Journal of Cell and Tissue 15(3), Autumn(2024) 203-214

Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Cloning and expression of xylonate dehydratase from *Caulobacter vibrioides*

Martami F[a], Dehghan esmatabadi MJ[b*], Deldar AA [b], Mohammadi R [b], Pourmahdi N[a], Bozorgmehr F[a]

[a] M.Sc. Faculty of Passive Defence, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

[b] PhD, Faculty of Passive Defence, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Hasani S, Sadat Shandiz SA, Pakpour B. Cytotoxicity and Apoptotic Effects of Selenium Nanoparticles Toward HT29 Colon Cancer Cells. Journal of Cell and Tissue . 2024; 15(3):203.

https://10.61186/JCT.15.3.203.

KEYWORDS

D-xylose
Xylonate
Butanetriol
dehydratase
Escherichia coli

ABSTRACT

Aim: Lignocellulosic biomass such as agricultural wastes (corn stover, sugar beet pulp and citrus peel) is a widely abundant and attractive source for the production of biofuels and chemicals. biofuels are sources of clean and renewable energy that are considered as a potential substitute for non-renewable oil fuels. various methods and processes have been tested by scientists and researchers in this field and the most favorable conditions for producing biofuels from biomass. however, this biomass has not been fully exploited in many parts of the world for biofuel production, especially in developing countries, and there is little relation with crop residues and forest and waste in this area. so much work is still needed to replace fossil fuels with biofuels from biomass. lignocellulosic waste biomass such as cassava peels, sugar beet pulp, and Ulva lactuca are suitable materials for bioethanol synthesis.

D-xylose, is the second most abundant sugar in lignocellulosic hydrolysates. Nowadays, considerable efforts have been made to expand microbial cell factories to use D-xylose for the production of value-added chemicals. D-1,2,4-butanetriol (BT) is an extremely important intermediate chemical, is widely used in many fields, such as pharmaceuticals, paper, polymer materials, and military applications.A molecule 1,2,4-butanteriol (BT) is a polyol with unique chemical properties, which has a stereocenter and can be divided into D-BT (the S-enantiomer) and L-BT(the R-enantiomer). BT is widely used in the military industry, medicine, tobacco, polymer. A synthetic pathway involving four enzymes—D-xylose dehydrogenase (XDH), D-xylonate dehydratase (XD), 2-keto acid decarboxylase (KDC), and aldehyde reductase (ALR)—has been proposed and implemented to produce BT from D-xylose, highlighting its significant role in bioproduction. And because in most studies, the xylonate dehydratase was used in the case of *Caulobacter.crescentus*, and given the very high genetic similarity between *Caulobacter.crescentus* and *Caulobacter.vibrioides*, the aim of this study is to clone and express xylonate dehydratase gene of *C.vibrioides* in the *E.coli*. For this purpose, the research was carried out with the aforementioned methods.

Material and methods: The xylonate dehydratase gene was retrieved from the NCBI database and amplified using PCR with specific primers after extracting the C. vibrioides genome. The piece of the gene was cloned in the pET28 expression vector and then transferred to the *E.coli* prepared cells using chemical methods. After the induction of the cells, recombinant protein expression was examined using SDS-PAGE. **Results:** By using restriction enzymes, Colony PCR and sequencing, the cloning process and the entry of the gene into the pET28 expression vector was confirmed. The

* Corresponding author: Tel.: 021-22974603; Fax: 02122974603
E-mail address: mohammad.dehghan@modares.ac.i
DOI: https://10.61186/JCT.15.3.203
Received: 22 May. 2024; Received in revised form: 16 Aug. 2024; Accepted: 24 Aug. 2024
Original Article
©Author

presence of the recombinant protein was tested by SDS-PAGE gel with a molecular weight of approximately 68 KDa and the expression rate of the recombinant protein, estimated by Image J software, was 54 percent.

Conclusion: The bioproduction of butanetriol requires the construction of a metabolic pathway consisting of several enzymes. The presence of the bacterium *E.coli* as the target strain and the use of cheap substrate such as xylose-containing biomass and the existence of the enzyme xylonate dehydratase are essential for the production of high-speed and high-volume D-1,2,4 butanetriol.

سلول و بافت، دوره ۱۵، شماره ۳، سال ۱۴۰۳ صفحات ۲۰۳ تا ۲۱۴

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

کلون سازی و بیان ژن آنزیم زایلونات دهیدراتاز از *کلوباکتر ویبریوئیدس*

فاطمه مرتمی[۱]، محمدجواد دهقان عصمت آبادی[۲]*، علی اصغر دلدار[۳]، رضا محمدی[۴]، نفیسه پورمهدی[۵]، فاطمه بزرگمهر[۶]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران،famartami@gmail.com

[۲] استادیار، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران،mohammad.dehghan@modares.ac.ir

[۳] استادیار، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، aad.phd.gene@gmail.com

[۴] استادیار، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، rezamohammadi@mut.ac.ir

[۵] دانش آموخته کارشناسی ارشد ، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران،npourmahdi@gmail.com

[۶]دانش آموخته کارشناسی ارشد، مجتمع آمایش و پدافند غیرعامل، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران، Fatemehbozorgmehr93@gmail.com

واژگان کلیدی

D-زایلوز
زایلونات
بوتان تری ال
زایلونات دهیدراتاز
اشریشیا کلی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳

