چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

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

جداسازی، تعیین توالی و مطالعه ژن و cDNA سلوبیوهیدرولازII قارچ *Trichoderma parceramosum*

صابر زهری[۱]، محمدرضا زمانی[۲] و مصطفی مطلبی[۲]
[۱]گروه زیست شناسي، دانشکده علوم، دانشگاه رازی
[۲] پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

در این تحقیق، از جدایه *Trichoderma parceramosum* که از نظر تولید آنزیمهای سلولازی دارای پتانسیل مطلوبی بود جهت جداسازی و کلون کردن ژن *cbhII* استفاده گردید. استخراج DNA ژنومي به روش CTAB صورت گرفت. براي تکثیر این ژن از دو پرایمر اختصاصي استفاده گردید و قطعه مورد انتظار به طول حدود ۱/۶ Kb در وکتور pBluscript SK (+) کلون و جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین توسط RT-PCR ، cDNA ژن مذکور تهیه (۱/۴Kb) و بعد از تایید و کلون کردن در وکتور pBluscript SK(+) تعیین توالی گردید. مقایسه توالی DNA ژنومی و cDNA مربوطه نشان داد این ژن دارای ۳ اینترون کوتاه بوده که توالی کد کننده این ژن پروتئینی به طول ۴۷۰ اسید آمینه را کد مینماید.

مقایسه توالی اسید آمینه ای آنزیم *CbhII* با تواليهای موجود در بانک ژنی نشان میدهد که این توالی در ۱۴ اسید آمینه با توالی *CbhII* مربوط به *T.viridea* ، *T. reesei* و *T. koningi* تفاوت دارد. مقایسه ساختمان سوم ناحیه کاتالیتیکی این آنزیم با آنزیم *Cel6A* قارچ *T. reesei* نشان میدهد که موقعیت نسبی تمام اتمهای backbone بین دو ساختار مذکور با RMSD برابر با ۲۳Å/. تطبیق می کند.

واژه های کلیدي: *Trichoderma parceramosum* ، آنزیمهاي سلولازي، *cbhII*، سلولز

Molecular study of cellobiohydrolaseII (*cbhII*) gene from *Trichoderma parceramosum*

Zahri S.[1,2], Motallebi M.[2], and Zamani M.R.[2]

[1]Department of Biology., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran

[2]National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

A genomic DNA and cDNA of *cbhII* encoding cellobiohydrolase II was isolated from the fungus *Trichoderma parceramosum* and cloned in pBluscriptSK(+). This represents the first report of *cbhII* gene from this organism. DNA sequencing revealed that *cbhII* has an open reading frame of 1413 bp, which encodes a putative polypeptide of 470 amino acids, and it interrupted by three introns. The deduced amino acid sequence revealed that *cbhII* codes for a protein consisting of a fungal type carbohydrate binding module separated from a catalytic domain by a praline/serine/threonine rich linker region. The deduced protein is homologous to fungal cellobiohydrolases in family 6A of the glycosyle hydrolases. High sequence identity between the catalytic domain of *Cel 6A* from *T. reesei* and *T. parceramosum cbhII* gene product allowed structure prediction for the 3D model of the *T. parceramosum* catalytyic domain.

Keywords: *Trichoderma parceramosum*, *cbhII*, cellolytic enzymes.

مقدمه

قسمت اعظم دیواره سلولي گیاهان عالي از سلولز تشکیل میشود. سلولز پلیمري خطي از واحدهاي گلوکز با پیوندهاي گلیکوزیدي $\beta(1\rightarrow4)$ مي باشد. محصولات هیدرولیز سلولز معمولاً قندهاي احیایي به شکل گلوکز مي باشند. مزیت هیدرولیز آنزیمي سلولز نسبت به روش هاي هیدرولیز اسیدي پایین بودن هزینه‌هاي آن مي باشد زیرا هیدرولیز آنزیمي در شرایط ملایم یعني pH= ٤/٨ و دماي ٥٠-٤٥ درجه سانتیگراد انجام مي گیرد وهمچنین در آن عمل شیمیایي(خورندگي) وجود ندارد (۲).

باکتري ها و قارچ‌ها مي‌توانند آنزیم هاي سلولازي براي هیدرولیز مواد لیگنوسلولزي تولید کنند. عمدتا برای تولید آنزیم هاي سلولازي با اهداف تجاری از قارچ ها استفاده مي شود. (۱، ٥ و ۱۲). آنزیم سلوبیوهیدرولاز که نام دیگر آن اگزوگلوکاناز می باشد واحدهای سلوبیوز را از انتهای غیر احیاء کننده زنجیره سلولز و یا قطعات الیگومری حاصل از عمل بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز را جدا می کند (۱۰).

