جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

# جداسازی، کلون کردن و تعیین توالي ژن *eglV* در قارچ *Trichoderma reesei PTCC5142*

**علی باباني [۱] ، محمدرضا زماني [۲] ، مصطفی مطلبي [۲] و صابر زهری [۱و۲]**
[۱] گروه بیولوژي، دانشکده علوم، دانشگاه رازي کرمانشاه
[۲] پژوهشگاه ملي مهندسی ژنتیك و زیست فناوری

**چکیده**

آنزیم اندوگلوکاناز از جمله آنزیمهاي سیستم سلولازي است که توسط طیف وسیعي از میکروارگانیسمها از جمله قارچ *Trichoderma reesei* تولید مي‌شود. در این تحقیق از ٦ گونه مختلف قارچ تریکودرما، جهت تولید آنزیم اندوگلوکاناز در محیط مندلز حاوی CMC و Avicel استفاده گردید. جدایه *T. reesei* PTCC 5142 با تولید ۰/۳۳۸ U/ml و ۰/۲۹۶ U/ml بترتیب در محیطهای حاوی CMC و Avicel بعنوان فعالترین ایزوله از نظر تولید این آنزیم انتخاب گردید. همچنین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و DNA ژنومی این قارچ ژن *eglV* جداسازی و در وکتور pTZ57R کلون و پس از تایید با الگوی هضم آنزیمی تعیین توالی گردید. مقایسه توالی این ژن با توالی ثبت شده در بانک اطلاعات ژنی نشان داد که این ژن با ژن *eglV* قارچ *T. reesei* سویه QM9414 مشابهت بسیار زیادی را نشان می دهد. با کلون کردن این ژن در وکتور بیانی یوکاریوتی مناسب می توان به تولید این آنزیم مبادرت نمود.

واژه های کلیدی: *Trichoderma reesei* ، *eglV* سلولاز، سلولز

# Isolation, cloning and sequencing of *eglV* gene from *Trichoderma reesei* PTCC5142

**Babaei A.[1], Zamani M.R.[2] , Motallebi M.[2] and Zahri S.[1,2]**
[1]Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran.
[2]National Istitiute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

## Abstract

Endo β 1,4 glucanase in one of the cellolytic enzymes which is produced by filamentous fungi *Trichoderma reesei.* In this study genomic DNA from *T.reesei* PTCC5142 (high *EglV* enzyme producer) and specific primers (CP9 and CP10) were used for *eglV* amplification. The amplified DNA fragment (900 bp) was cloned in pTZ57R, confirmed by restriction pattern, and sequenced. Alignment of *eglV* sequence indicated high homology with *eglV* gene from *T. reesei.*

This isolated gene could be cloned in suitable expression vector for *EglV* production in eukaryotic host.

**Keywords:** *Trichoderma reesei, eglV,* cellolose.

## مقدمه

سلولز ، پلیمري خطي از واحدهاي گلوکز با پیوندهاي گلیکوزیدي(٤و١)β بوده و مي‌تواند بهترین ذخیره براي تولید انرژي، غذا و مواد شیمیایي در نظر گرفته شود. این ماده قسمت عمده دیواره سلولي گیاهان عالي را تشکیل داده همچنین در جلبك ها، بسیاري از قارچها و حتي در کیست برخي از پروتوزوئرها وجود دارد (۳و۱۱و۱٤). مصرف انرژي در طي قرن اخیر به طور پیوسته‌اي با افزایش جمعیت جهان، افزایش یافته است تحقیقات وسیعي براي تبدیل مواد سلولزي به اتانل در دو دهه اخیر صورت گرفته است. آنزیم هاي سلولازي داراي کاربردهاي وسیعي در صنایع مختلف از جمله صنایع مواد غذایي، صنایع نساجي، آب میوه گیري، عطرسازي، تحقیقات وکشاورزي، صنایع کاغذ سازي، موادشوینده و... مي‌باشند (۲و۱۰).