چکیده

هدف: زیست توده لیگنوسلولزی مانند ضایعات کشاورزی (ساقه‌ی ذرت، تفاله چغندر قند و پوست مرکبات)، یک منبع به‌طور گسترده فراوان و بالقوه جذاب برای تولید سوخت‌های زیستی و مواد شیمیایی است.قند D-زایلوز دومین قند فراوان در هیدرولیز لیگنوسلولزی می‌باشد. امروزه تلاش‌های قابل توجهی برای گسترش کارخانجات سلولی میکروبی به‌منظور به‌کار گرفتن از D-زایلوز برای تولید مواد شیمیایی با ارزش افزوده صورت گرفته است. ترکیب آلی ۴،۲،۱-D بوتان تری ال (BT) (D-1,2,4-butanetriol) یک ماده شیمیایی حد واسط مهم است که به‌طور گسترده در بسیاری از زمینه‌ها مانند داروسازی، کاغذ، مواد پلیمری و کاربردهای نظامی استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت بسیار زیاد تولید زیستی BT، یک مسیر مصنوعی که توسط چهار مرحله زایلوز دهیدروژناز، زایلونات دهیدراتاز، ۲-کتواسید دکروکسیلاز و آلدئید ردوکتاز کاتالیز می‌شود جهت تولید BT از D-زایلوز پیشنهاد شده و به‌کار گرفته می‌شود. از آنجایی‌که در اکثر مطالعات انجام شده از ژن زایلونات دهیدراتاز *کلوباکتر کرسنتوس* استفاده شده است و با توجه به این که *کلوباکتر کرسنتوس* و *کلوباکتر ویبریوئیدس* شباهت بسیار بالای ژنی دارند، هدف از انجام این مطالعه کلون سازی و بیان ژن زایلونات دهیدراتاز از *کلوباکتر ویبریوئیدس* در *ای. کلی* می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** توالی ژنی D-زایلونات دهیدراتاز از باکتری *کلوباکتر ویبریوئیدس* از بانک اطلاعاتی NCBI به‌دست آمد و بعد از استخراج ژنوم *ک. ویبریوئیدس* که از بانک سلولی خریداری شد، با طراحی پرایمرهای اختصاصی به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction) ، ژن مورد نظر تکثیر شد. قطعه ژنی در وکتور بیانی pET28 کلون گردید و سپس با استفاده از روش شیمیایی به سلول‌های مستعد سویه *ای. کلی* (DE3 Rosetta-gami)(انتقال داده شد. پس از القا سلول‌ها، بیان پروتئین نوترکیب به وسیله‌ی SDS-PAGE بررسی گردید. **نتایج**: با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر و تکثیر ژن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Colony PCR) و توالی یابی، فرآیند کلونینگ و ورود قطعه ژنی به وکتور بیانی pET28 تایید شد. وجود پروتئین نوترکیب توسط SDS-PAGE با وزن مولکولی حدود ۶۸ کیلودالتون بررسی گردید و میزان بیان پروتئین نوترکیب، توسط نرم افزار Image J ،۵۴ درصد تخمین زده شد. **نتیجه گیری**: تولید زیستی بوتان تری ال نیازمند ساخت یک مسیر متابولیکی متشکل از چند آنزیم می‌باشد. حضور باکتری *E.coli* به‌عنوان سویه هدف و استفاده از سوبسترای ارزان قیمتی همچون بایومس حاوی زایلوز و حضور آنزیم زایلونات دهیدراتاز برای تولید BT با سرعت و میزان بالا ضروری می‌باشد که نتایج مطالعات این پژوهش می‌تواند در این راستا موثر باشد.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۱-۲۲۹۷۴۶۰۳ فکس: ۰۲۱۲۲۹۷۴۶۰۳

آدرس پست الکترونیک: mohammad.dehghan@modares.ac.ir

۱- مقدمه

ماده D-۴,۲,۱ بوتان تری ال یک ماده شیمیایی مهم در نرم کننده‌ها، پلیمرها، لیپیدهای کاتیونی و تولید داروهای ضدکلسترول است (۱). یکی از مهم‌ترین کاربردهای آن تولید بوتان تری ال تری نیترات می‌باشد. بوتان تری ال تری نیترات یک نرم کننده پر انرژی در ترکیبات پیشرانه و مواد منفجره است که قابلیت جایگزینی با نیتروگلیسیرین سنتی در زمینه نظامی را دارد. بوتان تری ال تری نیترات مزایای بیشتری مثل حساسیت کمتر به شوک، پایداری حرارتی بالاتر و فراریت کمتری نسبت به نیتروگلیسیرین دارد (۲). بوتان تری ال در حال حاضر با احیای شیمیایی مالیک اسید با استفاده از سدیم بور هیدرات تولید می‌شود (۳). این فرایند تولید شیمیایی مقدار زیادی نمک بورات را به‌عنوان محصول جانبی تولید می‌کند که برای محیط زیست بسیار آلوده کننده است. اگرچه سایر کاتالیزورها از جمله کرومیت مس و روبیدیوم برای تولید بوتان تری ال در دسترس هستند. احیای کاتالیزوری نیازمند شرایط سخت مانند فشار و دمای بالا می‌باشد، علاوه بر این محصولات جانبی ناگزیر تولید شده که بازده تولید بوتان تری ال را کاهش می‌دهد. اخیرا توسعه فرایند تولید زیستی بوتان تری ال به‌دلیل مقرون به صرفه بودن و ایمنی بالا توجه فراوانی را به خود جلب کرده است (۴و۵و۶). دی زایلوز یا شکر چوب ترکیب اصلی زایلان‌ها است که بخش عمده‌ای از دیواره سلولی گیاهان را تشکیل می‌دهد (۷) . این قند پنتوز، کلیدی ترین و دومین قند فراوان غیر خوراکی می‌باشد که در واقع ۳۰ تا ۴۰ درصد از قندهای قابل بازیافت از زیست توده گیاهی را شکل می‌دهد (۸). توانایی میکروارگانیسم ها برای استفاده از قند های لیگنوسلولزی می‌تواند برای تولید سوخت‌های زیستی و شیمیایی مانند گلیکولیک، گلوتاریک، دی هیدروکسی بوتیریک اسید به عنوان اسید آلی و مونو اتیلن گلایکول، بوتان دی ال و بوتان تری ال به‌عنوان الکل مورد بهره‌برداری قرار گیرد (۹). جای تعجب نیست که بسیاری از میکروارگانیسم‌های مختلف برای تبدیل زایلوز به محصولات مختلف مورد بررسی قرار گرفته اند. به طور کلی سه مسیر برای تجزیه دی زایلوز در میکروارگانیسم‌ها توصیف شده است (۱۰و۱۱)؛ مسیر ایزومراز (XIP)، مسیر اکسو ریداکتیو (ORP)، مسیر اکسیداتیو زایلوز(XOP) که خود شامل دو مسیر ویمبرگ و دامز می‌باشد (۱۷-۱۲).

