

تعیین توالی و کلونینگ ژن زایلناز باکتری *Anoxybacillus flavithermus* از چشمه آب گرم قینرجه، مشکین شهر

نعیمه مختاریپور^۱، محمودرضا آقامعالی^{۲*}، سید محسن اصغری^۲

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۹۴

تاریخ پذیرش: تیر ۹۴

چکیده

زایلنازهای مقاوم به گرما و قلیا آنزیم‌های صنعتی مهمی به شمار می‌روند. این آنزیم‌ها در صنایع غذایی (نانوایی و الکل‌سازی)، خمیر کاغذ و داروسازی کاربرد فراوانی دارند. زایلنازها قابلیت هیدرولیز زایلان (همی سلولز موجود در دیواره سلولی) را دارند و توسط گونه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و برخی جلبک‌ها تولید می‌شوند. در این مطالعه، ژن زایلناز از یک باکتری مقاوم به قلیا و گرما به نام *Anoxybacillus flavithermus* چشمه آب گرم قینرجه در مشکین شهر جداسازی و در باکتری *E. coli* سویه *BL21* کلون شد. در ابتدا، ژنوم باکتری استخراج و با انجام واکنش PCR، ژن زایلناز جداسازی و تکثیر و سپس از طریق الکتروفورز، تکثیر ژن زایلناز تأیید شد. کلونینگ با هضم آنزیمی ژن زایلناز و وکتور pET21a⁺ با استفاده از آنزیم‌های محدودگر *NheI* و *XhoI*، الحاق و انتقال وکتور نوترکیب به باکتری *E. coli* سویه *BL21* انجام شد. پرایمرهای تخصصی پیشرو و معکوس با سایت برش برای آنزیم‌های *XhoI* و *NheI* طراحی شد و ژن با روش PCR تکثیر و سپس جهت کلونینگ، ترانسفورم شد. در نهایت، نتیجه کلونینگ از طریق انجام Colony-PCR و تعیین توالی ژن کلون شده تأیید شد. نتایج حاصل از آنالیز توالی ژن کلون شده و Colony-PCR، حاکی از تشابه ژن مورد نظر با زایلنازهای سویه‌های مختلف *Anoxybacillus flavithermus* بود.

واژگان کلیدی: *Anoxybacillus flavithermus*، کلونینگ، PCR، زایلناز

۱- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

* نویسنده مسئول: aghamaali@guilan.ac.ir

مقدمه

فیلوژنی 16SrRNA بیشترین شباهت را با جنس *Anoxybacillus* دارند (Mandic-Mulec et al., 2015).

بر اساس اطلاعات به دست آمده از پایگاه داده CAZy^۱، گلیکوزید هیدرولازها یکی از ۴ گروه آنزیمی هیدرولیز کننده کربوهیدراتها هستند که از لحاظ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختار، نحوه عملکرد و ویژگی‌های سوبسترا از یکدیگر متمایز می‌شوند. اما در مواردی دیگر مانند ساختار سه بعدی (بین خانواده‌های ۵ و ۱۰) و مکانیسم جایگزینی دوگانه^۲ (بین خانواده‌های ۵، ۷، ۱۰ و ۱۱) با هم شباهت دارند (Naumoff, 2011). زایلنازها (EC3.2.1.8) از جمله آنزیم‌های خارج سلولی هستند که توسط جنس *Anoxybacillus* تولید می‌شوند و سوبسترای آن‌ها، پلیمر زایلان موجود در دیواره سلولی گیاهان است (Petersen, 2010) که متشکل از D-زایلوزهایی است که از طریق پیوند گلیکوزیدی بتا-۱ و ۴ به یکدیگر متصل هستند (Jia et al., 2014). از آن جایی که پلیمر زایلان ساختار پیچیده‌ای

جنس *Anoxybacillus* دارای ۲۲ گونه و ۲ زیرگونه است که به طور گسترده در چشمه‌های آب گرم یافت می‌شوند (Goh et al., 2013).

گونه‌های *Anoxybacillus* به طور عمده میله‌ای شکل بوده، به صورت دوتایی یا در زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند و توانایی تولید اندوسپور را دارند. به علاوه، این گونه‌ها نسبت به قلیا مقاوم بوده، ولی بیش‌تر آن‌ها در pH خنثی رشد می‌کنند و می‌توانند هوازی، هوازی اختیاری و بی‌هوازی اختیاری باشند. ژنوم *Anoxybacillus*ها نسبت به ژنوم سایر باسیلوس‌ها کوتاه‌تر است ولی ژن‌های محافظت کننده در برابر اشعه UV، دمای بالا و pHهای قلیایی و اسیدی در آن‌ها، دارای توالی کامل ژنی هستند (Mandic-Mulec et al., 2015). *A. flavithermus WK1* از سویه‌های ترموفیل بوده (محدوده دمای رشد ۵۵-۶۵ درجه سانتی‌گراد)، از بین گونه‌های جنس *Anoxybacillus* تنها گونه‌ای است که دارای توالی کامل ژنومی است (Wang et al., 2014). گونه‌های *Anoxybacillus* برخلاف سایر گونه‌های خانواده Bacillaceae، فاقد پلازمید هستند و *Geobacillus*ها بر اساس

