



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

مهدی حسن شاهیان<sup>۱\*</sup>، هادی روان<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

<sup>۲</sup> استادیار بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۰۴

### چکیده

*Pseudomonas putida* یک باکتری هتروتروف بوده که قابلیت رشد روی طیف وسیعی از سوبستراها که عمده آن‌ها آلکان‌ها هستند، دارا می‌باشد. توانایی تجزیه طیف وسیعی از هیدروکربن‌ها، نشان‌دهنده برتری این ارگانیسم نسبت به اعضای دیگر جامعه میکروبی تجزیه‌کننده نفت می‌باشد. 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* می‌باشد. 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 اسپکتروسکوپی 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 می‌باشد. انتقال این ژن به باکتری سریع‌الرشد و سوبسترای غذایی وسیع می‌تواند نوید بخش تولید بیوکاتالیزوری با کارایی برتر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلکان‌ها، بیوکاتالیز، بیان پروتئین، تجزیه زیستی، کلونینگ.

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 راه‌ها برای این محدودیت‌ها انتقال ژن‌های تجزیه کننده آلکان‌ها از این باکتری به باکتری‌های سریع‌الرشد است (Hassanshahian et al., 2012a; Hassanshahian et al., 2012b).

آلکان هیدروکسیلاز بزرگترین بالا خانواده آنزیم‌های حاوی هم است و توالی ژنی آن در ارگانسیم‌های متعددی، از قبیل پستانداران، گیاهان آلی، جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها شناسایی شده است. در پژوهشی Vanbeilen et al. (2006) با طراحی یک وکتور پلی‌سیسترونی ژن *alk-B* را با

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، کم‌خطرترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها برای حذف آلودگی‌های نفتی و هیدروکربنی می‌باشند. تاکنون باکتری‌های گوناگونی برای این هدف استفاده شده‌اند، ولی باکتری *P. putida* نه تنها هیدروکربن‌های نفتی را در شرایط آزمایشگاهی تجزیه می‌کند، 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 عمدتاً 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

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 5'-alk-F GAG ACA AAT CGT CTA AAA CGT AA-alk-R: TTG TTA TTA TTC CAA CTA و 3'-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 ۲۵ µl عبارت بود از: 1.5 µl dNTP (10 µM)، 2.5 µl Buffer pfu DNA poly (20 mM)، 1 µl Primer alk-F (5 mM)، 1 µl MgCl<sub>2</sub> (10 mM)، 0.5 µl Primer alk-R (10 PMol)، 1 µl Template- DNA (1 unit) pfu polymerase و 16.5 µl H<sub>2</sub>O (20 ng) با ۳۰ سیکل بصورت زیر بود: دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۴ 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 فرمتاس، کره جنوبی K0513) طبق دستورالعمل همراه باکیت بکار رفت (Sambrook & Russel, 2001).

ژن فرودوکسین و فرودوکسین روداکناز 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 پروتئین آلکان هیدروکسیلاز (alk-B) برای کلیه مطالعات به کار گرفته شد. سویه DH5α باکتری *E. coli* به عنوان میزبان در مراحل همسانه 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

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 DH5 $\alpha$  E.coli استخراج گردید. یک واکنش هضم دو آنزیمی برای هر دو پلاسمید گذاشته شد. در واکنش هضم دو آنزیمی از آنزیم-های محدودالایتر 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 pBluscript 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 ۲-۳ انجام شد.

#### همسانه سازی ژن alk-B داخل پلاسمید pBluscript

پلاسمید pBluscript با استفاده از کیت Metabion طبق دستورالعمل کیت از میزبان باکتریایی (DH5 $\alpha$ ) استخراج شد. واکنش هضم تک آنزیمی توسط آنزیم EcoRV برای خطی کردن پلاسمید pBluscript به کار رفت. واکنش اتصال<sup>۱</sup> جهت وارد نمودن ژن alk-B درون پلاسمید pBluscript انجام شد. روش کار بدین صورت بود که در حجم واکنش 25  $\mu$ l میزان 0.4 $\mu$ g از ژن alk-B با 0.2 $\mu$ g از پلاسمید همراه با 1Unit از آنزیم T4 DNA ligase و بافر آن به مدت یک شب در دمای ۱۶ درجه گرمخانه گذاری<sup>۲</sup> گردید. سلول‌های مستعد جهت پذیرش DNA پلاسمیدی خارجی طبق دستورالعمل (Sambrook and Russel, 2001) تهیه شد. با استفاده از روش شوک حرارتی پلاسمید به سلول‌های مستعد منتقل گردید و واکنش تبدیل<sup>۳</sup> صورت گرفت. به منظور غربالگری، میزان 50  $\mu$ l از باکتری‌های DH5 $\alpha$  E. coli ترانسفورم شده (مخلوط باکتری‌های نو ترکیب و باکتری‌های حاوی پلاسمید pBluscript) در محیط کشت LB حاوی IPTG، X-gal و آنتی بیوتیک Amp پخش شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. برای اطمینان از این که کلنی‌های سفید حاصل واجد پلاسمید نو ترکیب