در سال‌های اخیر با روش مهندسی ژنتیک و متابولیسم سویه‌های نوترکیب، همچون قارچ و باکتری ساخته شده‌اند که با استفاده از مسیرها و آنزیم‌های فوق قادر به تولید مواد مختلف از جمله بوتان تری ال از زایلوز می‌باشند. با توجه به اهمیت تولید زیستی BT یک مسیر سنتتیک توسط چهار مرحله زایلوز دهیدروژناز (XDH) و زایلونات دهیدراتاز (XD) و ۲-کتواسید دکربوکسیلاز (KDC) و آلدئید ردوکتاز (ALR) کاتالیز می‌شود. آنزیم زایلونات دهیدراتاز (XD) از آنزیم‌های مهم و کاربردی می‌باشد که طی یک واکنش یک طرفه زایلونات را به ۲-کتو۳- دئوکسی D-زایلونات تبدیل می‌کند. این آنزیم عمدتا قادر به دهیدراتاسیون زایلونات، آرابونات،گالاکتارات می‌باشد؛ به علاوه در گونه‌های باکتری مختلف ویژگی کینتیکی و فعالیتی مختلف دارد که به آن اشاره خواهد شد. واکنش این آنزیم با انرژی آزاد گیبس (ΔG) حدود -100 KJ/mol از لحاظ ترمودینامیکی به‌راحتی قابل انجام است (۱۸).

کلوباکتر کرسنتوس یک باکتری گرم منفی و الیگوتروف است که به طور گسترده در محیط های آب شیرین یافت می‌شود، ژنوم این باکتری توالی‌یابی شده و مشخص شده است که حاوی چندین خوشه ژنی می‌باشد که در شرایط محیطی مختلف مثل کمبود مواد غذایی و یا تغییرات شدید محیطی بقای خود را حفظ می‌کند (۱۹). یکی از یافته های قابل توجه توالی یابی ژنوم، عدم وجود ژن همولوگ برای XIP وORP است. این مساله نشان داد که جذب دی زایلوز در *کلوباکتر کرسنتوس* از طریق مسیر متفاوت عمل می‌کند. تجزیه و تحلیل رونویسی این باکتری هنگامی که در حضور زایلوز به‌عنوان تنها منبع کربن رشد کرد، بیان ژن‌های

کدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک (زایلوزیدازها و هیدرولازها) را نشان داد و یک خوشه ژنی که در ابتدا پیش بینی شده بود که آنزیم‌های مسیر ویمبرگ را رمزگذاری می‌کند (۲۰).

تولید زیستی بوتان تری ال نیازمند ساخت یک مسیر متابولیکی متشکل از چند آنزیم می‌باشد. با در نظر گرفتن *ای. کلی* به‌عنوان سویه هدف و استفاده از زایلوز به عنوان سوبسترا و حضور آنزیم زایلونات دهیدراتاز برای تولید BT با سرعت و میزان بالا ضروری می‌باشد. زیرا آنزیم‌های دهیدراتاز(YagF,YjhG) موجود در باکتری *ای. کلی* از نظر کینتیکی پرقدرت نمی‌باشند. علاوه بر آن، سلول در شبکه متابولیسمی خود به این آنزیم‌ها نیاز دارد و دخالت دادن این آنزیم‌ها در مسیر متابولیسم اضافه باعث کاهش رشد و فعالیت سلول میزبان می‌شود. بنابراین ایجاد مسیر متابولیسمی مصرف سریع زایلونات با استفاده از کلون‌سازی و بیان ژن زایلونات دهیدراتاز از *کلوباکتر ویبریوئیدس* در سویه *ای. کلی*، هدف این پروژه بوده است. مشابه این پروژه پیش از این در ایران انجام نشده است و دستاوردهای حاصل از این پژوهش قبلا در کشور کار نشده است.

۲- مواد و روش ها

پلاسمید و سویه‌های باکتری: پلاسمید به کار برده شده در این مطالعه pET28 a(+) بوده، سویه‌های *ای. کلی* DH5α به‌عنوان سویه کلون سازی و *ای.کلی* Rosetta-gami B (DE3) (به‌عنوان سویه بیانی و باکتری *کلوباکتر ویبریوئیدس* برای تکثیر ژن مورد نظر مورد استفاده قرار گرفتند.

محیط کشت باکتری: برای *ای.کلی* در مراحل کلونینگ و ساخت سازواره و القای بیان ژن از محیط کشت LB (۱۰گرم بر لیتر تریپتون، ۵ گرم بر لیتر سدیم کلرید، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر) مایع و آگار دار استفاده شد که در صورت نیاز به آن آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزوده شد. برای رشد *کلوباکتر ویبریوئیدس* از محیط کشت R2 830 (۲ گرم بر لیتر پپتون، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۲ گرم بر لیتر $MgSO4.7H_2O$ و برای تنظیم pH بر روی عدد ۷ از محلول دی پتاسیم هیدوژن فسفات (K_2HPO_4) استفاده شد.