1 Carbohydrate-Active enZymes Database
2 Double Displacement Mechanism

دارد، برای هیدرولیز آن تعداد زیادی آنزیم زایلناز از قبیل اندوزایلناز^۱، بتا-۱ و ۳- زایلناز^۲، آلفا-L- آرابینوفورانوزیداز^۳، آلفا-D- گلوکورونیداز^۴، استیل زایلان استراز^۵ و فرولیک اسید استراز^۶ مورد نیاز است (Juturu and Wu, 2014). از بین این آنزیم‌ها، زایلنازهای خانواده گلیکوزید هیدرولاز ۱۱^۷، زایلنازهایی حقیقی هستند که سوبسترای اختصاصی آن‌ها زایلان است. این آنزیم‌ها، ساختار کوچک و فشرده‌ای دارند (Collins et al., 2005). بر اساس شبیه‌سازی‌های انجام شده برای چند زایلناز باکتریایی، سعی شد تا تمام دنباله‌های محافظت شده در ساختار قرار گیرند و در نهایت یک ساختار با ۱۴ صفحه بتا و یک مارپیچ آلفا به دست آمد که در آن، ساختارهای دوم از طریق تعداد کمی دنباله (۵ عدد) به یکدیگر متصل شده بودند (Paes et al., 2012). در آنزیم‌های زایلناز، آمینواسید گلوتامات به عنوان دنباله کاتالیتیک در جایگاه فعال قرار داشته، طی عمل کاتالیزوری

جانشینی دوگانه، کونفیگوراسیون^۸ کربن آنومری حفظ می‌شود^۹ (Petersen et al., 2010). زایلنازها به ویژه انواع مقاوم به قلیا و دما در صنایع داروسازی و غذایی (نانوایی و الکل‌سازی) کاربرد گسترده‌ای دارند (Goswami and Rawat, 2015). در صنعت چوب و کاغذ برای سفید کردن خمیر کاغذ^{۱۰} از زایلنازها به عنوان سفید کننده‌های زیستی^{۱۱} به جای کلرین^{۱۲} استفاده می‌شود (Sanghi et al., 2009). تاکنون مطالعات زیادی پیرامون فعالیت آنزیمی، پایداری، کلونینگ، توالی آمینواسیدی و ساختار کریستالی زایلنازهای بسیاری از گونه‌ها انجام شده است (Motta et al., 2013) اما کلونینگ ژن زایلناز اولین بار در سال ۲۰۰۹ در *Anoxybacillus flavithermus* E2 انجام شد (Wang et al., 2010).

در این پژوهش نیز ژن زایلناز از باکتری *Anoxybacillus flavithermus* استخراج و کلون شد.

8 Configuration
9 Retaining catalysis
10 Pulp paper
11 Biobleaching
12 Chlorine

1 Endoxylanase
2 β -1,3-Xylanase
3 α -L-arabinofuranosidase
4 α -D-Glucuronidase
5 Acetylxylan esterase
6 Ferulic acid esterase
7 GH11

مواد و روش‌ها

پیش‌کشت منتقل و ۱۶ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (شیکر ۲۰۰ دور بر دقیقه) انکوبه شد. بعد از ۱۶ ساعت، ۵ دقیقه (۹۰۰۰ دور بر دقیقه) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد و به رسوب حاصل ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز (ساکارز ۶/۷ درصد، Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۵۰ میلی‌مولار و pH ۷)، ۵۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ۱۵۰ میکرولیتر بافر سدیم استات ۳ مولار با pH ۵/۲ اضافه شد و ۸۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۲ میکرولیتر محلول SDS ۲۰ درصد اضافه شد و سوسپانسیون ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و هر ۱۵ دقیقه یک‌بار میکروتیوب چرخانده شد. در مرحله بعد، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل (۱:۲۴:۲۵) اضافه شد، ۵ دقیقه به آرامی مخلوط و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور بر دقیقه) شد. سپس مایع رویی به میکروتیوب جدید منتقل شد. به اندازه ۰/۸ حجم مایع رویی به دست آمده از مرحله قبل، ایزوپروپانول سرد اضافه کرده، یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور بر دقیقه) شد و

آنزیم‌های *XhoI* و *NheI* از شرکت Thermo Scientific برای هضم آنزیمی، T4-DNALigase برای انجام الحاق^۲ از شرکت فرمنتاز^۳، پلازمید pET21a⁺ جهت کلونینگ و بیان از شرکت Master Mix PCR, Invitrogen، کیت استخراج پلازمید از شرکت سیناژن و مارکر وزن مولکولی DNA^۴ (SM0313) از شرکت فرمنتاز تهیه شد. باکتری *Anoxybacillus* نیز از چشمه آب گرم در مشکین‌شهر تهیه شد و برای کلون‌سازی از *E. coli* سویه *BL21* استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی

به منظور استخراج ژنوم، باکتری *Anoxybacillus flavithermus* در محیط کشت جامد حاوی عصاره مخمر ۰/۳ درصد، آگار ۲ درصد، پپتون سویا ۰/۵ درصد، سدیم کلرید ۰/۵ درصد با pH ۷ و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. تک کلونی از باکتری رشد کرده به ۱۰ میلی‌لیتر محیط

-
- 1 Digestion
 - 2 Ligation
 - 3 Fermentase
 - 4 DNA Ladder

محلول رویی دور ریخته شد. ۲ برابر حجم مایع رویی حاصل از مرحله قبل، به رسوب اتانول ۹۷ درصد سرد اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور بر دقیقه) و محلول رویی دور ریخته شد. بعد از تبخیر اتانول، به رسوب ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه سرد اضافه شد. برای اطمینان از صحت کار، محصول استخراج ژنوم بر روی ژل آگارز یک درصد مشاهده شد.

تکثیر و کلونینگ ژن کد کننده آنزیم زایلناز با استفاده از نرم افزار Gene Runner و بر اساس توالی ژن زایلناز باکتری *Anoxybacillus flavithermus* WK1 پرایمرهای پیشرو (Tm 65.6°C) و معکوس (Tm 64.1°C) به ترتیب، به شرح زیر طراحی شدند:

5' TGAGACGCTAGCATGGAACCTTGGGTACACATCC 3'
5' GAGCGCCTCGAGATCAAGTCCCTTCCTCCTA 3'

پس از انجام PCR، قطعه ژنی تکثیر یافته بر روی ژل آگارز قرار گرفت و سپس قطعه ژنی تعیین توالی شد. پس از اطمینان از صحت توالی، ژن زایلناز برای کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت.