1. Ligation
2. Incubation
3. Transformation

## بیان ژن alk-B

باکتری E.coli BL-21 بعنوان میزبان بیان کننده پروتئین نو ترکیب 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<sup>۱</sup> جهت تبدیل کردن باکتری BL-21 و انتقال پلاسمید pET-26 نو ترکیب بکار رفت. انتخاب کلنی‌های نو ترکیب BL-21 در محیط حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین انجام شد. پس از ظاهر شدن کلنی‌ها روی محیط انتخابی، کلنی PCR جهت تأیید صحت همسانه سازی با پرایمرهای اختصاصی ژن alk-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°C در انکوباتور شیکردار بطور شبانه گرماگذاری گردید. برای القاء جهت بیان پروتئین، IPTG<sup>۲</sup> به غلظت نهایی ۰.۵-۱ میلی مولار به آن اضافه شد. رشد باکتری‌ها به مدت ۵-۴ 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 ۲۰°C قرار گرفت. برای

تفکیک و تعیین جرم مولکولی پروتئین‌ها از الکتروفورز عمودی و ژل SDS-PAGE<sup>۳</sup> استفاده شد (Sambrook & Russel, 2001).

## سنجش فعالیت آنزیم نو ترکیب Alk-B

### کشت باکتری و القای تولید آنزیم

باکتری E.coli BL-21 که دارای پلاسمید pET-26 نو ترکیب 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. زمانی که جذب نوری آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۳ رسید، به محیط IPTG با غلظت نهایی ۱ میلی مولار افزوده شد و در دمای ۳۷°C 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 ۴۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه رسوب یافتند. بیوماس باکتری حاصله به مدت ۴ ساعت در معرض هگزادکان قرار گرفت تا فعالیت آنزیم Alk-B تحریک گردد. سپس سلول‌های باکتریایی با اولتراسونیک شکسته شدند. لاشه باکتری‌ها و همچنین باکتری‌های شکسته نشده با سانتریفوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه رسوب یافتند. عصاره

2. Sodium dodecyl sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis<sup>۳</sup>

1 . Ligation

2 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

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 پلاسمید pBluescript 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 نو ترکیب توسط PCR

برای تایید وجود ژن alk-B در کلونی‌های نو ترکیب (کلنی سفید) از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. DNA پلاسمیدی استخراج شده از تعدادی از کلونی های نو ترکیب 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 حالی که کلنی آبی فاقد این ژن است (شکل ۳).

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)

