستعد باکتری E.coli سویه BL-21 ابتدا طبق روش شرح داده شده در بالا تهیه گردید. سپس میزان ۲ میکرولیتر از محصول اتصال[1] جهت تبدیل کردن باکتری BL-21 و انتقال پلاسمید pET-26 نوترکیب بکار رفت. انتخاب کلنی‌های نوترکیب BL-21 در محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین انجام شد. پس از ظاهر شدن کلنی ها روی محیط انتخابی، کلنی PCR جهت تائید صحت همسانه سازی با پرایمرهای اختصاصی ژنalk-B صورت گرفت (Sambrook &Russel, 2001).

۱۰ میلی لیتر محیط LB مایع همراه با آنتی بیوتیک کانامایسین به داخل ارلن ۵۰ میلی لیتری ریخته شد. یک کلنی از کشت تازه برداشته و به داخل آن تلقیح گردید و سپس در دمای $۳۷^{\circ}C$ در انکوباتور شیکردار بطور شبانه گرماگذاری گردید. برای القاء جهت بیان پروتئین، IPTG[2] به غلظت نهایی 0.5-1 میلی مولار به آن اضافه شد. رشد باکتری‌ها به مدت ۵-٤ ساعت ادامه یافت. هر یک ساعت ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه رسوب داده شد و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه SDS-PAGE به حالت سوسپانسیون درآورده شد و تا زمان انجام SDS-PAGE در فریزر°C ۲۰- قرار گرفت. برای تفکیک و تعیین جرم مولکولی پروتئین‌ها از الکتروفورز عمودی و ژل SDS- PAGE[3] استفاده شد (Sambrook & Russel, 2001).

سنجش فعالیت آنزیم نوترکیب Alk-B

کشت باکتری و القای تولید آنزیم

باکتری E.coli BL-21 که دارای پلاسمید pET-26 نوترکیب بود را در ۲۵۰ میلی لیتر از محیط LB حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱۵۰ دور در دقیقه کشت داده شد. زمانی‌که جذب نوری آن در طول موج ٦۰۰ نانومتر به ۰/۳ رسید، به محیط IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار افزوده شد و در دمای ۳۷̊C به مدت ۸ ساعت انکوبه گردید. علاوه بر این، از کلون‌ها با شرایط مشابه فوق کشت‌هایی تهیه شد با این تفاوت که به آنها IPTG افزوده نشد. پس از اتمام دوره انکوباسیون باکتری‌ها در دور ٤۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه رسوب یافتند. بیوماس باکتری حاصله به مدت ٤ ساعت در معرض هگزادکان قرار گرفت تا فعالیت آنزیم Alk-B تحریک گردد. سپس سلول-های باکتریایی با اولتراسونیک شکسته شدند. لاشه باکتری‌ها و همچنین باکتری‌های شکسته نشده با سانتریفوژ در ٤۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه رسوب یافتند. عصاره

1 . Ligation

2 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

2. Sodium dodecyl sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis،

سلولی حاصله از هر دو کشت باکتریایی (القاء شده با IPTG و غیر القاء) جهت سنجش فعالیت آنزیم Alk-B استفاده شد (Vanbeilen *et al*., 2006)

روش سنجش آنزیم الکان هیدروکسیلاز (Alk-B)

برای سنجش فعالیت آنزیم الکان هیدروکسیلاز مخلوط واکنش آنزیمی بدین صورت تهیه گردید. مخلوط واکنشگر با حجم نهایی ۱ میلی لیتر شامل محلول اکتان (۱۰ µl) ، محلول NADPH (۳۰۰ µl) ، عصاره سلولی (۱۰۰ µl)، تریس ۵۰ میلی مولار (۵۹۰ µl). مخلوط شاهد حاوی همه مواد ذکر شده بود فقط عصاره سلولی به آن اضافه نگردید. جذب مخلوط واکنش را در ۳٤۰ نانومتر دو دقیقه قبل از اضافه کردن اکتان و ۳ دقیقه بعد از اضافه کردن اکتان در مقابل شاهد اندازگیری می‌شود. کاهش جذب در ۳٤۰ نانومتر نشانگر فعالیت آنزیمی است. یک واحد آنزیمی از فعالیت آلکان هیدروکسیلاز مطابقت با مقدار آنزیمی است که یک میکرو مولار NADPH را به ازای یک دقیقه اکسیده می‌کند Vanbeilen *et al*., (2006).