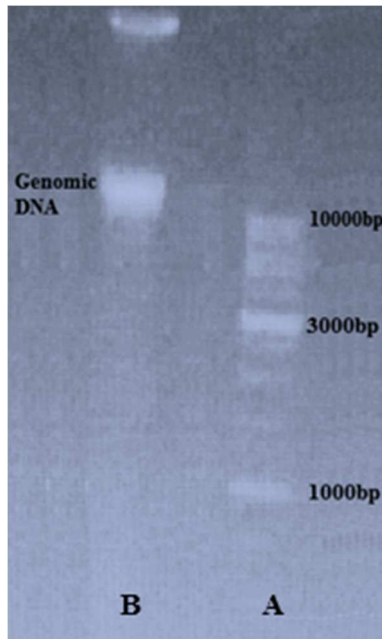
آنزیمی نسبت مولی ۲ به ۱ برای وکتور هضم شده و ژن زایلناز در نظر گرفته شد. محصول الحاق بلافاصله برای انجام ترانسفورم مورد استفاده قرار گرفت.

ترانسفورم شیمیایی وکتور نوترکیب در باکتری *E. coli*

انتقال وکتور نوترکیب به باکتری به روش شیمیایی انجام شد. ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش الحاق به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد افزوده شد. ویال مذکور ۴۵ دقیقه روی یخ و به منظور انجام شوک حرارتی ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بلافاصله ویال به روی یخ منتقل (۵

باکتری حامل وکتور، در محیط LB^۱ حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. پس از استخراج وکتور (با کیت شرکت سیناژن)، محصول PCR خالص‌سازی و به همراه pET21a⁺ مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. برای تأیید صحت برش، ژن و پلازمید هضم شده بر روی ژل آگارز بررسی و قطعات هضم شده از ژل استخراج شدند. برای انجام واکنش الحاق

¹ Luria Bertani



شکل ۱: باند حاصل از استخراج ژنوم از باکتری مورد مطالعه. A: مارکر وزن مولکولی DNA. B: DNA ژنومی استخراج شده از باکتری *Anoxybacillus*

به منظور تکثیر ژن، واکنش PCR با استفاده از ژنوم استخراج شده باکتری، انجام شد. برای تأیید تکثیر ژن، محصول PCR روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲B). از آنجایی که اندازه ژن زایلناز باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* ۱۰۸۰ جفت باز بود، ارزیابی قطعه تکثیر یافته نشان داد اندازه ژن مطابق با زایلناز مورد نظر است.

دقیقه) و پس از افزودن ۹۰۰ میکرولیتر از محیط LB فاقد آنتی‌بیوتیک، در ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیک (۲۰۰ دور بر دقیقه، ۲ ساعت) شد. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور بر دقیقه)، رسوب در ۵۰ میکرولیتر از محلول رویی حل و سپس به پلیت حاوی آمپی‌سیلین منتقل شد و پلیت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به منظور تأیید الحاق ژن درون وکتور و انتقال وکتور نوترکیب به باکتری، Colony-PCR انجام شد. پس از استخراج وکتور نوترکیب از کلونی‌های مثبت غربال شده توسط Colony-PCR، وجود ژن زایلناز در وکتور استخراج شده توسط PCR تأیید و سپس وکتور نوترکیب برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد.

نتایج

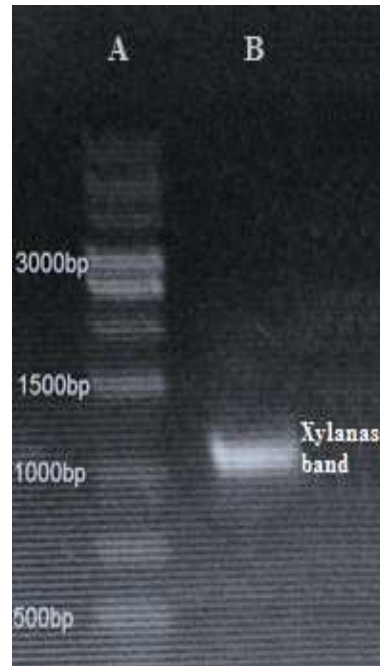
استخراج ژنوم و تکثیر ژن زایلناز

بر اساس توالی ژن زایلناز *Anoxybacillus flavithermus WK1* پرایمرهای تخصصی پیشرو و معکوس با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شدند. سپس ژنوم باکتری استخراج شد (شکل ۱). همان طور که مشاهده می‌شود ژنوم باکتری فاقد شکستگی است.

در *KU2-6(11)* و *SK3-4*، *DT3-1*، *WK1* سایت www.ebi.ac.uk/Tools/clustalo/ هم‌ردیف شد (شکل ۴). نتایج نشان می‌دهد آنزیم زایلناز مورد مطالعه، از نظر توالی آمینواسیدی شباهت بسیار زیادی (۹۲ تا ۹۶ درصد) با زایلناز سویه‌های بررسی شده دارد. این پروتئین‌ها در نقاط مشترکی با یکدیگر تفاوت دارند و این تفاوت‌ها بین دو یا سه آمینواسید است که در شکل ۴ آمینواسیدهای متفاوت با رنگ زرد نمایش داده شده‌اند.

توالی ژن و پروتئین حاصل در سایت [Blast](http://Blast.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)، blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

شد و بر این اساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی زایلناز به ترتیب شباهت ۹۶ و ۹۵ درصدی را با ژن و پروتئین زایلناز باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* نشان داد. بر اساس نتایج Blast فوق، درخت فیلوژنی آن بر اساس توالی‌های مشابه از طریق سایت www.phylogeny.fr رسم شد (شکل ۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود پروتئین مورد مطالعه با شباهت ۹۵ درصدی، با زایلناز باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* در یک کلاد خواهری قرار می‌گیرد.