تکثیر قطعه ژنی xylD: در این پژوهش به‌منظور تکثیر قطعه ژنی *xylD* با استفاده از PCR، با استفاده از نرم افزار Snap Gene 5.2 و همچنین دانلود فایل توالی ژنی *کلوباکتر ویبریوئیدس* از سایت NCBI به شماره دستیابی NC-011916.1 و با توجه به آنزیم‌های موجود و جایگاه برش آن‌ها در وکتور pET28، دو پرایمر با جایگاه‌های برش *Nde1* و *Hind111* طراحی گردید. ژن*xylD* ، یک ژن در باکتری ای.کلی است که کد کننده آنزیم زایلونات دهیدراتاز می‌باشد. این آنزیم در متابولیسم زایلوز نقش دارد و به تبدیل زایلونات به محصولات واسطه‌ای دیگر در مسیر متابولیکی کمک می‌کند. در پژوهش‌های مربوط به زیست‌تبدیل و بیوتکنولوژی، این ژن و آنزیم‌های مربوط به آن مورد مطالعه قرار می‌گیرند تا بتوانند کارایی و کاربری‌های صنعتی و تحقیقاتی خود را بهبود بخشند.

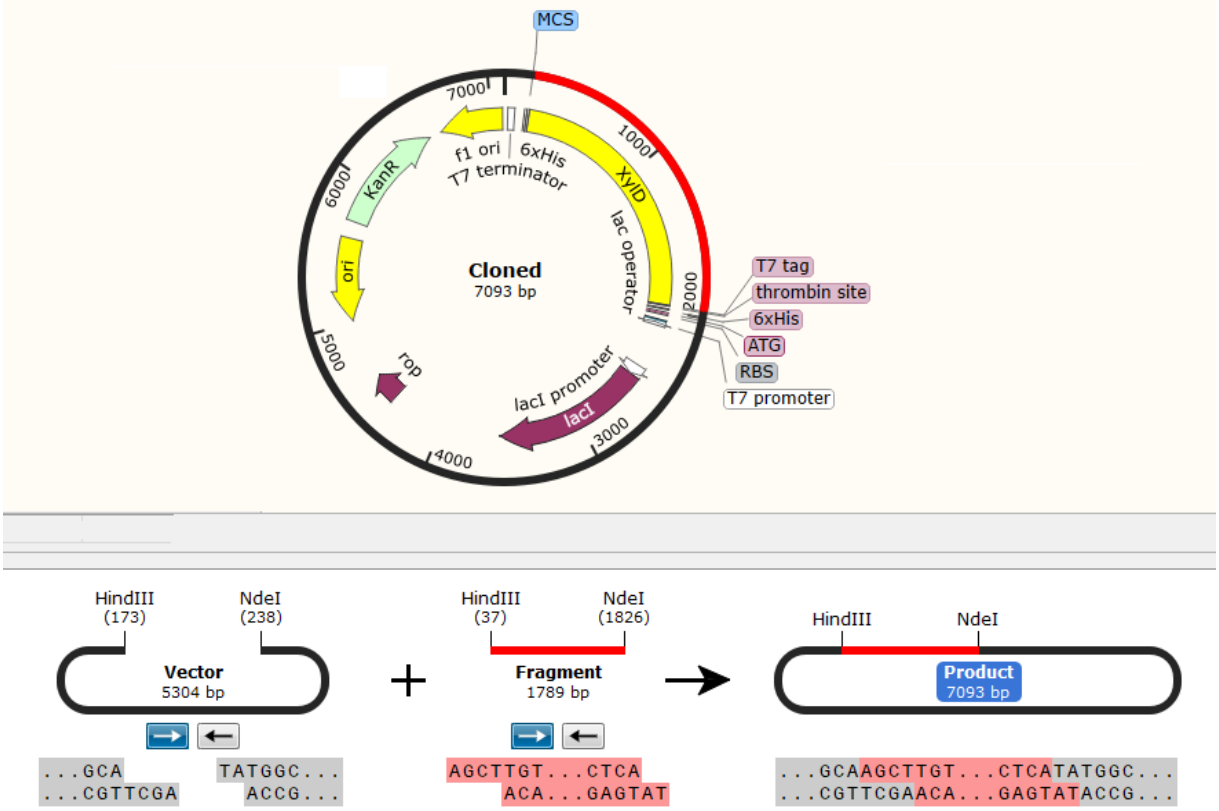
با در نظر گرفتن فریم کلی وکتور pET28 و نیز به منظور خلاف جهت قرار گرفتن قطعه ژن *xylD* و پروموتر lacI درون وکتور، پرایمر *xylD*-RBS-F با جایگاه برش *Nde1* و به اندازه ۳۲ جفت باز و پرایمر *xylD-Hind111*-R ، با اندازه ۳۰ جفت باز انتخاب گردید (جدول۱). ساختار و مشخصات این دو پرایمر توسط نرم افزار Oligo Analyzer مورد بررسی قرار گرفت. به منظور استخراج ژنوم، *کلوباکتر ویبریوئیدس* در محیط کشت 830R2 رشد کرده و پس از این‌که دانسیته نوری در طول موج

۶۰۰ نانومتر به ۲ رسید، استخراج ژنوم با استفاده ازکیت استخراج DNA (شرکت GTP)، صورت گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و روش PCR تکثیر ژن زایلونات دهیدراتاز(*xylD*) به طول ۱۷۹۴ جفت باز از ژنوم استخراج شده باکتری *ک. ویبریوئیدس* صورت گرفت. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ابتدا به‌مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی اولیه انجام گرفت. سپس ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه در ۵۳ درجه سانتی‌گراد اتصال، ۲ دقیقه در ۷۲درجه سانتی‌گراد گسترش برای ۱۰ چرخه انجام شد و بلافاصله ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت سازی، ۳۰ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی‌گراد اتصال و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد گسترش برای ۲۰ چرخه انجام گرفت و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد گسترش نهایی انجام گرفت. پس از انجام واکنش محصولات PCR روی ژل آگارز برده شد.