نتایج

تکثیر ژن alk-B

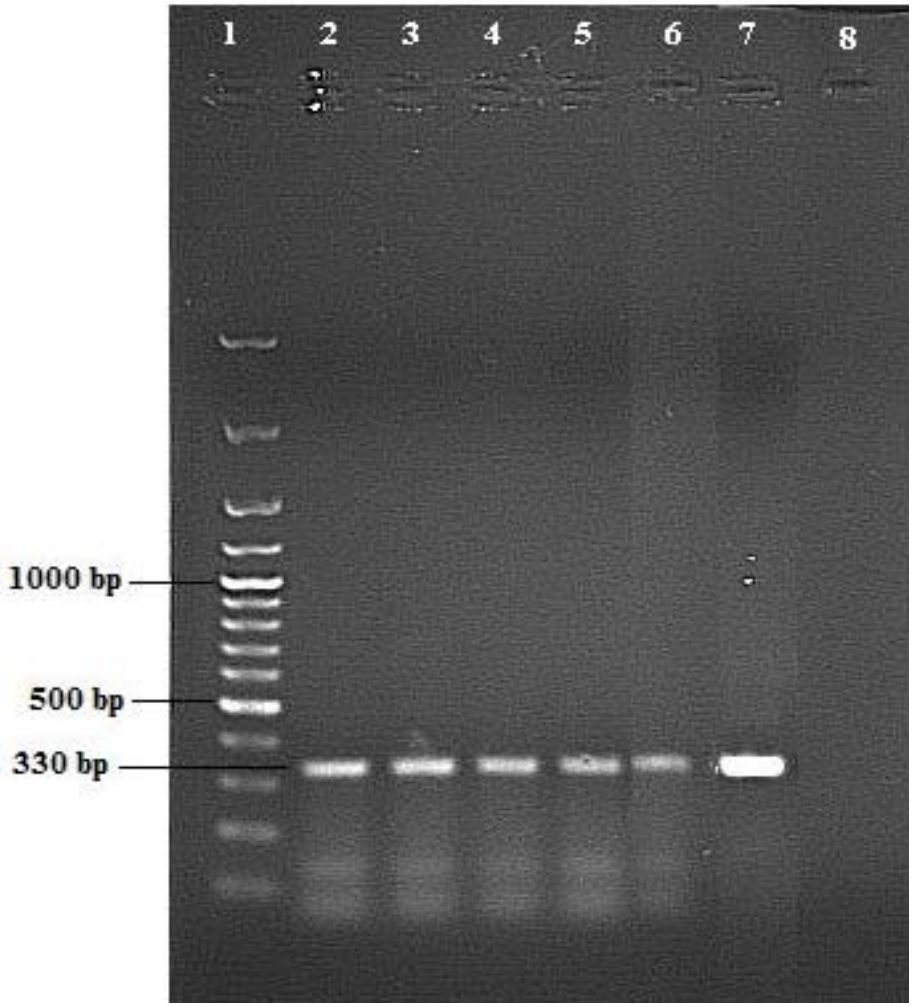
با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (alk- F و alk- R) و آنزیم Pfu پلیمراز واکنش PCR انجام و محصول آن بر روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۱). قطعه تکثیر شده به طول تقریبی ۳۳۰ جفت باز می‌باشد که اندازه آن در مقایسه با ژن alk-B باکتری P. putida موجود در بانک ژن مطابقت دارد.