شکل ۲: باند ژن زایلناز حاصل از PCR بر روی ژنوم باکتری مورد مطالعه. A: باندهای مارکر وزن مولکولی DNA. B: قطعه ژنی تکثیر یافته زایلناز.

به علاوه، به منظور تأیید نهایی، محصول PCR تعیین توالی شد. سپس در وب سایت [Expasy](http://Expasy.com) توالی نوکلئوتیدی به توالی آمینواسیدی ترجمه شد. توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی آنزیم زایلناز در شکل ۳ ارائه شده است.

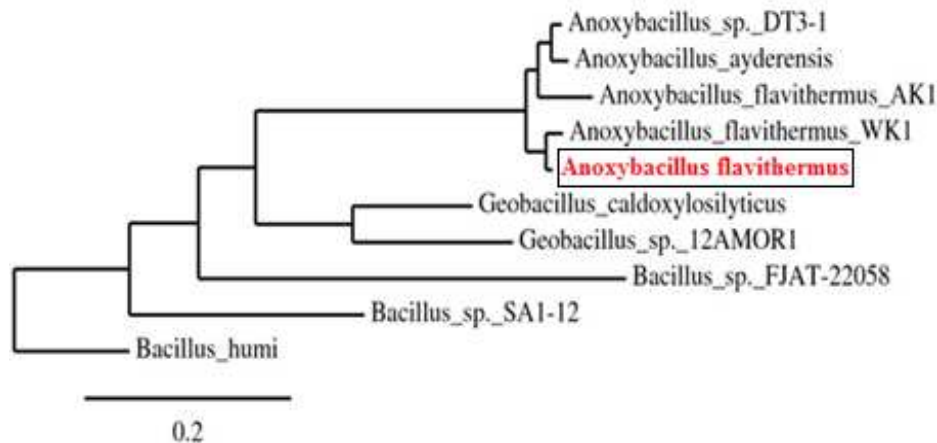
سپس توالی پروتئینی حاصل با پروتئین به دست آمده از ترجمه ژن زایلناز *Anoxybacillus flavithermus* سویه‌های

atgatcatatgtgtttcggctatcatcgtaaaaaacccatggacgaccacgtacatccat
 M I I C V S A I I V Q N P W T T T Y I H
 gagttacggcatatgactgtggcaaaaacaaagcgatccgctatacattcaaattatggag
 E L R H M T V A K Q S D P L Y I Q I M E
 cgggcaaaagcagtataacattcctgcgcaaaaatgcaaaaatagatgctgtatggaaagct
 R A K Q Y N I P A Q N A K I D A V W K A
 gttcctggatataatggactagtcgtagatggttgaggcatcatataagcaaatgaaacaa
 V P G Y N G L V V D V E A S Y K Q M K Q
 aatgggacatTTTTctgaacaacagcttTgtatataaaacaagtatcgccgtctattcattta
 N G T F S E Q Q L V Y K Q V S P S I H L
 tcagatttgctccatcaccatttatcggggacatccagacaaaaccgatgggtctctttt
 S D L P P S P I Y R G H P D K P M V S F
 ttaattaatggttgcatggggaagtgaacatatcccaaacatgttacatattcttgaaaa
 L I N V A W G S E H I P N M L H I L E K
 tacaacgtacgtgcaacgtTTTTTTtagaaggacgttgggtaaaagaacaccacaaacta
 Y N V R A T F F L E G R W V K E H P Q L
 gcgaaaatgattgcagatgctgggcatgaaattgggaatcattcatacaaccatccagat
 A K M I A D A G H E I G N H S Y N H P D
 atgaaaacgatgagtaaaacaagcgatccgtgaacaaatcgtaaaaacaaacgatgcaatc
 M K T M S K Q A I R E Q I V K T N D A I
 gagggcggaacaggaataaaaacctcgctatttgctccgcccagcggcagttatcgatgat
 E A A T G I K P R L F A P P S G S Y R D
 gatgctgtatacatcgccccatgagcttgggatgtacacgattttatggacggttgataca
 D V V Y I A H E L G M Y T I L W T V D T
 attgattggcaaaaaccatcgcttctgttatagtgggaacgagtaacaacaaaagtgcatt
 I D W Q K P S P S V I V E R V T T K V H
 aacggagcagatgattttaaTgcacccgactgtatcaacagtaaaagcgttacaaccgtta
 N G A M I L M H P T V S T V K A L Q P L
 attcaatcattacaaaaacaagaatacgtcattgacaatgtgtccacattattaagtgag
 I Q S L Q K Q E Y V I D N V S T L L S E
 gaaagaattgtaaaaagtaggaggaaggatatttccccggggggcccatataaaaaaggg
 E R I V K S R R K D I S P G G A I -

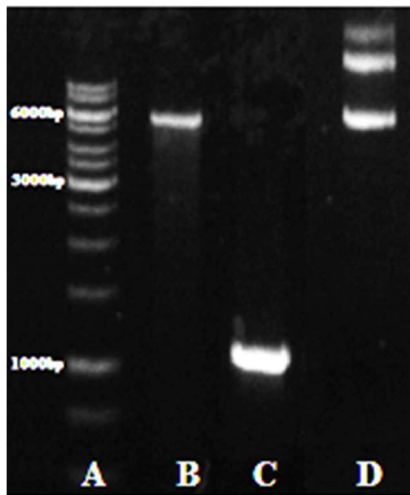
شکل ۳: توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی زایلناز