سلولاز ها آنزیم هایي هستند که به صورت کمپلکسي از سه گروه آنزیمي و به طور سینرژیسمي با همدیگر عمل مي کنند و میتوانند پیوند هاي گلیکوزیدي ($\beta(١\rightarrow ٤)$ را در سلولز هیدرولیز نمایند. این آنزیمها عبارتند از بتا ۱ و ۴ اندوگلوکاناز، سلوبیوهیدرولاز و بتا گلوکوزیداز. گونه هاي مختلف تریکودرما یکي از مفیدترین منابع آنزیم هاي سلولازي مي باشند و توجه خاصي به تولید آنزیمهاي سلولازي توسط تریکودرما، از طریق شناسایي وتولید گونه هاي برتر از نظر تولید آنزیم شده است. در این قارچ میزان تولید آنزیمهاي سلولازی ترشحي قابل ملاحظه مي باشد (۸).

در این تحقیق، برای مطالعه ژن *cbhII* ، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و DNA ژنومی از جدایه قارچ *T. parceramosum* ژن مربوطه کلون و تعیین توالی و با توالی بدست آمده از cDNA این ژن مقایسه شده و پیش بینی ساختار سوم این آنزیم انجام خواهد شد.

مواد و روش ها

به منظور استخراج DNA از قارچ *T. parceramosum*، قارچ مورد نظر در محیط کشت MY (حاوي Yeast extract, Maltose, KH_2PO_4و NaCl) کشت داده شد، پس از جدا سازي ميسليوم ها از محيط كشت، استخراج DNA از آنها به روش CTAB صورت گرفت(٦), كيفيت و كميت DNA با استفاده از اسپكتروفوتومتر تعيين گرديد. پرايمرهاي اختصاصي با توجه به alignment توالي چهار ژن *cbhII* موجود در GenBank طراحی و سنتز شدند (دو پرايمر اختصاصي CF22 و CB22 به ترتيب حاوي جايگاه برش آنزيمهاي *EcoRI* و *BamHI* مي باشند):

CF22 *5´* GCG**GAATTC**ATGATTGTCGGCATTCTCACC *3´*

CB22 5´ GCG**GGATCC**TTACAGGAACGATGGGTTTGC *3´*

محلول واكنش PCR(٥٠ ميكروليتر) شامل٤٠٠ نانوگرمDNA ژنومي, ٢/٥ واحد آنزيم *Pfu* DNA polymerase, ٣ ميلي مولار كلريد منيزيم, ١X بافر, ٠/٥ميلي مولار از هرdNTP وμM ٠/٥ از هر پرايمر مي باشد و شرايط دما و تعداد سيكلهاى PCR طبق برنامه ذيل انجام گرديد: تعداد ٣٠ سيكل با denaturation در دمای ٩٤ درجه سانتيگراد بمدت ٦٠ ثانيه، annealing در دمای ٥٤ درجه سانتيگراد بمدت ٦٠ ثانيه و extention در دمای ٧٢ درجه سانتيگراد بمدت ٩٠ ثانيه. قطعه مورد نظر پس از خالص سازي از ژل به كمك high pure PCR product purification kit(شركت ROCHE) در pBluscript SK(+) كلون گرديد. جهت تعيين توالي قطعاتPCR به روش automated sequencing، نمونه ها به شركتSEQLAB آلمان فرستاده شدند.

برای بدست آوردن mRNA ، قارچ *T. parceramosum* در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع القایی (Takashgima et al, 98) واجد ۲ درصد Avicel بعنوان منبع کربن و inducer تلقیح و به انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد همراه با همزن (۱۶۰ دور در دقیقه) منتقل گردید. پس از۲۵ ساعت، محیط کشت به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (۱۵۰۰۰ xg) و میسلیوم قارچ جمع آوری گردیده و mRNA با استفاده از کیت mRNA Isolation kit از شرکت Roche استخراج گردید.