همسانه سازی ژن alk-B در پلاسمید pBluescript

انتقال ژن alk-B درون پلاسمیدpBluescript موفقیت آمیز بود. نتایج حاصله در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به این شکل، همسانه سازی ژن alk-B تایید می‌شود. زیرا کلنی سفید که واجد پلاسمید هستند پس از استخراج و بارگذاری در ژل از نظر اندازه مولکولی بالاتر از کلنی آبی که فاقد پلاسمید هستند قرار گرفته است.

بررسی کلنی های نوترکیب توسط PCR

برای تایید وجود ژن alk-B در کلونی‌های نوترکیب (کلنی سفید) از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. DNA پلاسمیدی استخراج شده از تعدادی از کلونی های نوترکیب به همراه یک کلنی آبی بعنوان کنترل منفی با پرایمرهای ویژه ژن alk-B مورد واکنش PCR قرار گرفتند. نتایج نشان داد که کلیه کلنی‌های سفید دارای ژن alk-B هستند، در حالی‌که کلنی آبی فاقد این ژن است (شکل ۳).

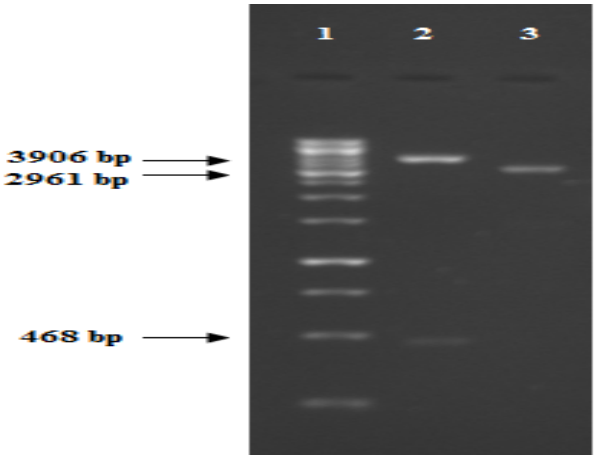


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن alk-B با استفاده از پرایمرهای alk-F و alk-R بر روی ژل آگارز یک درصد، چاهک (۱) مارکر (100 bp)، چاهک (۷-۲) محصول PCR و چاهک (۸): کنترل منفی

Figure 1- Gel electrophoresis of PCR product of alk-B gene with alk-F and alk-R primers on 1 % agarose gel. Lane (1): 100bp marker ladder, lane (2-7): PCR product and lane (8): Negative control.

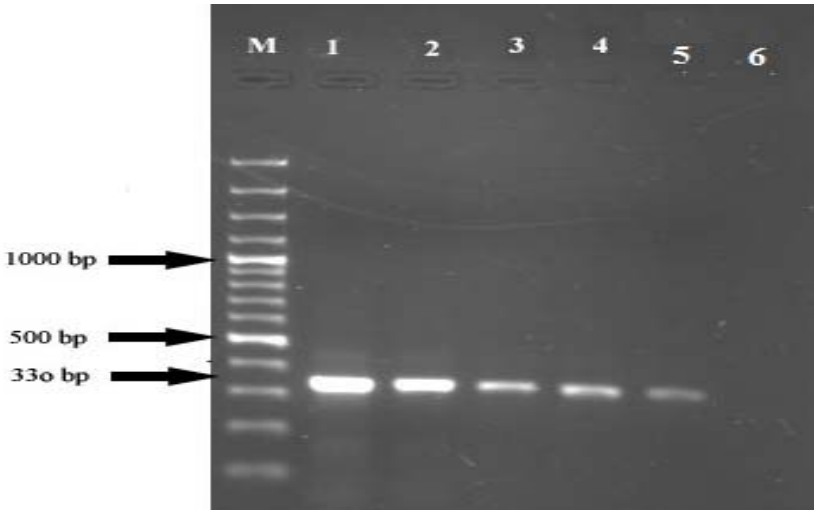
انتقال ژن alk-B به پلاسمید pET-26a

با توجه به این‌که در این تحقیق هدف بیان ژن همسانی شده نیز بود، لذا انتقال ژن به یک وکتور بیانی صورت گرفت. نتیجه حاصله از این انتقال در شکل ٤ نشان داده شده است.