		1	10																																																									
DT3-1	-----	M	QRAFFLVMIIICMAAIIIVQNP																																																									
SK3-4	-----	M	RRALFLIIICMAAIIIVQNP																																																									
This study	-----	M	IICVSAIIIVQNP																																																									
Wk1	MEPWVHIPLASLLCVKFFVARSTLSLLHIPSLEKEGRSVRRAFFLTMIIICVAAMIVQNP																																																											
KU2-6 (11)	-----	M	RRAFFLTMIIICMAAIIIVQNP																																																									
		20	30	40	50	60	70																																																					
DT3-1	W	T	T	T	I	H	E	L	R	H	I	T	A	A	K	S	D	P	L	Y	I	Q	I	E	R	A	K	Q	Y	N	I	P	A	Q	N	A	K	V	D	R	V	W	K	A	I	P	G	Y	N	G	L	E	V	D	V	E	A			
SK3-4	W	T	T	T	I	H	E	L	R	H	I	T	A	A	K	S	D	P	L	Y	I	Q	I	E	R	A	K	Q	Y	N	I	P	A	Q	N	A	K	V	D	R	V	W	K	A	I	P	G	Y	N	G	L	E	V	D	V	E	A			
This study	W	T	T	T	I	H	E	L	R	H	M	T	V	A	K	S	D	P	L	Y	I	Q	I	E	R	A	K	Q	Y	N	I	P	A	Q	N	A	K	I	D	A	V	W	K	A	V	P	G	Y	N	G	L	V	D	V	E	A				
Wk1	W	T	T	T	I	H	E	L	R	H	M	T	V	A	K	S	D	P	L	Y	I	Q	I	E	R	A	K	Q	Y	N	I	P	A	Q	N	A	K	I	D	A	V	W	K	A	I	P	G	Y	N	G	L	V	D	V	E	A				
KU2-6 (11)	W	T	T	T	I	H	E	L	R	H	M	T	V	A	K	S	D	P	L	Y	I	Q	I	E	R	A	K	Q	Y	N	I	P	A	Q	N	A	K	I	D	R	V	W	K	A	I	P	G	Y	N	G	L	E	V	D	V	E	A			
		80	90	100	110	120	130																																																					
DT3-1	S	Y	K	M	K	R	N	G	T	F	S	E	Q	L	V	Y	K	Q	V	S	P	T	I	H	L	H	D	L	P	P	S	P	I	Y	R	G	H	P	D	K	P	M	V	S	F	L	I	N	V	A	W	G	S	E	H	I	P	N		
SK3-4	S	Y	K	M	K	R	N	G	T	F	S	E	Q	L	V	Y	K	Q	V	S	P	T	I	H	L	H	D	L	P	P	S	P	I	Y	R	G	H	P	D	K	P	M	V	S	F	L	I	N	V	A	W	G	S	E	H	I	P	N		
This study	S	Y	K	M	K	R	N	G	T	F	S	E	Q	L	V	Y	K	Q	V	S	P	S	I	H	L	S	D	L	P	P	S	P	I	Y	R	G	H	P	D	K	P	M	V	S	F	L	I	N	V	A	W	G	S	E	H	I	P	N		
Wk1	S	Y	K	M	K	R	N	G	T	F	S	E	Q	L	V	Y	K	Q	V	S	P	S	I	H	L	S	D	L	P	P	S	P	I	Y	R	G	H	P	D	K	P	M	V	S	F	L	I	N	V	A	W	G	S	E	H	I	P	N		
KU2-6 (11)	S	Y	K	M	K	R	N	G	T	F	S	E	Q	L	V	Y	K	Q	V	S	P	S	I	H	L	S	D	L	P	P	S	P	I	Y	R	G	H	P	D	K	P	M	V	S	F	L	I	N	V	A	W	G	S	E	H	I	P	N		
		140	150	160	170	180	190																																																					
DT3-1	M	L	H	I	L	E	K	Y	N	V	R	A	T	F	F	L	E	G	R	W	V	K	E	H	P	Q	L	A	K	M	I	A	D	A	G	H	E	I	G	N	H	S	Y	N	H	P	D	L	K	T	M	S	K	Q	A	I	R	E	Q	I
SK3-4	M	L	H	I	L	E	K	Y	N	V	R	A	T	F	F	L	E	G	R	W	V	K	E	H	P	Q	L	A	K	M	I	A	D	A	G	H	E	I	G	N	H	S	Y	N	H	P	D	L	K	T	M	S	K	Q	A	I	R	E	Q	I
This study	M	L	H	I	L	E	K	Y	N	V	R	A	T	F	F	L	E	G	R	W	V	K	E	H	P	Q	L	A	K	M	I	A	D	A	G	H	E	I	G	N	H	S	Y	N	H	P	D	M	K	T	M	S	K	Q	A	I	R	E	Q	I
Wk1	M	L	H	I	L	E	K	Y	N	V	R	A	T	F	F	L	E	G	R	W	V	K	E	H	P	Q	L	A	K	M	I	A	D	A	G	H	E	I	G	N	H	S	Y	N	H	P	D	M	K	T	M	S	K	Q	A	I	R	E	Q	I
KU2-6 (11)	M	L	H	I	L	E	K	Y	N	V	R	A	T	F	F	L	E	G	R	W	V	K	E	H	P	Q	L	A	K	M	I	A	D	A	G	H	E	I	G	N	H	S	Y	N	H	P	D	M	K	T	M	S	K	Q	A	I	R	E	Q	I
		200	210	220	230	240	250																																																					
DT3-1	V	K	T	N	D	A	I	E	A	A	T	G	K	P	R	L	F	A	P	P	S	G	S	Y	R	D	D	V	V	I	A	H	E	L	G	M	Y	T	I	L	W	T	V	D	T	I	D	W	Q	K	P	S	P	S	V	I	E			
SK3-4	V	K	T	N	D	A	I	E	A	A	T	G	K	P	R	L	F	A	P	P	S	G	S	Y	R	D	D	V	V	I	A	H	E	L	G	M	Y	T	I	L	W	T	V	D	T	I	D	W	Q	K	P	S	P	S	V	I	E			
This study	V	K	T	N	D	A	I	E	A	A	T	G	K	P	R	L	F	A	P	P	S	G	S	Y	R	D	D	V	V	I	A	H	E	L	G	M	Y	T	I	L	W	T	V	D	T	I	D	W	Q	K	P	S	P	S	V	I	E			
Wk1	V	K	T	N	D	A	I	E	A	A	T	G	K	P	R	L	F	A	P	P	S	G	S	Y	R	D	D	V	V	I	A	H	E	L	G	M	Y	T	I	L	W	T	V	D	T	I	D	W	Q	K	P	S	P	S	V	I	E			
KU2-6 (11)	V	K	T	N	D	A	I	E	A	A	T	G	K	P	R	L	F	A	P	P	S	G	S	Y	R	D	D	V	V	I	A	H	E	L	G	M	Y	T	I	L	W	T	V	D	T	I	D	W	Q	K	P	S	P	S	V	I	E			
		260	270	280	290	300	310																																																					
DT3-1	R	V	T	S	K	V	H	N	G	A	M	I	L	M	H	P	T	V	S	T	V	K	A	L	Q	P	L	I	Q	S	L	Q	K	E	Y	A	I	S	N	V	S	T	L	L	S	E	E	R	I	V	K	S	R	R	K	G	L	D		
SK3-4	R	V	T	S	K	V	H	N	G	A	M	I	L	M	H	P	T	V	S	T	V	K	A	L	Q	P	L	I	Q	S	L	Q	K	E	Y	A	I	S	N	V	S	T	L	L	S	E	E	R	I	V	K	S	R	R	K	G	L	D		
This study	R	V	T	S	K	V	H	N	G	A	M	I	L	M	H	P	T	V	S	T	V	K	A	L	Q	P	L	I	Q	S	L	Q	K	E	Y	V	I	D	N	V	S	T	L	L	S	E	E	R	I	V	K	S	R	R	K	D	I	S		
Wk1	R	V	T	S	K	V	H	N	G	A	M	I	L	M	H	P	T	V	S	T	V	K	A	L	Q	P	L	I	Q	S	L	Q	K	E	Y	V	I	D	N	V	S	T	L	L	S	E	E	R	I	V	K	S	R	R	K	G	L	D		
KU2-6 (11)	R	V	T	S	K	V	H	N	G	A	M	I	L	M	H	P	T	V	S	T	V	K	A	L	Q	P	L	I	Q	S	L	Q	K	E	Y	V	I	D	N	V	S	T	L	L	S	E	E	R	I	V	K	S	R	R	K	G	L	D		
		317																																																										
DT3-1	-----																																																											
SK3-4	-----																																																											
This study	GGAI																																																											
Wk1	-----																																																											
KU2-6 (11)	-----																																																											