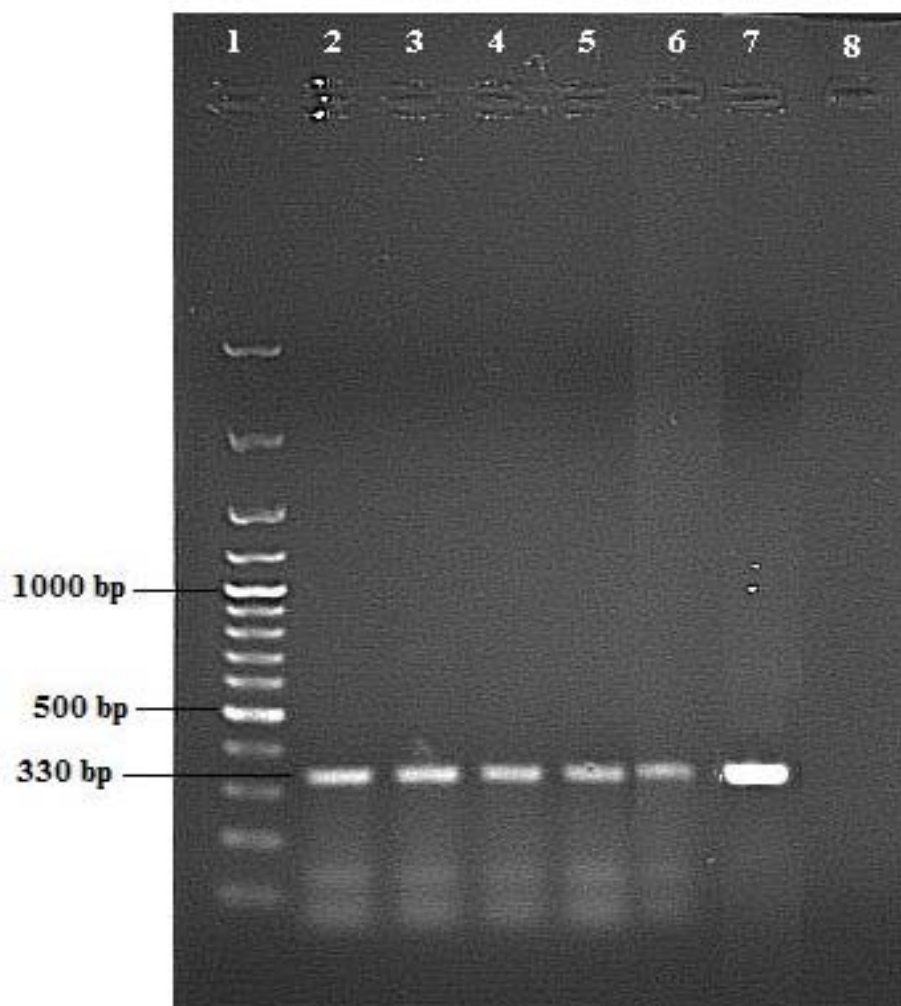
### روش سنجش آنزیم الکان هیدروکسیلاز (Alk-B)

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  $\mu$ l)، محلول NADPH (۳۰۰  $\mu$ l)، عصاره سلولی (۱۰۰  $\mu$ l)، تریس ۵۰ میلی مولار (۵۹۰  $\mu$ l). مخلوط شاهد حاوی همه مواد ذکر شده بود فقط عصاره سلولی به آن اضافه نگردید. جذب مخلوط واکنش را در ۳۴۰ نانومتر دو دقیقه قبل از اضافه کردن اکتان و ۳ دقیقه بعد از اضافه کردن اکتان در مقابل شاهد اندازه گیری می‌شود. کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر نشانگر فعالیت آنزیمی است. یک واحد آنزیمی از فعالیت الکان 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 پلیمرز واکنش PCR انجام

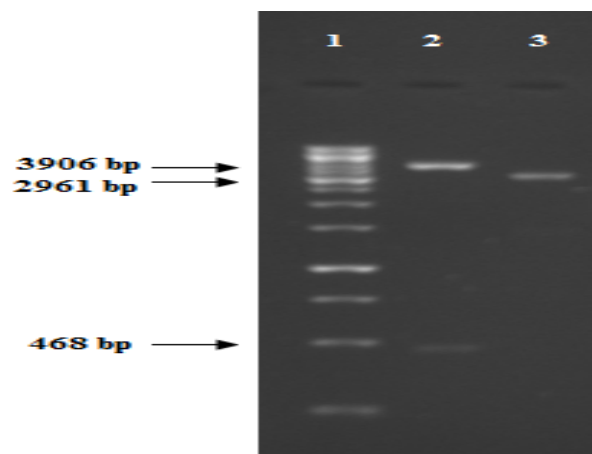


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *alk-B* با استفاده از پرایمرهای *alk-F* و *alk-R* بر روی ژل آگارز یک درصد، چاهک (۱) مارکر (100 bp)، چاهک (۲-۷) محصول PCR و چاهک (۸): کنترل منفی