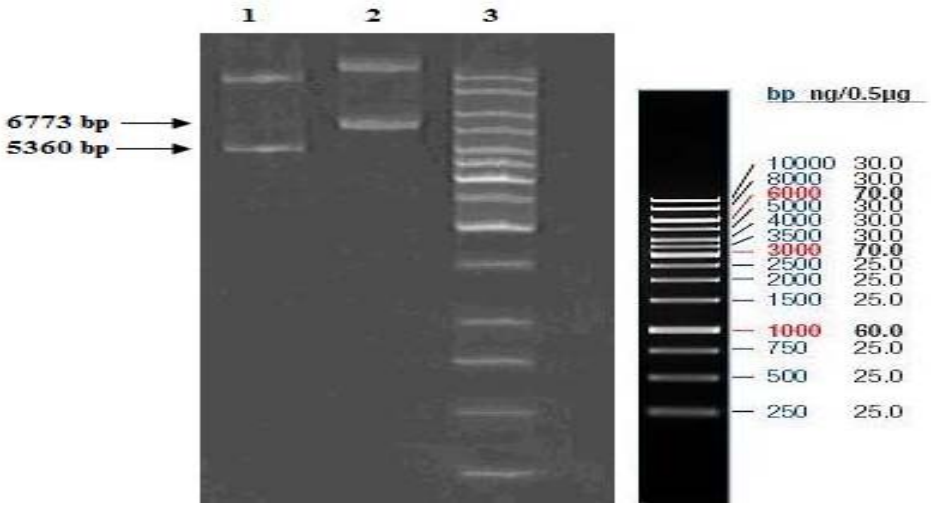
شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز استخراج پلاسمید نوترکیب، چاهک (۱): مارکر 1kb،چاهک (۲): کلنی سفید که واجد پلاسمید نوترکیب pBlu-alk-B است چاهک (۳): کلنی آبی که تنها پلاسمید pBluescript را دارد .

Figure 2- Gel electrophoresis of extracted recombinant plasmid: Lane (1) 1kb ladder, lane (2): white colony contain recombinant pBlu-alk-B plasmid, lane (3): Blue colony contain only pBluscript plasmid.



شکل ۳- تایید وجود ژن alk-B در کلنی های نوترکیب. چاهک (M): مارکر 100 bp چاهک (۵-۱): کلنی ها سفید و چاهک (٦): کلنی آبی.

Figure 3- Confirmation the presence of alk-B gene in recombinant colonies, lane (M): 100bp ladder, lane (1-5): White colonies and lane (6): Blue colony.



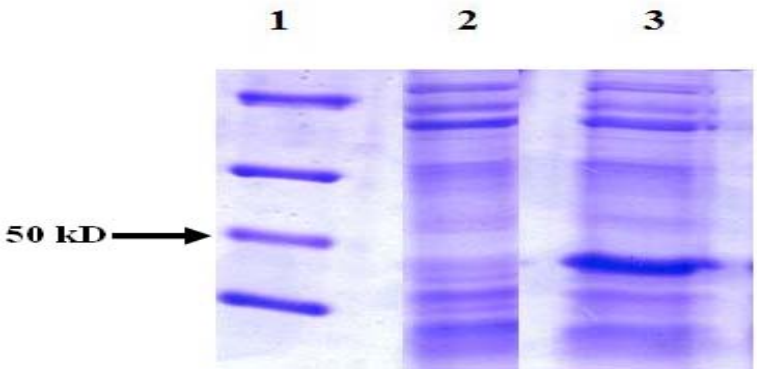
شکل ٤- الکتروفورزDNA پلاسمیدی: چاهک (۱): پلاسمید pET-26a بعنوان کنترل منفی، چاهک (۲): pET-26-alk-B استخراج شده ، چاهک (۳): مارکر 1Kb

Figure 4- Electrophoresis of plasmid DNA: lane (1): pET-26a as negative control, lane (2): pET-26-alk-B, lane (3) a Kb ladder.