جدول ۱: پرایمر های طراحی شده اختصاصی *xylD*-RBS-F , *xylD- Hind111* –R

	پرایمر	درصد GC	دمای اتصال	دمای Tм (basic)
xylD-RBS-F: پیشرو	5’GATATACATATGAGATCCGCCTTGTCTAACCG 3’	٪ ۴۳/۸	۸۷°c	۹۲/۰°c
xylD-Hind111 -R: معکوس	5’ CTCCAAGCTTCCTTCGCATCAGTGGTTGTG 3’	٪ ۵۳/۳	۸۷°c	۹۲/۰°c

کلونینگ ژن xylD در وکتور pET28 پس از تکثیر ژن زایلونات دهیدراتاز (*xylD*) با استفاده از PCR، سویه *ای.کلی* DH5α حاوی وکتور pET28 به منظور استخراج وکتور کشت داده شد و پس از آن وکتور موجود، توسط کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما) جداسازی شد. پس از استخراج وکتور pET28، با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده‌ای که طراحی توالی پرایمرها با توجه به آن‌ها صورت گرفت، یعنی آنزیم‌های *Nde1* و *Hind111*، وکتور و قطعه ژن آنزیم زایلونات دهیدراتاز (*xylD*)، برش داده شدند. در مرحله بعد اتصال بین وکتور و قطعه ژن صورت گرفت (شکل ۱) و پس از آن با تهیه سلول مستعد *ای.کلی* DH5α ، مرحله ترانسفورماسیون انجام شد. پس از انتقال وکتور نوترکیب حاوی ژن *xylD*، با ظهور کلنی‌ها روی پلیت آگار حاوی کانامایسین، چندین کلنی مشخص و برای کلنی PCR استفاده شدند. پس از تایید حضور ژن آنزیم زایلونات دهیدراتاز در وکتور نوترکیب(pET28-*xylD*) با استفاده از کلنی PCR، به‌منظور اطمینان کامل از حضور قطعه ژن درون وکتور نوترکیب و نیز عدم بروز جواب مثبت کاذب در کلنی PCR، برش آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود کننده *Nde1* و *Hind111* انجام شد. برای این منظور ابتدا استخراج وکتور از سویه باکتری *ای.کلی* DH5α صورت گرفت و سپس روی وکتور استخراج شده، برش آنزیمی انجام پذیرفت. سومین مرحله برای تایید حضور قطعه ژن *xylD* درون وکتور pET28 نوترکیب، وکتور مدنظر به‌منظور تعیین توالی با پرایمرهای *xylD*-RBS-F و *xylD-Hind111*-R ارسال و نتیجه تایید شد.



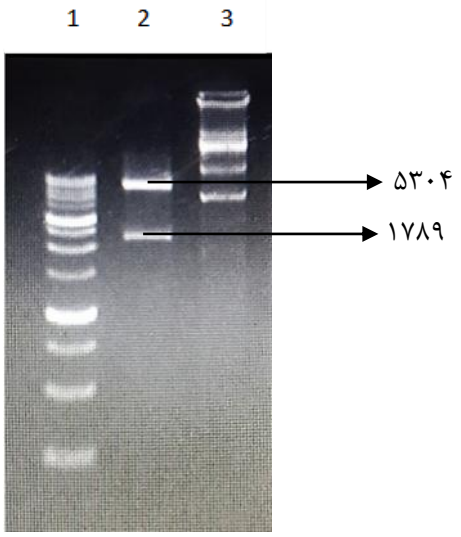
شکل ۱: طراحی مسیر کلونینگ ژن *xylD* در وکتور pET28

بیان پروتئین: با توجه به عملکرد بیانی مناسب در سویه باکتری *ای.کلی* Rosetta-gami (DE3) نسبت به سویه باکتریایی *ای.کلی* DH5α ، وکتور نوترکیب استخراج شده را پس از تهیه سلول مستعد از سویه *ای.کلی* Rosetta-gami (DE3)، انتقال داده و کلنی‌های ظاهر شده بر روی پلیت آگار حاوی کانامایسین دارای وکتور نوترکیب می‌باشند. پس از وارد کردن وکتور نوترکیب pET28-*xylD* درون سویه باکتریایی *ای.کلی*)DE3(Rosetta-gami به منظور بررسی بیان پروتئین هدف، سویه‌های نوترکیب و کنترل منفی (فاقد وکتور و یا وکتور فاقد قطعه ژنی) کشت داده شد و پس از رسیدن دانسیته‌ی نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷، سویه‌ها با افزودن ۱/۵ میکرولیتر IPTG با غلظت ۱ مولار القا شدند (با توجه به اینکه غلظت نهایی IPTG به منظور القای سویه‌ها برابر ۰/۲ میلی مولار می‌باشد، بنابراین پس از محاسبه میزان مورد نیاز در مجموع ۱/۵ میکرولیتر IPTG با غلظت ۱ مولار مورد استفاده قرار گرفت). از هر دو سویه مورد بررسی پس از ۴ ساعت انکوبه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌میزان ۱ میلی‌لیتر نمونه برداشته شده و رسوب‌گیری با سانتریفیوژ صورت گرفت. در ادامه با مشخص شدن باندهای پروتئینی بر روی ژل SDS-PAGE بیان پروتئین ژن *xylD* به اندازه ۶۸ (کیلو دالتون) مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده بیان در سویه نوترکیب نسبت به سویه شاهد، به منظور اطمینان از افزایش بیان در سویه نوترکیب نسبت به سویه شاهد ژل SDS-PAGE با استفاده از نرم افزار Image J مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج

کلونینگ ژن xylD در وکتور pET28

در این پژوهش به‌منظور تکثیر قطعه ژنی *xylD*، واکنش زنجیره پلی مراز توسط پرایمرهای اختصاصی و آنزیم pfu (DNA polymerase) روی ژنوم استخراج شده باکتری *کلوباکتر ویبریوئیدس* صورت گرفت. در بررسی نتیجه، قطعه‌ای به‌طول ۱۷۹۴ جفت باز از ژن زایلونات دهیدراتاز (*xylD*) تکثیر شد. سپس از سویه باکتری *ای.کولی* DH5α ، وکتور pET28 به‌منظورکلون سازی استخراج شد. در مرحله بعد وکتور pET28 و قطعه ژن آنزیم زایلونات دهیدراتاز (*xylD*)، با استفاده آنزیم‌های *Nde1* و *Hind111* برش داده شد و سپس روی ژل برده و استخراج شدند. سپس طبق روش اتصال قطعه و ژن(Ligation) ، وکتور و ژن آنزیم زایلونات دهیدراتاز به هم متصل شده و پس از آن با تهیه سلول مستعد و همچنین انجام مرحله ترانسفورماسیون، کلنی‌هایی که روی پلیت ظاهر می‌شوند طبیعتا دارای وکتور pET28 نوترکیب حاوی ژن *xylD* می‌باشد. این مساله (حضور ژن آنزیم زایلونات دهیدراتاز درون وکتور نوترکیب (pET28-*xylD*)) توسط کلنی PCR تایید شد، به‌منظور اطمینان کامل از حضور قطعه ژن درون وکتور نوترکیب برش آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود کننده *Nde1* و *Hind111* انجام شد. قطعه ۱۷۸۹ بازی مربوط به ژن *xylD* و قطعه ۵۳۰۴ مربوط به وکتور برش خورده است (شکل ۲).



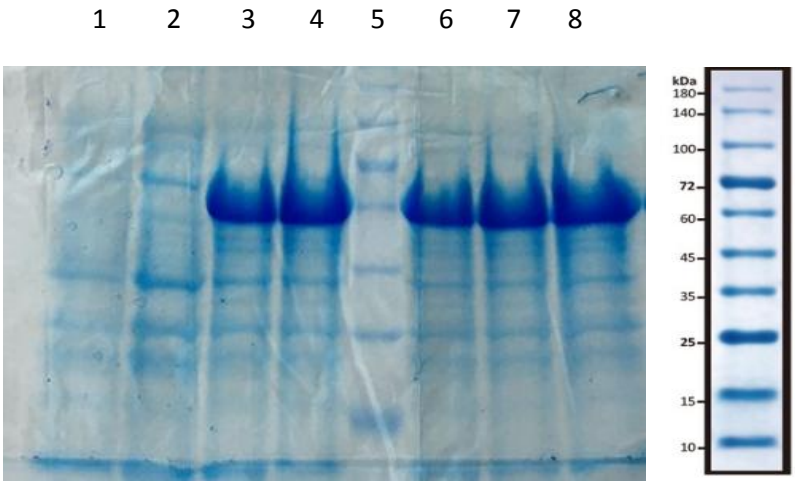
شکل ۲: برش آنزیمی تاییدی وکتور نوترکیب pET28-*xylD*

۱) نشانگر DNA، ۲) دایجست وکتور نوترکیب pET28-*xylD*، ۳) وکتور برش نخورده

بیان پروتئین هدف

پس از تایید وکتور نوترکیب pET28-*xylD* و استخراج آن، این وکتور نوترکیب به‌منظور بیان پروتئین بالاتر به سلول مستعد باکتری *ای.کلی* (*DE3*) Rosetta-gami، انتقال داده و کلنی‌های دارای وکتور نوترکیب، روی پلیت آگار حاوی کانامایسین رشد کردند. سپس به‌منظور بررسی بیان پروتئین هدف، پس از کشت سویه‌های باکتریایی (نوترکیب و کنترل منفی) در محیط کشت LB و پس از رسیدن دانسیته نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷، سویه ها با ۱/۵ میکرولیتر IPTG با غلظت ۱مولار القا شدند (شکل۳). پس از مشاهده بیان در سویه نو ترکیب نسبت به سویه شاهد، به‌منظور اطمینان از افزایش بیان در سویه

نوترکیب نسبت به سویه شاهد ژل SDS-PAGE با استفاده از نرم افزار Image J مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت و مشخص شد که در سویه نوترکیب افزایش بیان ۵۴ درصدی نسبت به سویه شاهد رخ داده است (جدول۲).



شکل ۳: القا و بیان سویه نوترکیب pET28-*xylD* و شاهد

۱)سویه شاهد، ۲) t0 القا شده با IPTG ۰/۲ میلی‌مولار، ۳و۴) t4 کلنی شماره ۱ و۲ نوترکیب القا شده با IPTG ۰/۲ میلی‌مولار،

۵) نشانگر پروتئین، ۶و۷و۸) t4 کلنی شماره ۳ و ۴و ۵ نوترکیب القا شده با IPTG ۰/۲ میلی‌مولار

جدول ۲: اطلاعات گراف نرم افزار Image J

	Area	Percent
1	1531.933	1.062
2	3251.095	2.254
3	4081.903	2.83
4	78331.17	54.303
5	57051.98	39.551