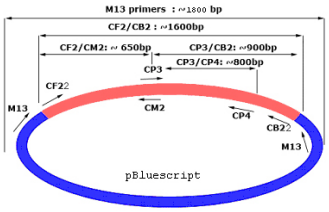
برای تهیه زنجیره اول cDNA (first strand cDNA) ، از آنزیم نسخه برداری معکوس و پرایمر oligo (dt)15 در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد استفاده گردید و در مرحله بعد با انجام PCR در شرایطی که قبلاً ذکر شد با استفاده از آنزیم *Pfu*-DNA polymerase ، cDNA دو زنجیره ای جهت انجام کلونینگ بدست آمد. cDNA حاصل با استفاده از برش آنزیمی *EcoRI* و *BamHI* که در انتهای پرایمرها طراحی شده بود در وکتور pBluscript SK(+) کلون گردید. استخراج پلاسمید به روش Alkaline lysis صورت گرفت (۹). باكتري *E. coli* (DH5α) با استفاده از كلريد كلسيم ١٠٠ ميلي مولار به حالت مستعد شده درآمده و بمدت يكساعت همراه با DNA مربوطه جهت transformation در دماي ٣٧ درجه سانتيگراد انكوبه گرديد. سپس باكتريها پس از شوك حرارتي ۴۲ درجه سانتيگراد به مدت ۹۰ ثانيه در محيط SOB (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$) حاوي ١٠٠ ميكروگرم در هر ميلي ليتر آمپي سيلين گسترش داده شدند. در اين مرحله كلونيهاي سفيد رنگ حاصله بعنوان كلونهاي حاوي قطعات مورد نظر انتخاب گرديد. قطعات كلون شده پس از تاييد توسط الگوي هضم آنزيمي جهت تعيين توالي (توسط شركت SeqLab Gottingen, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. بمنظور تعيين توالی دقيق قطعات كلون شده، تعيين توالی در دو جهت با استفاده از آغازگرهای M13-forward/revese انجام گرديد.

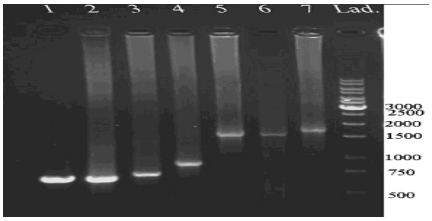
بررسی مشابهت توالی این ژن با اطلاعات موجود در بانک ژنی توسط برنامه نرم افزاری BLAST انجام شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای ژن *cbhII* با توالیهای ثبت شده در بانک ژنی توسط برنامه نرم افزاری CLUSTAL W انجام گرفت. پیش بینی ساختمان سه بعدی catalytic core domain آنزیم *cbhII* با استفاده از برنامه SWISS-MODEL صورت گرفت.

نتایج و بحث

از آنجا که در مطالعات قبلی نشان داده شد که قارچ *T. parceramosum* از پتانسیل مطلوبی جهت تولید آنزیمهای سلولازی برخوردار می باشد، در این تحقیق جهت جداسازی و کلون کردن ژن *cbhII* از این قارچ استفاده گردید. بدین منظور قارچ مذکور در محیط کشت MY رشد داده شد و با استفاده از DNA ژنومي استخراج شده واكنش PCR انجام گرديد. پس از الكتروفورز محصول PCR روي ژل آگارزيک درصد، يک باند بطول تقريبی ١/۶ Kb مشاهده گرديد(شكل١). با استفاده ازhigh pure PCR product purification kit باند مذكور از ژل٠/٧ درصد استخراج و خالص سازي گرديد. هضم آنزيمي با استفاده از آنزيمهاي *XhoI, PstI, BclI* و *XbaI* الگوي مورد انتظار را ايجاد

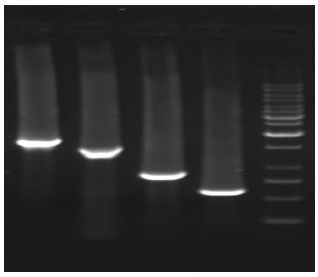
مي نمود. درصورتيكه تعيين توالی ژن مذكور نشان داد كه اين DNA تكثير شده، ژن *cbhII* می باشد. قطعه DNA تكثير شده در وكتور pBluscript SK(+) كلون و پس از تايید توسط PCR (شكل ۱) بنام pSZ3 نامگذاري گرديد.





شكل ۱) تايید پلاسميد pSZ3 حاوی ژن *cbhII* توسط PCR و محل انتخاب پرايمرهای مورد استفاده:
رديف۱) CF22/CM2 ، رديف۲) CF22/CM2، رديف ۳) CP3/CP4 ، رديف ۴) CP3/CB22 ، رديف ۵) CF22/CB22 ، رديف ۶) CF22/CB22 ، رديف ۷) M13 (F/R)

از mRNA استخراج شده از قارچ *T. parceramosum* كشت شده در محيط كشت القايی برای RT-PCR جهت سنتز cDNA استفاده گرديد. بدين منظور با استفاده از پرايمر oligo (dt)18 و آنزيم reverse transcriptase اولين رشته از cDNA سنتز گرديد. سپس توسط پرايمرهای اختصاصی CF22 و CB22 و آنزيم Pfu ، cDNA دو رشته ای تهيه گرديد. نتايج بدست آمده نشان داد كه cDNA سنتز شده بطول حدود ۱۴۰۰bp تكثير شده است (شكل ۲). cDNA سنتز شده نيز در وكتور pBluscript SK(+) كلون و پس از تايید توسط PCR (شكل ۲) بنام pSZ4 نامگذاری و جهت تعيين توالی قطعه كلون شده استفاده گرديد.