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود این انتقال موفقیت آمیز بوده است، بطوری‌که پلاسمیدی که حاوی کلنی نوترکیب بوده واجد ژن alk-B است و وزن مولکولی بالاتری نسبت به کلنی که تنها حاوی پلاسمید pET-26a است، دارد. برای تایید نهایی حضور ژن از کلنی های غربال شده PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن alk-B صورت گرفت و مشخص شد که کلنی های فوق حاوی این ژن هستند. نتایج حاصل نشان داد که با افزایش زمان پس از القاء با IPTG بیان پروتئین آلکان هیدروکسیلاز افزایش یافته است و عدم حضور آن در پلاسمید pET-26a (غیر نوترکیب) نشان دهنده بیان این پروتئین تنها در پلاسمید نوترکیب می‌باشد (شکل ۵).

سنجش فعالیت آنزیمی پروتئین نوترکیب آلکان هیدروکسیلاز

اصول بررسی تعیین فعالیت آنزیم آلکان هیدروکسیلاز بر پایه کاهش جذب در ۳٤۰ نانومتر بود. نتایج حاصله از سنجش فعالیت آنزیمی الکان هیدروکسیلاز در شکل ٦ آمده است. این نتایج نشان دهنده این می باشد که آنزیم نوترکیب حاصله دارای فعالیت مناسب آنزیمی است. پیک ۳٤۰ نانومتر مربوط به اتصال سوبسترا به آنزیم فعال است، که آنزیم نوترکیب در مقایسه با شاهد کاهش قابل ملاحظه ای در این ناحیه دارد.