۴- بحث

سان و همکاران (۲۱) بیان کردند که YjhGبه‌عنوان زایلونات دهیدراتاز اصلی موجود در باکتری *ای.کلی* در تولید زیستی BT نقش دارد که بیان بالای آن تولید BT را ۲۰ درصد افزایش داد. استفان و همکاران (۲۲ و۲۳) به بررسی زایلونات دهیدراتازها از سویه‌هایی مثل *Haloferax volcanii* ,*Pseudomonas sp.SHC52* و *Caulobacter crescentus* که در مسیر متابولیک اکسیداتیو زایلوز نقش دارند، پرداختند. میزان تطابق بین توالی آمینو اسیدی YjhG و زایلونات دهیدراتازهای نام برده بسیار پایین بود (کمتر از ۳۰درصد). بیان زایلونات دهیدراتاز ازCcxylD و PsxylD تولید BT را به‌ترتیب ۵۳/۳ درصد و ۲۴/۱ درصد در مقایسه با YjhG افزایش داده است. در حالیکه با بیان HvxylD تولید BT مشاهده نشده است. این نتایج نشان می‌دهد که

XylD از *کلوباکتر کرسنتوس* مناسب‌ترین زایلونات دهیدراتاز در میان ۴ آنزیم ذکر شده برای تولید BT در *ای.کلی* می‌باشد. در وانگ و همکاران (۲۴) ، سه کاندیدا برای زایلونات دهیدراتاز در نظر گرفتند: YjhG و YagF موجود در باکتری *ای.کلی* و XylD از *ک. کرسنتوس* که D-زایلونیک اسید را به ۲-کتو۳-دئوکسی D-زایلونات تبدیل می‌کنند. برای انتخاب بهترین دهیدراتاز این سه آنزیم بیان و خالص شدند و نتایج نشان داد که XylD دارای پائین ترین ثابت میکائیلیس و هم‌چنین بالاترین ثابت خاص می‌باشد که میزان بازدهی آنزیم را نشان می‌دهد. بنابراین XD نسبت به آنزیم‌های موجود در *ای.کلی* فعال تر است. بنابراین با توجه به مطالعات صورت گرفته آنزیم زایلونات دهیدراتاز، سویه *ک. کرسنتوس* یا همان *C.vibrioides NA1000* به‌عنوان کارآمدترین نوع این آنزیم شناخته شده است. با توجه به اینکه سویه‌های *ای.کلی* BL21 و *ای.کلی* (DE3 Rosetta- gami) میزبان های مناسب برای تولید پروتئین‌های نوترکیب خارجی می‌باشند و به‌کمک سیستم بیانی pET28 که به راحتی بیان انواع پروتئین‌های نوترکیب را نشان می‌دهد، بنابراین از این سیستم بیانی و در سویه *ای.کلی (DE3* Rosetta- gami) استفاده شد. اگرچه این باکتری برای مسیر مورد نظر جهت تولید BT ، ژن زایلونات دهیدراتاز را دارد لیکن با توجه به این‌که این آنزیم از مجموعه آنزیم‌های متابولیسمی خود میزبان است و نقش تبدیل زایلونات به ۲-کتو۳-دئوکسی زایلونیک اسید را ایفا می کند، در گیر کردن این آنزیم در یک مسیر جدید در سلول گرچه می‌تواند تولید محصول هدف را محقق سازد، لیکن متابولیک قابل ملاحظه ای را بر سلول تحمیل خواهد نمود چرا که هدف غائی در برقرار کردن مسیر تولید BT، یک مسیر پویا با تولید قابل توجه خواهد بود. بنابراین ضروری است که یک ژن مستقل با بیان هماهنگ با سایر ژن‌های مسیر تولید BT در سلول در نظر گرفته شود. به‌همین دلیل تصمیم به بیان مستقل این ژن در سلول گرفته شد. سپس انتخاب سویه‌ی مناسب برای بیان ژن، مورد مطالعه قرار گرفت. پس از القا سلول ها و تایید بیان قطعه کلون شده در باکتری با استفاده از SDS-PAGE ، میزان بیان به کمک نرم افزار Image J، ۵۴ درصد تخمین زده شد. به‌دلیل اینکه رونویسی و ترجمه در سیتوپلاسم *ای.کلی* هم‌زمان انجام می‌شود، هنگامی‌که پروتئین به میزان بالا بیان شده باشد ممکن است در فولد شدن دچار مشکل شود. به‌منظور رفع این موضوع می توان میزان غلظت نهائی IPTG را کاهش داد، هم‌چنین می توان با پایین آوردن دمای انکوباسیون بعد از القا تولید این پروتئین را کم کرد.

۵- نتیجه گیری

تولید زیستی D-۱و۲و۴ بوتان تری ال از مواد تجدید پذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. قریب به ۲۰ سال است که گروه‌های مختلف در جهان برای تولید BT که کاربرد فراوانی در صنعت دارد، سویه‌های میکروبی و قارچی را طراحی کردند. تولید زیستی این محصول نیازمند چهار آنزیم به‌نام‌های زایلوز دهیدروژناز، زایلونات دهیدراتاز، ۲-کتو اسید دکربوکسیلاز و آلدئید ردوکتاز می‌باشد. در ابتدا انتخاب سویه مناسب یک پیش نیاز مهم برای بیان موفق پروتئین نوترکیب و دستیابی به محصول هدف در میزان بالا می‌باشد. مسیر سنتتیک BT در *ای.کلی* به دلیل کشت آسان، رشد سریع، دانش گسترده به ژنتیک آن و دستکاری ژنتیکی با موفقیت ایجاد شده است. در سویه *ای.کلی* BL21 و *ای.کلی* (DE3 Rosetta- gami)، ژن هایی مثل yjhH و yagE که مسیرهای رقابتی را در تولید BT کاتالیز می‌کنند، وجود ندارند بنابراین این سویه می‌تواند میزبان مناسب تری برای تولید BT باشد. همانطور که ذکر شد یکی از آنزیم‌های این مسیر زایلونات دهیدراتاز می‌باشد که کارامدترین نوع آن متعلق به *کلوباکتر کرسنتوس* می‌باشد که شباهت بالای ژنی با باکتری *کلوباکتر ویبریوئیدس* دارد و هدف از این مطالعه کلون و بیان ژن زایلونات دهیدراتاز باکتری *کلوباکتر ویبریوئیدس* در باکتری *ای.کلی* بود که محقق گردید. امید است که بتوان از این سویه برای تولید BT با سرعت و میزان بالا استفاده کرد.