شكل ۲) تايید پلاسميد pSZ4 حاوی cDNA ژن *cbhII* توسط PCR :
رديف ۱) پرايمرهای M13 F/R رديف ۲) CF22/CB22 رديف ۳) CP3/CB22 رديف ۴) CF22/CM2

توالی بدست آمده نشان داد كه طول cDNA اين ژن برابر ۱۴۱۳ bp ميباشد. مقايسه توالی DNA ژنومی و cDNA ژن *cbhII* نشان می دهد كه اين ژن نيز مانند ژنهای *cbhII* گزارش شده (با سه اينترون كوتاه) (۳ و ۷)، دارای سه اينترون بطولهای ۵۳ bp، ۵۴ bp و ۶۲ bp بوده و Open Reading Frame موجود در اين cDNA يک پلی پپتيد بطول ۴۷۰ اسيد آمينه را كد می نمايد (شكل ۳). ژن *cbhII* كلون شده از *T. parceramosum* تحت شماره AY651786 و cDNA آن تحت شماره AY7661091 در بانک ژنی ثبت گرديد.
مقايسه توالی اسيد آمينه ای آنزيم *CbhII* با توالیهای موجود در بانک ژنی نشان ميدهد كه اين توالی در ۱۴ اسيد آمينه با توالی *CbhII* مربوط به *T.viridea* ، *T. reesei* و *T. koningi* تفاوت دارد (شكل ۳). تغيير تركيب آمينو اسيدي در ناحيه لينكر باعث پيدايش putative glycosilation sites بيشتري شده است. (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc) (۵) و به نظر مي‌رسد كه با اين تغيير، ميزان مقاومت اين آنزيم نسبت پروتئازها افزايش يافته است (۴ و ۱۱).

ساختمان سوم توالی اسيد آمينه ای اين آنزيم توسط SWISS-MODEL پيش بينی گرديد. مدل پيش بينی شده اين ناحيه با ساختمان سوم ناحيه كاتاليتيكی مربوط به پروتئين *Cel6A* قارچ *T. reesei* (PDB code:1CB2) مقايسه گرديد.

موقعیت نسبی تمام اتمهای backbone بین دو ساختار مذکور با RMSD (Root Mean Squared Deviation) برابر با ۲۳Å/. تطبیق می کرد.

با توجه به اینکه دو پلاسمید pSZ3 و pSZ4 بترتیب حاوی DNA ژنومی و cDNA ژن *cbhII* می باشند می توان از آنها برای بیان این آنزیم و مقایسه میزان بیان آنها در میزبان مناسب یوکاریوتی استفاده نمود.

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90
                 |         |         |         |         |         |         |         |         |
Tviride
MIVGILTTLATLATLAASVPLEERQACSSVWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYY
SQCLPGAASSSSSTRAASTTSRVSPTTSRSSS
Tkoningi
MIVGILTTLATLATLAASVPLEERQACSSVWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYY
SQCLPGAASSSSSTRAASTTSRVSPTTSRSSS
Treesei
MIVGILTTLATLATLAASVPLEERQACSSVWGQCGGQNWSGPTCCASGSTCVYSNDYY
SQCLPGAASSSSSTRAASTTSRVSPTTSRSSS
Tparceramosum
MIVGILTTLATLATLAASVPLEERQACSSVWGQCGGQNWSGPTCCAAGSTCVYSNDYY
SQCPPGAASSSSSTRASSTTNRVSSTTS-TSS
                 ******************************************:*************
************:***.***.*** :**

                100       110       120       130       140       150       160       170       180
                 |         |         |         |         |         |         |         |         |
Tviride
ATPPPGSTTTRVPPVGSGTATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAA
AVAKVPSFMWLDTLDKTPLMEQTLADIRTAN
Tkoningi
ATPPPGSTTTRVPPVGSGTATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAA
AVAKVPSFMWLDTLDKTPLMEQTLADIRTAN
Treesei
ATPPPGSTTTRVPPVGSGTATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAA
AVAKVPSFMWLDTLDKTPLMEQTLADIRTAN
Tparceramosum
ATPPPGSTTTRVPPVGSGTATYSGNPFVGVTPWANAYYASEVSSLAIPSLTGAMATAAA
AVAKVPSFMWLDTLDKTPLMEQTLADIRTAN
**********************************************************************
************