آنزیمهای سلولازي قارچ *T.reesei* شامل سه ایزوآنزیم endoglucanase، دو ایزوآنزیم cellobiohydrolase و یك آنزیم β-D-glucosidase مي‌باشد (۱۳و۵). هیدرولیز آنزیمي سلولز یك فرایند پیچیده است که نیاز به مشارکت حداقل سه آنزیم دارد که بطور سینرژیستي با یکدیگر عمل مي‌کنند (۱۷): آنزیم Endo-1,4β-glucanase که در نواحي کریستالي کمتر اثر کرده پیوندهاي گلیکوزیدي داخلي سلولز را شکسته انتهاي آزاد جهت فعالیت دو آنزیم دیگر تولید مي‌کند (۴و۱۵). در این تحقیق تولید آنزیم اندوگلوکاناز در ٦ گونه مختلف قارچ تریکودرما بررسی و از ایزوله برتر ژن eglV جداسازی، کلون و تعیین توالی می گردد.

## مواد و روش ها

**جدایه های قارچ تریکودرما:** تعداد ۶ گونه مختلف قارچ تریکودرما (*T. reesei* PTCC5142, *T. parceramosum*3, *T. viridae*1, *T. longibrachiatum*5, *T. koningii, T. virens*10) در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت (۱۷). جهت نگهداری قارچ از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده گردید. براي تهیه این محیط پودر PDA به میزان ۳۹ گرم در لیتر در آب حل و پس از سترون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

**تولید و سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱و٤ اندوگلوکاناز:** براي بدست آوردن پروتئین‌هاي ترشحي حاوی آنزیم بتا ۱ و ٤ اندوگلوکاناز مورد نیاز در این تحقیق، جدایه هاي مورد نظر در ارلن‌هاي ۲۵۰ میلي لیتري حاوي ۱۰۰ میلی لیتر محیط

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



Mandels (۸) واجد CMC و Avicel بعنوان منبع کربن تلقیح و سپس محیط کشت‌ها به انکوباتور منتقل و در حالت همزن ( ۱۰۰ دور در دقیقه) و دماي ۳۰ درجه سانتیگراد تنظیم شد، درفواصل ٤۸ ساعته از آنها نمونه برداري و با استفاده از کاغذ صافي استریل، محیط کشت‌ها از صافي عبور داده شدند. از محیط کشت صاف شده به عنوان محلول حاوي پروتئین‌هاي ترشحي استفاده گردید.

براي سنجش فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندو گلوکاناز به یک میلی لیتر محلول ۰/۷ درصد CMC (به عنوان سوبسترا) ۵۰۰ میکرولیتر نمونه آنزیمي و ۵۰۰ میکرولیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH=۴/۸ اضافه شد. مخلوط حاصله به مدت یك ساعت در دماي ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه و براي توقف واکنش آنزیمي ۲ میلي لیتر معرف دي نیترو سالیسیلیك اسید DNS (۲۱) به آن اضافه گردید. سپس نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شده تا در اثر احیاء معرف DNS توسط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد. براي پایداري رنگ معرف یک میلي لیتر محلول تارتارات مضاعف سدیم پتاسیم ٤۰ درصد به آن اضافه و جذب نوري آنها در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش از گلوکز بعنوان استاندارد استفاده گردید.
یک واحد آنزیمي مقدار آنزیمي است که براي آزاد شدن یك میکرومول قند احیا شده به صورت گلوکز در مدت یك دقیقه لازم میباشد این مقدار بر حسب U/ml تعریف میشود.
به منظور استخراج DNA از قارچ *T.reesei*، قارچ مورد نظر در محیط کشت MY (حاوي Yeast extract، Maltose، $KH_2PO_4$و NaCl) کشت داده شد. پس از جداسازی میسلیوم ها از محیط کشت استخراج DNA از آنها به روش CTAB صورت گرفت، کیفیت و کمیت DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین گردید. پرایمرهاي اختصاصي ( CP9 & CP10 ) جهت تکثیر بخش کدکننده ژن آنزیم اندوگلوکاناز۵ از توالی گزارش شده این ژن طراحی و سنتز گردید . (Saloheimo *et al*;1988 ):

Forward Prime(cp9) 5´CATCGTGACCATGAAGGCAA-3´
Backward Primer(cp10) 5´GCCGGAAGAATTCTAGAGAG-3´