۶- منابع

1. Abdel-Ghany SE, Day I, Heuberger AL, Broeckling CD and Reddy AS. Metabolic engineering of Arabidopsis for butanetriol production using bacterial genes. Metabolic Engineering 2013 Nov; 20:109-20.

2. Cao Y, Niu W, Guo J, Xian M, Liu H. Biotechnological production of 1,2,4-butanetriol: An efficient process to synthesize energetic material precursor from renewable biomass. Scientific reports 2015 Dec 16;5: 18149.

3. Gouranlou F & Kohsary I. Synthesis and characterization of 1, 2, 4-butanetrioltrinitrate. Asian Journal of Chemistry 2010 June;22(6):4221-4228.

4. Bamba T, Yukawa T, Guirimand G, Inokuma K, Sasaki K, Hasunuma T & Kondo A. Production of 1, 2, 4-butanetriol from xylose by Saccharomyces cerevisiae through Fe metabolic engineering. Metabolic engineering 2019 Dec;56: 17-27.

5. Niu W, Molefe MN, Frost JW. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol. Journal of the American chemical society 2003 Oct 29;125(43):12998-9.

6. Lu X, He S, Zong H, Song J, Chen W, Zhuge B. Improved 1, 2, 4-butanetriol production from an engineered Escherichia coli by co-expression of different chaperone proteins. World Journal of Microbiology & Biotechnology 2016 Sep;32(9):149.

7. Zhou GC, Wang Y, Zhai S, Ge F, Liu ZH, Dai YJ, Yuan S, Hou JY. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium Ensifer adhaerens strain TMX-23. Applied Microbiology and Biotechnology 2013 May;97(9):4065-74.

8. Jagtap SS, Dhiman SS, Kim TS, Kim IW, Lee JK. Characterization of a novel endo-β-1,4-glucanase from Armillaria gemina and its application in biomass hydrolysis. Applied Microbiololog and Biotechnology 2014 Jan;98(2):661-9.

9. Francois JM, Alkim C, Morin N. Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: current status and perspectives. Biotechnology for Biofuels 2020 Jul 8;13:118.

10. Moysés DN, Reis VC, de Almeida JR, de Moraes LM, Torres FA. Xylose Fermentation by Saccharomyces cerevisiae: Challenges and Prospects. International journal of Molecular Science 2016 Feb 25;17(3):207.

11. Nunn CE, Johnsen U, Schönheit P, Fuhrer T, Sauer U, Hough DW, Danson MJ. Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea Sulfolobus solfataricus and Sulfolobus acidocaldarius. The Journal of Biological Chemistry 2010 Oct 29;285(44):33701-9.

12. Rygus T, Scheler A, Allmansberger R, Hillen W. Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the Bacillus megaterium encoded regulon for xylose utilization. Archives of Microbiology 1991;155(6):535-42.

13. Lawlis VB, Dennis MS, Chen EY, Smith DH, Henner DJ. Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology 1984 Jan;47(1):15-21.

14. Valdehuesa KNG, Ramos KRM, Nisola GM, Bañares AB, Cabulong RB, Lee WK, et al. Everyone loves an underdog: metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology 2018 Sep;102(18):7703-7716.

15. Jo S, Yoon J, Lee SM, Um Y, Han SO, Woo HM. Modular pathway engineering of Corynebacterium glutamicum to improve xylose utilization and succinate production. Journal of Biotechnology 2017 Sep 20;258:69-78.

16. Johnsen U, Schönheit P. Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon Haloarcula marismortui. Journal of Bacteriology 2004 Sep;186(18):6198-207.

17. Dahms AS, Anderson RL. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. Biochemical and biophysical research communications 1969 Aug22;36(5):809-814.

18. Wang X, Xu N, Hu S, Yang J, Gao Q, Xu S, et al. d-1,2,4-Butanetriol production from renewable biomass with optimization of synthetic pathway in engineered Escherichia coli. Bioresource Technology 2018 Feb;250:406-412.

19. Nierman WC, Feldblyum TV, Laub MT, Paulsen IT, Nelson KE, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of Caulobacter crescentus. Proceedings of the National Academy of sciences of the united states of America 2001 Mar 27;98(7):4136-41.

20. Hottes AK, Meewan M, Yang D, Arana N, Romero P, McAdams HH, Stephens C. Transcriptional profiling of Caulobacter crescentus during growth on complex and minimal media. Journal of Bacteriology 2004 Mar;186(5):1448-61.

21. Sun L, Yang F, Sun H, Zhu T, Li X, Li Y, et al. Synthetic pathway optimization for improved 1,2,4-butanetriol production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 2016 Jan;43(1):67-78.

22. Stephens C, Christen B, Fuchs T, Sundaram V, Watanabe K, Jenal U. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in Caulobacter crescentus. Journal of Bacteriology 2007 Mar;189(5):2181-5.

23. Stephens C, Christen B, Watanabe K, Fuchs T, Jenal U. Regulation of D-xylose metabolism in Caulobacter crescentus by a LacI-type repressor. Journal of Bacteriology 2007 Dec;189(24):8828-34.

24. Wang J, Shen X, Jain R, Wang J, Yuan Q, Yan Y. Establishing a novel biosynthetic pathway for the production of 3,4-dihydroxybutyric acid from xylose in Escherichia coli. Metabolic Engineering 2017 May;41:39-45.