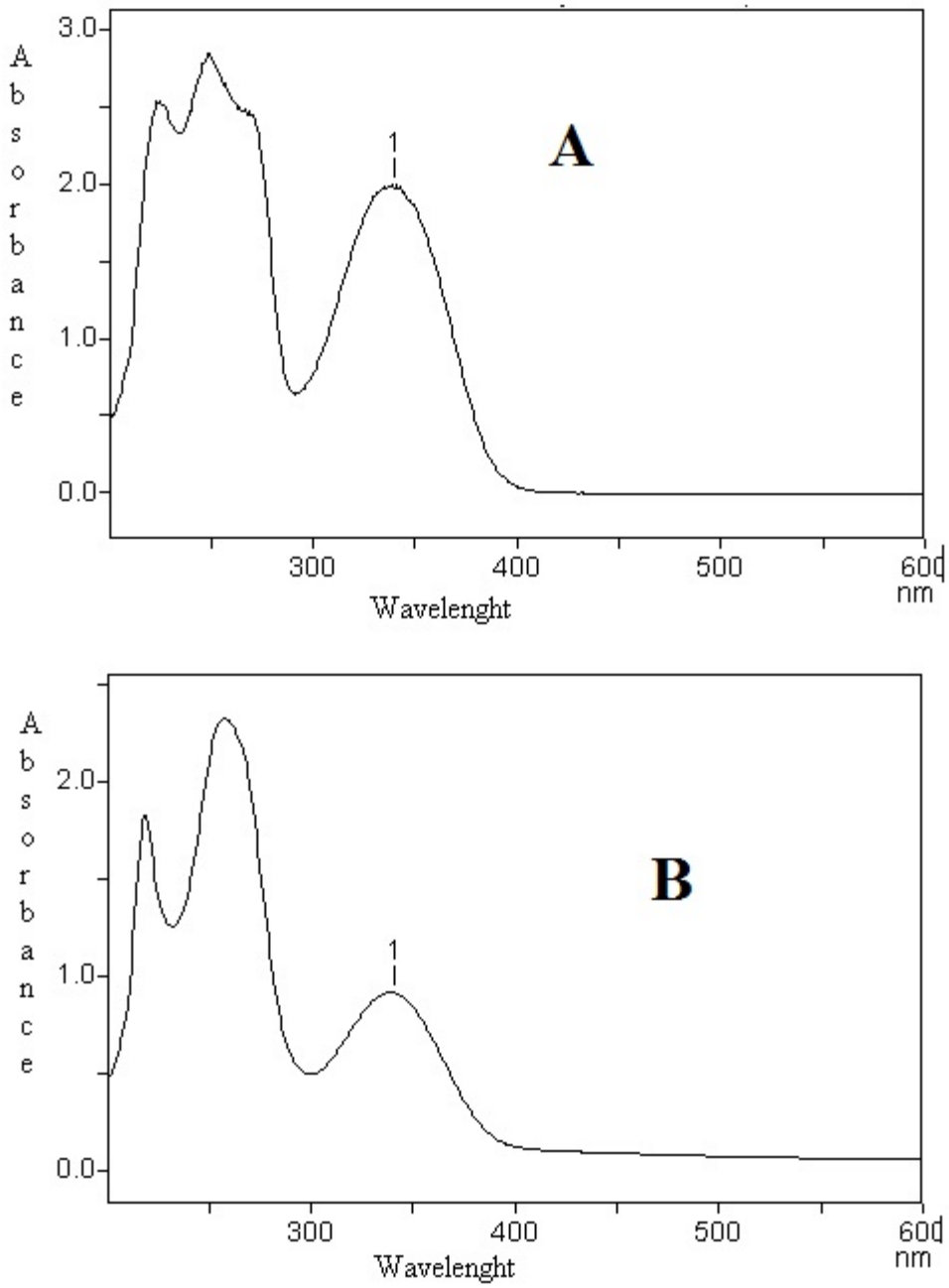


شکل ۵- الکتروفورز عصاره باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pET-26-alk-B و پلاسمید pET-26a توسط ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد. چاهک (۱): مارکر وزن مولکولی پروتئین. چاهک (۲): عصاره باکتری حاوی پلاسمید pET-26a چاهک (۳) باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب pET-26-alk-B بعد از القا با IPTG

Figure 5- Protein electrophoresis of bacterial extract contain pET-26-alk-B with SDS-PAGE 15%: lane (1): Protein marker, lane (2): bacterial extract contain pET-26a, lane (3): bacteria contain recombinant pET-26-alk-B after induction by IPTG

بحث و نتیجه گیری

ویژگی مشخصه باکتری P. putida توانایی رشد بر روی آلکان‌ها است. این موضوع، باعث برتری این ارگانیسم نسبت به اعضای دیگر جامعه میکروبی تجزیه کننده نفت شده است (Cepeda *et al*., 2006). این باکتری دارای سیستم‌های چندتایی جهت کاتابولیسم هیدروکربن‌ها است. یکی از مهمترین این سیستم ها آلکان هیدروکسیلاز است. پروفایل پروتئولیتیک پیشنهاد کرده است که سیستم Alk-B نقش مهمی در کاتابولیسم هیدروکربن‌های اشباع دارد (Vanbeilen *et al*., 2003). در پژوهشی Sei *et al.* (2003) توالی ژنوم باکتری P. putida را به‌طور کامل گزارش کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که این باکتری دارای ژن‌های متعددی برای تجزیه آلکان‌ها می‌باشد و همچنین سیستم ژنتیکی آن دارای ژن‌هایی برای تشکیل بیوفیلم در فاز آبی-نفتی، تولید بیوسورفکتانت، پاسخ به استرس‌ها و جذب عناصر کمیاب است. تا کنون دو گزارش از همسانه سازی ژن‌های تجزیه کننده هیدروکربن ها وجود دارد. در پژوهشی ژن alk-B1 ازP. putida در E. coli همسانه سازی شد (Smits *et al*., 2002). آنها با تعیین توالی ژن کلون شده و مقایسه توالی با ژن‌های alk-B موجود از سایر باکتری‌ها به این نتیجه رسیدند که ژن alk-B1 باکتریP. putida مشابه ژن alk-B باکتری P. oleovorans GPO1 می‌باشد.