محلول واکنش PCR(۵۰ میکرولیتر) شامل٤۰۰ نانوگرمDNA ژنومي, ۱واحد آنزیم Taq DNA polymerase, ۲/۵ میلي مولار کلرید منیزیم, ۱X بافر, ۰/۸میلي مولار از هرdNTP و µM ۰/۲ از هر پرایمر مي باشد و شرایط دما و تعداد سیکلهای PCR طبق برنامه ذیل انجام گردید: تعداد ۳۰ سیکل با denaturation در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد بمدت ٦۰ ثانیه، annealing در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد بمدت ٤۵ ثانیه و extention در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ٤۵ ثانیه. قطعه مورد نظر پس از خالص سازي از ژل به کمك high pure PCR product purification kit(شرکت ROCHE) در پلاسمیدpTZ57R کلون گردید. براي این کار از کیت Ins T/A clon™ PCR product cloning(شرکتFermentse) که قادر به کلون کردن قطعات با انتهاي صاف مي باشد استفاده شد. کلیه مراحل کلونینگ مطابق دستورالعمل مربوطه از شرکت Fermentase انجام گردید. جهت تعیین توالي قطعاتPCR به روش automated sequencing، نمونه ها به شرکتSEQLAB آلمان فرستاده شدند.

**نتایج و بحث**

براي بررسي و مقایسه تولید و فعالیت آنزیمي در ۶ جدایه از گونه های مختلف قارچ تریکودرما، جدایه ها در محیط کشت مایع القایی، کشت شده و فعالیت آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز آنها پس از ۴۸ ساعت مقایسه گردید. بررسي فعالیت آنزیمی جدایه هاي مورد مطالعه نشان میدهد که جدایه *T. reesei* PTCC5142 با تولید U/ml ۰/۳۷ از نظر تولید آنزیم بتا ۱ و ۴ اندوگلوکانازي، به عنوان فعال ترین جدایه میباشد (جدول ۱). لذا در ادامه تحقیق از این جدایه برای مطالعه ژن *eglV* استفاده گردید. بدین منظور قارچ مذکور در محیط کشت MY رشد داده شد و با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده، واکنش PCR انجام گردید (شکل ۱).

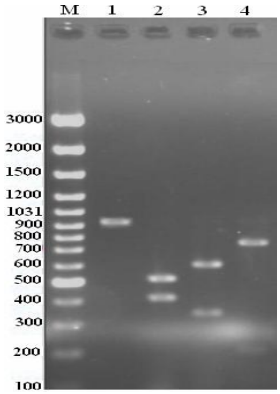
جهت تایید محصول PCR، واکنش هضم آنزیمي با آنزیم هاي *Pvu*II، *SalI* و *XhoI* صورت گرفت که قطعه تکثیر شده را تایید نمود (شکل۱). سپس قطعه bp ۹۰۰ ~ در وکتورpTZ57R کلون گردیده و پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از پرایمرهاي $M_{13}$ و پرایمرهاي اختصاصی CP9 وCP10 و همچنین الگوی هضم آنزیمی مورد تائید قرار گرفت و بنام pABEGL5 نامگذاری گردید (شکل۲و۳). قطعه کلون شده تعیین توالي گردید. همردیفي (Alignment) این توالي با توالي‌هاي موجود ثبت شده نشان داد که این ژن با توالي ژن *egl5* گزارش شده از قارچ *T.reesei* (Accession No. Z33381) صددرصد مشابهت نشان مي‌دهد (شکل ۴). با توجه به کلون کردن ژن eglV از گونه *T. reesei* مورد مطالعه در این تحقیق که بالاترین میزان تولید آنزیم اندوگلوکاناز را از خود نشان می داد و نیز کوتاه بودن اینترونهای این ژن ، میتوان از بیان این ژن توسط وکتورهای مناسب یوکاریوتی جهت مطالعه اثر این آنزیم بر تجزیه سوبسترای سلولزی استفاده نمود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