شکل ۴: نتیجه هم ردیفی پروتئین حاصل از ترجمه ژن مورد مطالعه با ژن زایلناز *Anoxybacillus flavithermus* سویه‌های *DT3-1*، *SK3-4*، *Wk1*، *KU2-6(11)*، شماره‌گذاری آمینواسیدها بر اساس تعداد آمینواسیدهای پروتئین مورد مطالعه است و قسمت‌های زرد رنگ نشان دهنده آمینواسیدهای متفاوت بین زایلنازهای سویه‌های فوق است.



شکل ۵: درخت فیلوژنی بر اساس توالی پروتئین زایلناز. بر اساس توالی پروتئینی حاصل، باکتری مورد مطالعه با باکتری *Anoxybacillus flavithermus WK1* در یک کلااد خواهری قرار می‌گیرند.



شکل ۶: باندهای حاصل از هضم آنزیمی وکتور $pET21a^+$ و ژن زایلناز با آنزیم‌های *XhoI* و *NheI*. A: باندهای مارکر وزن مولکولی DNA. B: باند پلازمید هضم شده $pET21a^+$. C: باند محصول PCR هضم شده. D: باند پلازمید $pET21a^+$ قبل از هضم آنزیمی.

کلونینگ ژن زایلناز

پس از تأیید توالی نوکلئوتیدی، ژن زایلناز در وکتور بیانی $pET21a^+$ جاگذاری شد. بدین منظور ژن و وکتور تحت هضم آنزیمی با آنزیم‌های محدودگر *XhoI* و *NheI* قرار گرفتند و محصولات هضم شده، خالص شدند. سپس نمونه‌ها روی ژل آگارز بررسی شدند (شکل ۶). الگوی الکتروفورتیک پلازمید قبل و بعد از هضم آنزیمی، مؤید هضم و خطی شدن پلازمید است.

محصولات هضم آنزیمی در محل برش دارای انتهای چسبنده بود و الحاق بر اساس آن انجام شد. محصول الحاق بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷).

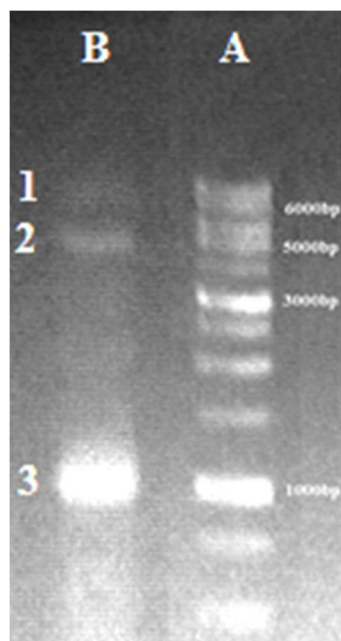
الحاق ژن درون پلازمید و انتقال پلازمید
نوترکیب درون میزبان باکتریایی، با روش
Colony-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. باند
به دست آمده از Colony-PCR نشان دهنده
حضور پلازمید نوترکیب در باکتری‌های رشد
یافته پس از ترانسفورم بود (شکل ۸).