شکل ٦- کاهش جذب در ۳٤۰ نانومتر توسط آنزیم الکان هیدروکسیلاز نوترکیب (A) شاهد فاقد عصاره سلولی (B) آنزیم نوترکیب

Figure 6- Reduction of absorbance in 340 nm with recombinant alkane hydroxylase enzyme (A): Blank without cell extract and (B): Recombinant Enzyme.

پژوهشگران ژن‌های alk-B1 و alk-B2 باکتری P. putida را در E. coli همسانه سازی نمودند و متعاقبا این دو ژن را در سویه اصلی تخریب کردند و خصوصیات رشدی موتانت های بهم ریخته را مورد تحقیق قرار دادند (Hara *et al*., 2004). نتایج آنها نشان داد که ژن alk-B1 مسئولی برای تجزیه هگزادکان می باشد و موتانت‌هایی که هر دو ژن آنها تخریب شده بودند هنوز قادر به رشد بر روی آلکانهای با زنجیره متوسط بودند که دلالت بر این دارد که آلکان های با زنجیره متوسط در این باکتری عمدتا بوسیله سیستم های آنزیمی به‌جز Alk-B1 و Alk-B2 هیدروکسیله می‌شوند. آنها آلکان هیدروکسیلاز را مسئول تجزیه آلکان‌ها در موتانت‌ها دانستند (Hara *et al*., 2004). در پژوهش حاضر، ژن alk-B از باکتری P. putida جداسازی گردیده و با استفاده از ناقل بیانی در میزبان باکتریایی به صورت نوترکیب بیان گردید. با مراجعه به منابع تاکنون هیچ گزارشی از همسانه سازی ژن alk-B باکتریP. putida دیده نشد و تنها گزارش مربوط به Vanbeilen *et al.* (2006) می باشد. این محققین نیز ژن alk-B این باکتری را به تنهایی همسانه سازی ننموده اند، بلکه از آن برای ساخت پروتئین چایمریک همراه با ژن‌های بدست آمده از منابع محیطی استفاده کردند. در این تحقیق سنجش فعالیت آنزیمی پروتئین نوترکیب Alk-B بر اساس کاهش جذب در ۳٤۰ نانومتر سنجش گردید. در پژوهشی Vomberg *et al.* (2000) برای سنجش فعالیت آنزیمی میزان تبدیل اکتان به اکتانول را با GC-MS اندازه گیری نمودند. همچنین Vanbeilen *et al*. (2007) با همسانه سازی و بیان ژن alk-B از منبع مخمری به این نتیجه رسیدند که اندازه گیری سنجش فعالیت کاهش جذب در ۳٤۰ نانومتر بهترین روش می‌باشد. زیرا به سنجش مستقیم و سریع الکان هیدروکسیلاز فعال امکان داده و از طرفی نیازمند خالص سازی آنزیم نمی-باشد و تنها محدودیت این روش در این است که نیازمند مقادیر بالایی از الکان هیدروکسیلاز جهت اندازه گیری دقیق می‌باشد. پژوهشگران دیگر ژن alk-B از C. albicans را در E. coli کلون، بیان و خالص سازی نمودند و از کاهش جذب در ۳٤۰ نانومتر جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده کردند (Vanbeilen and Klinner, 2003). میزان فعالیت و تفاوت جذب به‌دست آمده در این تحقیق در مقایسه با محققین دیگر پایین است که می تواند به دو علت باشد: (۱) با توجه به این که کلونینگ در میزبان دیگری صورت گرفته است این احتمال وجود دارد که فولدینگ پروتئین آلکان هیدروکسیلاز تغییر کرده باشد. (۲) ممکن است سلول ها بخوبی شکسته نشده باشند. در پایان پیشنهاد می‌شود که از این باکتری نوترکیب جهت طراحی ساخت بیوکاتالیزور جهت هیدروکسیله کردن آلکان‌ها و تبدیل آنها به الکل استفاده گردد.