**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.**

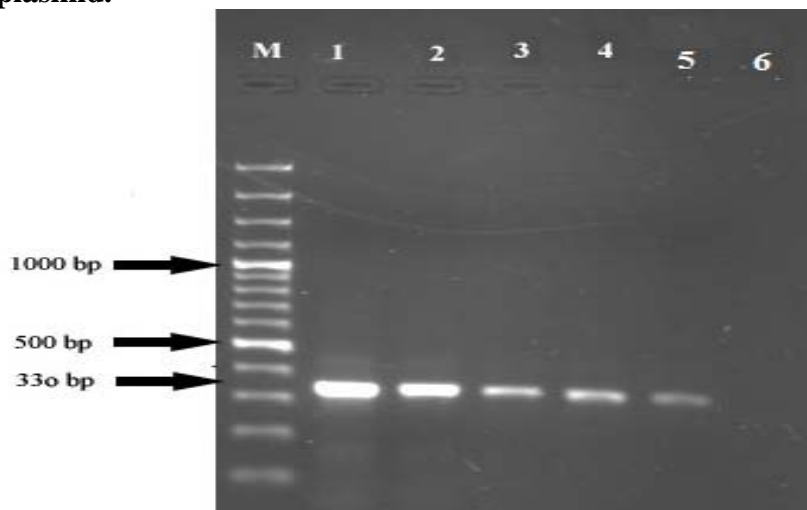
وکتور بیانی صورت گرفت. نتیجه حاصله از این انتقال در شکل ۴ نشان داده شده است.

انتقال ژن *alk-B* به پلاسمید pET-26a  
با توجه به این که در این تحقیق هدف بیان  
ژن همسانی شده نیز بود، لذا انتقال ژن به یک



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

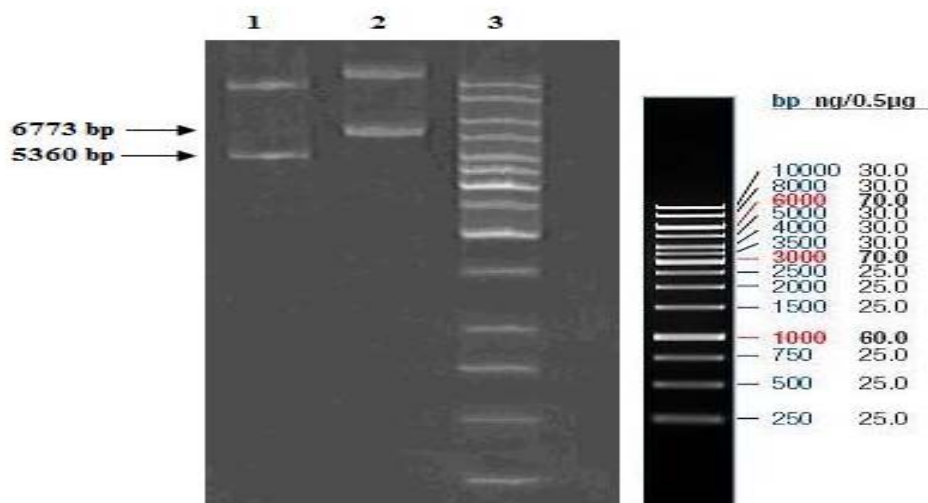
**Figure 2- Gel electrophoresis of extracted recombinant plasmid: Lane (1) 1kb ladder, lane (2): white colony contain recombinant pBlu-alk-B plasmid, lane (3): Blue colony contain only pBluescript plasmid.**



شکل ۳- تایید وجود ژن alk-B در کلنی های نو ترکیب. چاهک (M): مارکر 100 bp چاهک (۱-۵): کلنی ها سفید و چاهک (۶): 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.**





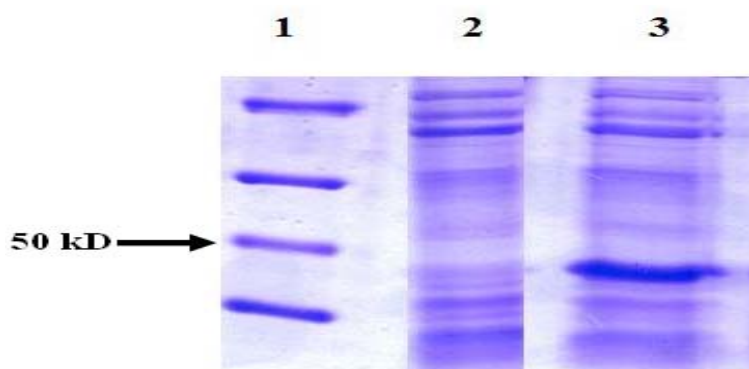
شکل ۴- الکتروفورز DNA پلاسمیدی: چاهک (۱): پلاسمید pET-26a بعنوان کنترل منفی، چاهک (۲): pET-26-alk-B استخراج شده، چاهک (۳): مارکر 1Kb