شکل ۸: باند زایلناز به دست آمده از انجام PCR
بر روی کلونی‌های مثبت. A: مارکر وزن مولکولی
DNA. B: باند محصول Colony-PCR.

پلازمید باکتری‌های نوترکیب استخراج و
وجود ژن زایلناز در آن توسط PCR مورد
تأیید قرار گرفت. با توجه به این که برای انجام
PCR، از پرایمرهای اختصاصی ذکر شده

با توجه به این که ژن مورد بررسی ۱۰۸۰
جفت باز و پلازمید pET21a⁺ حدود ۵۴۴۳
جفت باز داشتند، وکتور نوترکیب در محدوده
وزن مولکولی ۶۵۰۰ بازی مشاهده شد (شکل
۱-BV). باندهای مربوط به پلازمید جاگذاری
نشده (شکل ۲-BV) و ژن زایلناز (شکل ۳-BV)
نیز دیده شدند.

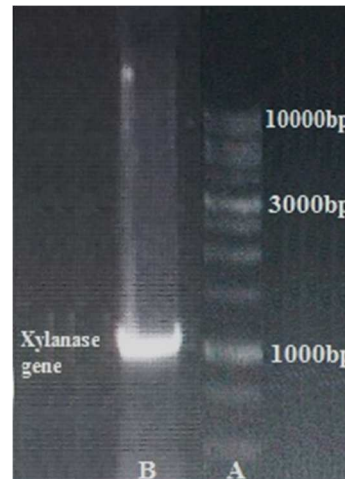


شکل ۷: نتیجه جاگذاری ژن زایلناز در وکتور. A:
مارکر وزن مولکولی DNA. B: باندهای مربوط به
(۱) پلازمید جاگذاری شده، (۲) پلازمید هضم شده
و (۳) قطعه ژنی کد کننده آنزیم زایلناز

kestanbolensis ژن *AC26sari* یک آلفا-L-آرابینوفورانوزیداز را کد می‌کند (Canakci et al., 2008). این آنزیم یک آگرو زایلناز است و می‌تواند آرابینان، آرابینوبیوز، آرابینوزایلان و آرابینوگالاکتان را هیدرولیز کند (Numan and Bhosle, 2006).

در این مطالعه ژن زایلناز یک باکتری ترموفیل است که از چشمه آب گرم قینرجه در مشکین‌شهر تهیه شده بود، با استفاده از پرایمرهای تخصصی، تکثیر و تعیین توالی شد. طبق نتایج به دست آمده از خوانش رشته‌های پیشرو و معکوس، توالی نوکلئوتیدی ژن مورد مطالعه از نظر اندازه و تعداد جفت باز، مشابه ژن زایلناز *A. flavithermus WK1* بود و توالی پروتئینی حاصل از ترجمه آن با تشابه ۹۵ درصدی فقط در ۱۰ آمینواسید با زایلناز *A. flavithermus WK1* تفاوت داشت. این آمینواسیدها در موقعیت‌های ۵۲، ۵۵، ۸۶، ۱۰۸، ۱۲۷، ۱۴۵، ۱۹۴، ۲۸۴، ۳۷۴ و ۳۴۹ قرار داشتند. در بیش‌تر موقعیت‌های نام برده شده، آمینواسیدهایی مشابه و هم‌خانواده، جایگزین یکدیگر شده بودند برای مثال والین پنجمین آمینواسید در پروتئین مورد مطالعه است و در زایلناز سویه‌های *DT3-1*، *KU2-6(11)* و *SK3-4* آمینواسید متیونین در همین

استفاده شد و پس از PCR، باند حاصل مقابل باند ۱۰۰۰ جفت بازی مارکر DNA قرار داشت می‌توان نتیجه گرفت ژن مورد مطالعه به وکتور منتقل شده است (شکل ۹).



شکل ۹: ژن زایلناز پس از انجام PCR بر روی وکتور نو ترکیب. A: مارکر وزن مولکولی DNA. B: محصول PCR.

بحث

میکروارگانیسیم‌های زیادی وجود دارند که قادر به تولید زایلنازهای مقاوم به گرما هستند اما تاکنون کلونینگ ژن زایلناز تنها در تعداد کمی از گونه‌های جنس *Anoxybacillus* مانند گونه *Anoxybacillus sp. PDF1* و *Anoxybacillus kestanbolensis* انجام شده است. در باکتری *A.*

موقعیت قرار می‌گیرد. با توجه به این که والین و متیونین هر دو آمینواسیدی غیرقطبی و هم‌خانواده هستند، بنابراین تغییر فاحشی در ساختار پروتئین‌های مذبور ایجاد نمی‌کنند. مثال دیگر مربوط به سرین موقعیت ۱۰۲ است که در زایلناز سویه‌های *SK3-4* و *DT3-1* یک هیستیدین جایگزین آن شده است. در اینجا نیز ویژگی قطبی بودن بین سرین و هیستیدین مشابه است. به این ترتیب مشاهده می‌شود که زایلناز سویه‌های فوق در ساختار اول خود و فقط در تعداد کمی از آمینواسیدها با یکدیگر تفاوت دارند و در بیش‌تر موارد این جایگزینی‌ها بین آمینواسیدهای مشابه رخ داده است که این مسأله، تأیید کننده ساختار مشابه این آنزیم‌ها است.