منابع

Cepeda C, Leiro MC, Seoane S, Gilsotres F (2000). Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. Soil Biology & Biochemistry 32: 1867–1875.

Elcia M, Brito S, Rémy G (2005). Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. Research in Microbiology 22: 145-14.

Hara A, Sang-ho B, Kazuaki S, Norihiko M, Smits T, Vanbeilen J, Harayama S (2004). Cloning and functional analysis of alkB genes in Alcanivorax borkumensis SK2. Environmental Microbiology 6: 191–197.

Hassanshahian M, Tebyanian H, Cappello S (2012a). Isolation and characterization of two crude-oil degrading yeast strains, Yarrowia lipolytica PG-20 and PG-32 from Persian Gulf. Marine Pollution Bulletin 64: 1386–1391.

Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S, (2012b). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin 64: 7–12.

Hassanshahian M, Emtiazi G, Kermanshahi R, Cappello S (2010). Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspian Sea. Soil and Sediment Contamination 19: 277-291.

Sambrook J, Russell D (2001). Molecular Cloning III: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 117-187.

Sei, K, Sugimoto Y, Mori K, Maki H, Kohno T (2003). Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane catabolic genes. Environmental Microbiology 5: 517–522.

Smits TH, Balada SB, Witholt B, Vanbeilen JB (2002). Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. Journal of Bacteriology 84: 1733–1742.

Vanbeilen J, Martin N, Smits T, Christian R, Stefanie B, Witholt B (2006). Rubredoxins involved in alkane oxidation. Journal of Bacteriology 184: 1722–1732.

Vanbeilen J Enrico G (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. Applied Microbial Biotechnology 74: 13–21.

Vanbeilen J, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil & Gas Science and Technology 58: 427–440.

Vanbeilen J, Mercedes M, Marín HM (2004). Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium Alcanivorax borkumensis. Environmental microbiology 6: 264–273.

Vomberg A, Klinner U (2000). Distribution of alkb genes within n-alkane-degrading bacteria. Journal of Applied Microbiology 89: 339-348.

Yateem A, Balba MT, Alshayji Y, Alawadhi, N (2002). Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria from oil-contaminated soil. Soil and Sediment Contamination 11: 41-55.

Cloning and gene expression of alkane hydroxylase gene from Pseudomonas putida

Hassanshahian M.[1*], Ravan H.[2]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Pseudomonas putida is a bacterium that has ability to growth on limited substrates that mainly is alkanes. The ability to use wide range of hydrocarbons is advantage of this bacterium to other bacteria community. P. putida have alkane hydroxylase system (alk-B) for alkane biodegradation. In this study alk-B gene from P. putida was amplified. Blunt cloning first done in pBluescript plasmid then sticky end cloning was carried out in pET-26 vector. For expression of this recombinant gene E. coli BL-21 bacterium were used. The activity of recombinant enzyme was done by reduction of absorbance by oxidation of NADPH. The results of this study show that alk-B gene was inserted in pBluescript plasmid. Colony PCR confirmed this insertion. This gene successfully cloned in pET-26a vector. By increasing the time after induction by IPTG expression of alk-B protein were increased. Recombinant protein has activity. Transfer of this gene to fast growth bacterium and wide substrate confirm production of robust biocatalysts in the future.

Key words: ***Alkanes, Biocatalyst, Biodegradation, Cloning, Protein Expression***.

[*] Corresponding Author. Hassanshahian.M Tel: 03433322067 Email: : hasanshahi@gmail.com