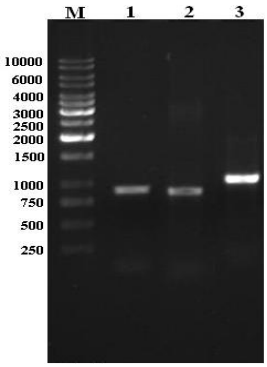


**جدول ۱) تولید آنزیم اندوگلوکاناز توسط ایزوله های مختلف قارچ تریکودرما**

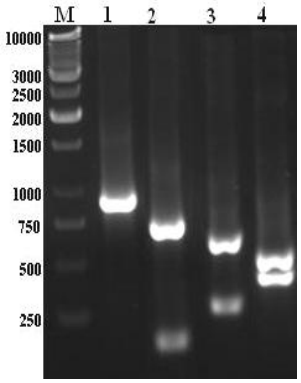
| نام قارچ | میزان فعالیت آنزیم (U/ml) در محیط حاوی CMC | میزان فعالیت آنزیم (U/ml) در محیط حاوی Avicel |
|---|---|---|
| *T. reesei* | ۰/۳۳۸ | ۰/۲۹۶ |
| *T. koningii* | ۰/۲۴۶ | ۰/۲۴۴ |
| *T. longibrachiatum*5 | ۰/۲۴۷ | ۰/۲۴۶ |
| *T. virens*10 | ۰/۲۴۵ | ۰/۲۴۷ |
| *T. viridae*1 | ۰/۲۴۷ | ۰/۲۴۶ |
| *T. parceramosum*3 | ۰/۲۴۷ | ۰/۲۴۵ |




**شکل ۱)** نتایج حاصل از عمل آنزیمهاي برش‌دهنده DNA تکثیر شده ژن *egl5* M) مارکر ۱) محصول PCR (~۹۰۲bp) ۲) هضم با آنزیم *PvuII* ۳) هضم با آنزیم *SalI* ۴) هضم با آنزیم *XhoI*



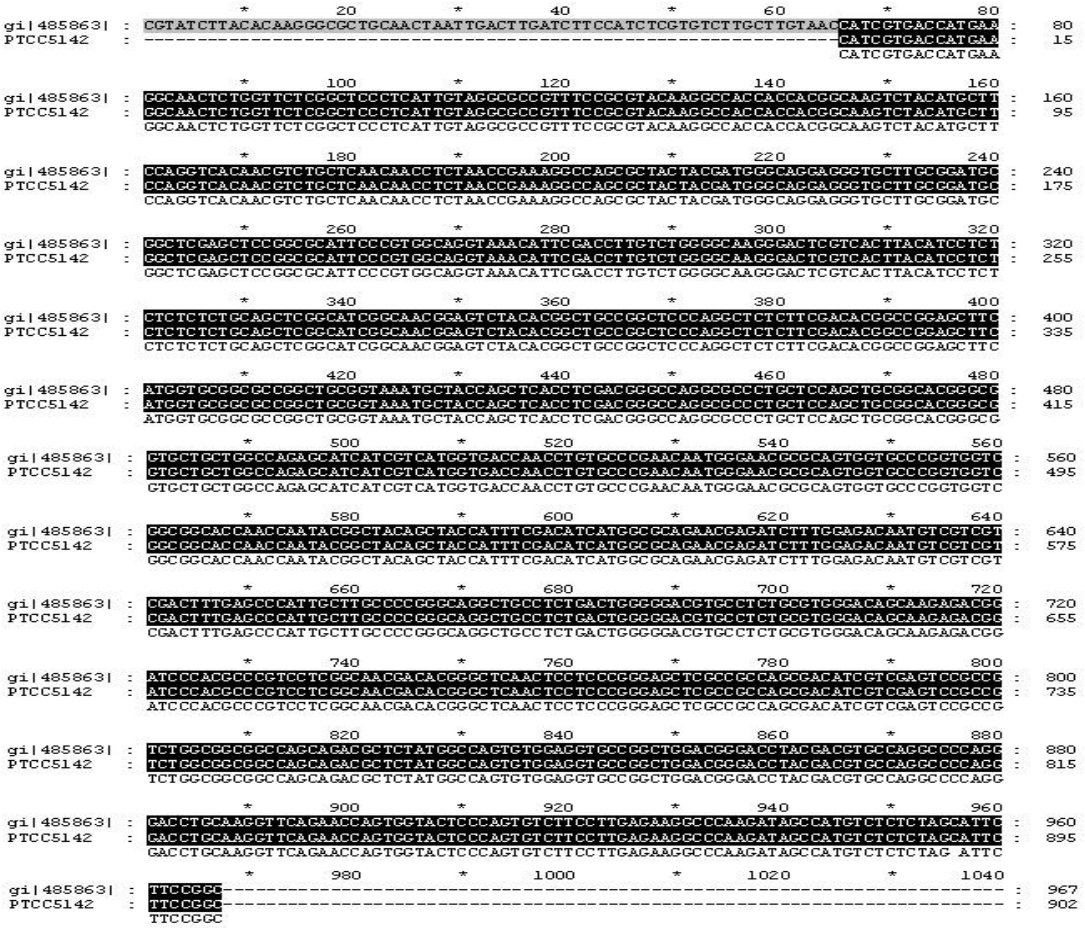

شکل ۲) :