                190       200       210       220       230       240       250       260       270
                 |         |         |         |         |         |         |         |         |
Tviride
KNGGNYAGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRT
LLVIEPDSLANLVTNLGTPKCANAPSAYLECI
```

Tkoningi
KNGGNYAGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRT
LLVIEPDSLANLVTNLGTPKCANAQSAYLECI
Treesei
KNGGNYAGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRT
LLVIEPDSLANLVTNLGTPKCANAQSAYLECI
Tparceramosum
KNGGNYAGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGVAKYKNYIDTIRQIVVEYSDIRTI
LVIEPDSLANLVTNLGTPKCANAQSAYLECI
**********:**********
***** *******

280 290 300 310 320 330 340 350 360
| | | | | | | | |
Tviride
NYAVTQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQLFANVYKNASSPRALRGLAT
NVANYNGWNITSPPSYTQGNAVYNEKLYIHAIGPL
Tkoningi
NYAVTQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQLFANVYKNASSPRALRGLAT
NVANYNGWNITSPPSYTQGNAVYNEKLYIHAIGRL
Treesei
NYAVTQLNLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQLFANVYKNASSPRALRGLAT
NVANYNGWNITSPPSYTQGNAVYNEKLYIHAIGPL
Tparceramosum
NYAITQLNLPNIAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQLFANVYKNASSPSALRGLATNV
ANYNGWNITSPPSYTQGNAVYNEKLYIHAIGPL
:****:**********
********** *

370 380 390 400 410 420 430 440 450
| | | | | | | | |
Tviride
LANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDWCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVW
VKPGGECDGTSDSSAPRFDSHCALPDALQPAPQ
Tkoningi
LANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDWCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVW
VKPGGECDGTSDSSAPRFDSHCALPDALQPAPQ
Treesei
LANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDWCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVW
VKPGGECDGTSDSSAPRFDSHCALPDALQPAPQ
Tparceramosum
LANHGWSNAFFITDQGRSGKQPTGQQQWGDWCNVIGTGFGIRPSSNTGDSLLDSFVW
VKPGGECDGTSDSSAPRFDSHCALPDALQPAPQ
**********:**********
****

460 470
| |

Tviride AGAWFQAYFVQLLTNANPSFL
Tkoningi AGAWFQAYFVQLLTNANPSFL
Treesei AGAWFQAYFVQLLTNANPSFL
Tparceramosum AGAWFQAYFVQLLTNANPSFL

شکل ۳) Alignment توالی اسید آمینه ای آنزیم *cbhII* قارچ *T. parceramosum* با *CbhII* قارچهای *T.viridea* ، *T. reesei* و *T. koningi*

منابع

1-Beguin, P. (1990). Molecular Biology of Cellulose Degradation. Annu. rev. Microbiol. **44,** 219-248.

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

3-Chen CM, Gritzali M, Stafford DW.(1987). Nucleotide sequence and deduced primery structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reseei* . *Biotechnology*; **5:** 274-278.

4-Clarke A.j.(1997). Biodegradation of cellulose. In Enzymology and biotechnology. Technomic publishing, Pennsylvania, P.55.

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

6-Doyle JJ, Doyle JL. (1987). A repid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*; **19:** 11-15.

7-Murray PG, Collins CM, Grassick A, Tuohy MG.(2003). Molecular cloning, transcriptional, and expression analysis of the first cellulase gene (cbh2), encoding cellobiohydrolase II, from the moderately thermophilic fungus Talaromyces emersonii and structure prediction of the gene product**.** Biochem Biophys Res Commun. **301**, 280-6.

8-Persson, I.; F., Tjerneld; B., Hahn-Hagerdahl (1991). Fungal cellulytic enzyme production: a review. Process Biochem. **26**: 65-74.

9-Sambrook, J. and Russell , D.W. (2000). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NewYork, NY.

10-Schulein, M. (2000). Protein engineering of cellulase, Biochemica et Biophysica Acta: 239-252.

11-Srisodsuk, M., Reinkainen, T., Penttilä, M. & Teeri, T. T. (1993) Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose, *J. Biol. Chem.* ***268***, 20756-20761.

12-Sun, Y., and Cheng, J. (2001). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. Bioresource Technology **38**: 1-11.