تشکر و قدردانی

پس از تعیین توالی، درخت فیلوژنی بر اساس توالی آمینواسیدی زایلناز مورد مطالعه در سایت www.phylogeny.fr رسم شد. با توجه به درخت فیلوژنی، بیش‌ترین شباهت با باکتری *A. flavithermus WK1* مشاهده شد به این صورت که ژن زایلناز حاصل از باکتری مورد مطالعه با ژن زایلناز باکتری

موقعیت قرار می‌گیرند. یک کلاد خواهری قرار می‌گیرند. قبل از این نیز بر اساس مطالعه *۱۶SrRNA* به دست آمده از این باکتری، شباهتی ۹۳ درصدی با باکتری *A. flavithermus WK1* مشاهده شد اما بیش‌ترین شباهت باکتری مذکور با گونه *Anoxybacillus sp. A371* بود (کاظمی و همکاران، ۱۳۹۳). بنابراین با توجه به یافته‌های فوق می‌توان گفت که باکتری مورد مطالعه که از گونه‌های جنس *Anoxybacillus* است، دارای ژن کد کننده آنزیم زایلنازی است که به زایلنازهای جنس *Anoxybacillus* شباهت فراوانی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دارد.

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به دلیل حمایت‌های مالی و فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و از جناب آقای مهندس رسا برای تهیه نمونه باکتری استفاده شده در این پروژه مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع

- گرفته شده از چشمه آب گرم قینرجه، مشکین شهر. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۲(۲): ۱۷-۲۹.
- Canakci S., Kacagan M., Inan K., Belduz A.O. and Saha B.C. 2008.** Cloning, purification and characterization of a thermostable alpha-L-arabinofuranosidase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(1): 61-68.
- Collins T., Gerday C. and Feller G. 2005.** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *Federation of European Microbiological Societies Directs*, 29(1): 3-23.
- Goh K.M., Kahar U.M., Chai Y.Y., Chong C.S., Chai K.P., Ranjani V., Ilias R., Chan K.G. 2013.** Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(4): 1475-1488.
- Goswamiand G.K. and Rawat S. 2015.** Microbial xylanases and their biomedical applications: A review. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 3(6): 436-450.
- Jia X., Mi S., Wang J., Qiao W., Peng X. and Han Y. 2014.** Insight into glycoside hydrolases for debranched xylan degradation from extremely thermophilic bacterium *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*. *The Public Library of Science*, 9(9): 1-12 (e106482).
- کاظمی م.، آقامعالی م.ر. و اصغری س.م. ۱۳۹۳.** تعیین خصوصیت بیوشیمیایی آلفا آمیلاز باکتری *Anoxybacillus flavithermus*
- Juturu V. and Wu J.C. 2014.** Microbial exo-xylanases: A mini review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1): 81-92.
- Mandic-Mulec I., Stefanic P. and Van Elsas J.D. 2015.** Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum*, 3(2): 1-24 (TBS-0017).
- Motta F.L., Andrade C.C.P. and Santana M.H.A. 2013.** A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications. *Licensee in Techniques*. 275P.
- Naumoff D.G. 2011.** Hierarchical classification of glycoside hydrolases. *Biochemistry (Moscow)*, 76(6): 622-635.
- Numan M.T. and Bhosle N.B. 2006.** α -L-Arabinofuranosidases: The potential applications in biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(4): 247-260.

- Paes G., Berrin J. and Beaugrand J. 2012.** GH11 xylanases: Structure/ function/ properties relationships and applications. *Biotechnology Advances*, 30(3): 564–592.
- Petersen L. 2010.** **Catalytic strategies of glycoside hydrolases.** Ph.D. Thesis, Iowa State University, Ames, Iowa, U.S. 155P.
- Sanghi A., Garg N., Kuhar K., Kuhad R.C. and Gupta V.K. 2009.** Cellulase-free xylanase for kraft. *BioResources*, 4(3): 1109–1129.
- Wang J., Bai Y. and Yang P. 2010.** A new xylanase from thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 917–924.
- Wang Y., Zheng Y., Wang M., Gao Y., Xiao Y. and Peng H. 2014.** Non-contiguous finished genome sequence of *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* type strain (E13), a strictly thermophilic and organic solvent-tolerant bacterium. *Stand Genomic Sciences*, 9(3): 735–743.



Cloning and sequencing of xylanase of *Anoxybacillus flavithermus* from Qinarjeh, Meshkin-Shahr, Iran

Naimeh Mokhtarpour¹, Mahmoudreza Aghamaali^{2*}, Seyed Mohsen Asghari²

Received: May 2015

Accepted: July 2015

Abstract

The thermostable and alkaliphile xylanases are beneficial industrial enzymes in food industry (bakery and alcohol production or fermentation industries) pulp-kraft, and pharmaceutical industry. Xylanases hydrolyse xylan (the hemicellulose of plant cell wall) and produced by different kinds of microorganisms like bacteria, fungi and some algae. In this study, xylanase gene from thermoalkaline *Anoxybacillus flavithermus* was isolated from hot spring of Meshkinshahr (Iran) and was cloned in *E. coli* (*BL21*). At first, total DNA was extracted from bacteria. PCR was then accomplished and xylanase gene was isolated and amplified. Amplification of xylanase coding gene was confirmed by electrophoresis. Cloning was performed by digestion of xylanase gene and pET21a⁺ by restriction enzymes (*NheI* and *XhoI*), following by ligation and transformation to *E. coli* (*BL21*). Finally, the results were confirmed by colony-PCR and sequencing of selected colonies. PCR and sequencing results, demonstrated a high similarity between xylanases of *Anoxybacillus* species with xylanase of this study.

Key words: *Anoxybacillus flavithermus*, Cloning, PCR, Xylanase.

1- M.Sc. Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

*Corresponding Author: aghamaali@guilan.ac.ir