**شکل ۳)**

**شکل ۲)** محصول PCR ژن *eglV* در وکتور pTZ57R/T و DNA ژنومي M) مارکر ۱) DNA ژنومي تکثیر شده با پرایمرهاي CP9 و CP10 ۲) محصول PCR وکتور نوترکیب با پرایمرهاي ژنومي CP9 و CP10 ۳) محصول PCR وکتور نوترکیب با پرایمرهاي $M_{13}$

**شکل ۳)** هضم آنزیمي محصول PCR بدست آمده از قطعه کلون شده M) مارکر ۱) محصول PCR (~۹۰۲bp) ۲) هضم با آنزیم *Xho*I ۳) هضم با آنزیم *Sal*I ۴) هضم با آنزیم *PvuII*



**شکل ٤)** مقایسه توالي ژن تکثیر شده در این تحقیق (PTCC5142) با ژن *eglV* در قارچ *T.reesei*QM9414 (gi485863)

**منابع**

**1-** Begain, P., Aubert, J.P.(1994). The biological degradatin of cellulose. FEMS microbiol Rev. 13: 25-58

**2-**Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances *18*, 355-383.

**3-**Bhat, M.K.,Hazlewood, G.P.(2001).Enzymes in farm animal nutrition.,12-42.(CAB International Press.)

**4-** Busto M. D. , Ortega N. and Perez-Mateos (1995)Induction of β-Glucosidase in fungal and soil bacterial cultures.Soil Biol. Biochem. Vol .27,No.7, pp 949-954

**5-**Criquet, S.(2002). Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. Journal of Microbiological Methods., 50,165-173

**6-** Dong Won Kim *et al* .,(1995) Kinetic mechanism of cellulose hydrolysis by EndoglucanaseI and ExoglucanaseII purified from Trichoderma viride .,Bull. Korean. Chem. Soc.,Vol 16 ,pp. 742-747

**7-** Fagerstam, L.G., Petterson, L.G.(1980) The 1,4-ß-glucan cellabihydrilyses of Trichoderma reesei .QM9414 FEBS, Lett 119:97-101

**8-** Forano E., Béra C. (1997) Fibre degradation enzymes , their origin and diversity. Rumen Microbial Ecosystem Symposium Abstracts .,pp.11-14

**9-** Goksoy, J. Eriksen, J.(1980) Cellulases, In: Rose, A.H. (Ed.), Economic Microbiology. Vol. 5, pp. 117-118

**10-**Howard R.L. ,Abotsi E ., Jansen van Rensburg E.L. and Howard S.(2003) Lignocellulose biotechnology: issues of bioconvesion and enzyme production.African Journal of Biotechnology Vol.2(12),PP.602-619

**11**- Lenting, H.B.M.,Warmoeskerken, M.M.C.G.,(2001). Mechanism of interaction between cellulase action and applied shear, an hypothesis. Journal of Biotehnology.,89,217-226

**12-** Lodish *et al ,* Molecular cell biology ,(2000) Fourth edition , W.H.Freeman and company ,New York

**13**-Macarron R.,and *et al*.(1993)Mode of action of endoglucanaseIII from T.reesei.Biochem J.289.867-873

**14**- Reese, E.T.,Mandels, M.,Weiss, A.H.(1974). Cellulose as a novel energy source., 181-200

**15-** Stryer L., Biochemistry (1999) Fourth edition ,W.H.Freeman and conpany , New York

**16-** Switzer R.L. , Freema and company Garrity L.F. , Experimental Biochemistry (1999) Third editio ,W.H.. New York

**17**-Valentino S.J. et al ., (2000) Codon optimization of xylanase gene *xynB* from the thermophilic bacterium Dictyoglomus thermophilum fir expression in filamentous fungus Trichoderma reesei.,FEMS Microbiology Letters 190 ,pp. 13-19