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

#### سنجش فعالیت آنزیمی پروتئین نوترکیب آلکان هیدروکسیلاز

اصول بررسی تعیین فعالیت آنزیم آلکان هیدروکسیلاز بر پایه کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر بود. نتایج حاصله از سنجش فعالیت آنزیمی الکان هیدروکسیلاز در شکل ۶ آمده است. این نتایج نشان دهنده این می باشد که آنزیم نوترکیب حاصله دارای فعالیت مناسب آنزیمی است. پیک ۳۴۰ نانومتر مربوط به اتصال سوبسترا به آنزیم فعال است، که آنزیم نوترکیب در مقایسه با شاهد کاهش قابل ملاحظه ای در این ناحیه دارد.

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود این انتقال موفقیت آمیز بوده است، بطوری که 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 می باشد (شکل ۵).



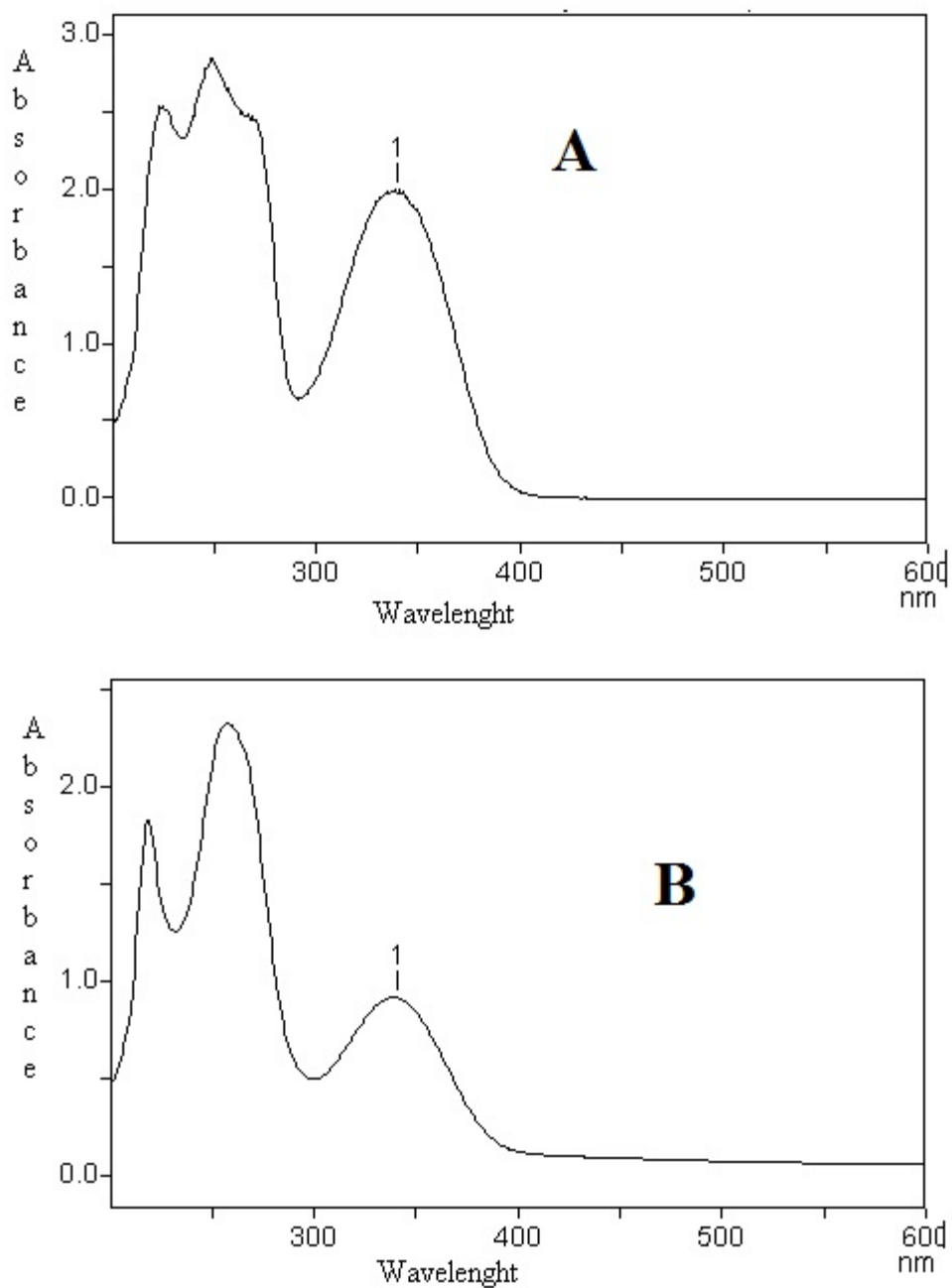
شکل ۵- الکتروفورز عصاره باکتری حاوی پلاسمید نو ترکیب pET-26-alk-B و پلاسمید pET-26a توسط ژل SDS-PAGE ۱۵ درصد. چاهک ( ۱): مارکر وزن مولکولی پروتئین. چاهک ( ۲): عصاره باکتری حاوی پلاسمید pET-26a چاهک (۳) باکتری های حاوی پلاسمید نو ترکیب pET-26-alk-B بعد از القا با IPTG

**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**

رسیدند که این باکتری دارای ژن های متعددی برای تجزیه آلکان ها می باشد و همچنین سیستم ژنتیکی آن دارای ژن هایی برای تشکیل بیوفیلم در فاز آبی- نفتی، تولید بیوسورفکتانت، پاسخ به استرس ها و جذب عناصر کمیاب است. تا کنون دو گزارش از همسانه سازی ژن های تجزیه کننده هیدروکربن ها وجود دارد. در پژوهشی ژن alk-B1 از *P. putida* در *E. coli* همسانه سازی شد ( *Smits et al.*, 2002). آنها با تعیین توالی ژن کلون شده و مقایسه توالی با ژن های alk-B موجود از سایر باکتری ها به این نتیجه رسیدند که ژن alk-B1 باکتری *P. putida* مشابه ژن alk-B باکتری *P. oleovorans* GPO1 می باشد.

### بحث و نتیجه گیری

ویژگی مشخصه باکتری *P. putida* توانایی رشد بر روی آلکان ها 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 سیستم های چندتایی جهت کاتابولیسم هیدروکربن ها است. یکی از مهمترین این سیستم ها آلکان هیدروکسیلاز است. پروفایل پروتئولیتیک پیشنهاد کرده است که سیستم Alk-B نقش مهمی در کاتابولیسم هیدروکربن های اشباع دارد ( *Vanbeilen et al.*, 2003). در پژوهشی *Sei et al.* (2003) توالی ژنوم باکتری *P. putida* را به طور کامل گزارش کردند. آنها به این نتیجه



شکل ۶- کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر توسط آنزیم الکان هیدروکسیلاز نو ترکیب (A) شاهد فاقد عصاره سلولی (B) آنزیم نو ترکیب

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

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 ۳۴۰ نانومتر بهترین روش می باشد. 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 می باشد. پژوهشگران دیگر ژن *alk-B* از *C. albicans* را در *E. coli* کلون، بیان و خالص سازی نمودند و از کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده کردند (Vanbeilen and Klinner, 2003). میزان فعالیت و تفاوت جذب به دست 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 الکان هیدروکسیلاز تغییر کرده باشد. (۲) ممکن است سلول ها بخوبی شکسته نشده باشند. در پایان پیشنهاد می شود که از این باکتری نو ترکیب جهت طراحی ساخت بیوکاتالیزور جهت هیدروکسیله کردن الکانها و تبدیل آنها به الکل استفاده گردد.

پژوهشگران ژنهای *alk-B1* و *alk-B2* باکتری *P. putida* را در *E. coli* همسانه سازی نمودند و متعاقباً 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 موتانت هایی 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 الکان های با زنجیره متوسط در این باکتری عمدتاً بوسیله سیستم های آنزیمی به جز *Alk-B1* و *Alk-B2* هیدروکسیله می شوند. آنها الکان 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 نو ترکیب بیان گردید. با مراجعه به منابع تاکنون هیچ گزارشی از همسانه سازی ژن *alk-B* باکتری *P. 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 چایمیریک همراه با ژنهای بدست آمده از منابع محیطی استفاده کردند. در این تحقیق سنجش فعالیت آنزیمی پروتئین نو ترکیب *Alk-B* بر اساس کاهش جذب در ۳۴۰ نانومتر سنجش

- 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.<sup>1\*</sup>, Ravan H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

<sup>2</sup> 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

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500