Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2021 / Vol 23 / No 3

OPEN ACCESS

Original Paper

Cloning and Expression of *Urate Oxidase* Gene Isolated from Marine *Streptomyces* in *Escherichia coli Origami* Bacteria

Nayyereh Sadat Jenaban (M.A)[1], Elahe Ali Asgari (Ph.D)*[2], Kumarss Amini (Ph.D)[3]

1 M.A in Biology, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 2 Assistant Professor, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 3 Associate Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Streptomyces* are gram-positive and aerobic bacterial strains that are isolated from different sources. *Streptomyces* have the ability to produce secondary metabolites and biologically active substances and are therefore very important in the field of biocontrol. *Urate oxidase* is a microbial enzyme product that can be extracted from a variety of sources, including streptomycin. In the present study, cloning of the *urate oxidase* gene isolated from seawater streptomycosis was performed in *Escherichia coli Origami* bacteria.

Methods: In this descriptive study, a total of 60 water and sediment samples were collected from different depths of the Caspian Sea coast in Mazandaran province, Iran. The Geram, staining methyl red, VP, citrate, starch hydrolysis, casein hydrolysis, nitrate reduction, oxidase and catalase tests were performed to identify and isolate *Streptomyces*. The *urate oxidase* gene was cloned using the T-A cloning method using the PTG-19 vector inside the host of *Escherichia coli Origami*. The expression of cloned genes in recombinant colonies was investigated by Real-Time PCR. The phylogenetic tree was drawn using clustalX and Mega5 software.

Results: Screening of marine water samples identified 12 isolated *streptomyces*, all of which had the *urate oxidase* gene. The expression of *urate oxidase* gene in *Escherichia coli Origami* was confirmed by Real-Time PCR. The results of phylogenetic studies identified some close relatives of *Streptomyces* as candidates for subsequent studies.

Conclusion: *Streptococcus* bacteria can be considered as a rich source of secondary metabolites with many applications and can be used as a native to produce the enzyme *urate oxidase*. By using different cloning hosts and examining optimal production conditions, this strain can be a candidate for future studies to develop antimicrobial drugs and compounds.

Keywords: Cloning, *Urate Oxidase*, Real Time PCR, Caspian Sea

***Corresponding Author:** Elahe Ali Asgari (Ph.D), E-mail: e.asgari@gmail.com

Received 26 Aug 2020 **Revised** 16 May 2021 **Accepted** 17 May 2021

Cite this article as: Jenaban NS, Ali Asgari E, Amini K. [Cloning and Expression of *Urate Oxidase* Gene Isolated from Marine *Streptomyces* in *Escherichia coli Origami* Bacteria]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021; 23(3): 84-90. [Article in Persian]

Article ID: Vol23-44

© The author(s)

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان

پاییز ۱۴۰۰ / دوره ۲۳ / شماره ۳ (پی در پی ۷۹)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

کلونینگ و بیان ژن اورات اکسیداز استرپتومایسس جدا شده از دریا در باکتری *اشریشیاکلی اوریگامی*

نیره سادات جنابان [۱] ، دکتر الهه علی عسگری*[۲] ، دکتر کیومرث امینی [۳]

[۱] کارشناس ارشد زیست شناسی، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *استرپتومایسس‌ها باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت و هوازی هستند که از منابع متفاوت جدا می‌شوند. این باکتری‌ها توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد فعال بیولوژیکی را دارند و از این جهت در زمینه بیوکنترل بسیار حائز اهمیت هستند. اورات اکسیداز یکی از فراورده‌های آنزیمی میکروبی است که از منابع مختلفی از جمله استرپتومایسس قابل استخراج است. این مطالعه به منظور کلونینگ و بیان ژن اورات اکسیداز استرپتومایسس جدا شده از دریا در باکتری اشریشیاکلی اوریگامی انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی تعداد ۶۰ نمونه آب و رسوب از اعماق متفاوت سواحل دریای خزر در استان مازندران جمع‌آوری گردید. آزمون‌های رنگ آمیزی گرم، متیل رد، VP، سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، احیا نیترات، اکسیداز وکاتالاز برای تعیین هویت و جداسازی استرپتومایسس دریا انجام شد. ژن اورات اکسیداز توسط روش کلونینگ T-A با استفاده از وکتور PTG-19 در درون میزبان اشریشیاکلی اوراگامی کلون گردید. بیان ژن کلون شده در کلنی‌های نوترکیب توسط روش Real time PCR بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزارهای clustalX و Mega5درخت فیلوژنی رسم گردید.*

یافته‌ها: *غربالگری نمونه‌های آب دریا ۱۲ ایزوله استرپتومایسس را شناسایی کرد که همگی دارای ژن اورات اکسیداز بودند. بیان ژن اورات اکسیداز در اشریشیاکلی اوریگامی توسط روش Real-Tima PCR به اثبات رسید. نتـایج بررسی‌های فیلوژنتیکی، برخی خویشاوندان نزدیک استرپتومایسس را به عنوان کاندید مطالعات بعدی معرفی نمود.*

نتیجه‌گیری: *باکتری استرپتومایسس می‌تواند به عنوان منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای فراوان مورد توجه قرار گیرد و به عنوان سویه‌ای بومی به منظور تولید آنزیم اورات اکسیداز به کار رود. با به کار بردن میزبان‌های کلونینگ مختلف و بررسی شرایط بهینه تولید، این سویه می‌تواند نامزد مطالعات آینده به منظور ساخت داروها و ترکیبات ضدمیکروبی باشد.*

واژه‌های کلیدی: *کلونینگ ، اورات اکسیداز ، Real Time PCR ، دریای خزر*

* نویسنده مسؤول: دکتر الهه علی عسگری ، پست الکترونیکی e.asgari@gmail.com

نشانی : تهران، جاده خاوران، خیابان شهید باهنر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق (قیام دشت)، تلفن ۰۲۱-۹۱۳۱۲۱۴۱

وصول مقاله ۱۳۹۹/۶/۵، اصلاح نهایی ۱۴۰۰/۲/۲۶، پذیرش مقاله ۱۴۰۰/۲/۲۷

مقدمه

با توسعه کشورها و پیشرفت صنایع مختلف، آلودگی محیط زیست توسط پسماندهای صنایع افزایش یافته و به گسترش امراض و ایجاد طیف وسیعی از مقاومت‌های دارویی منجر شده است. بسیاری از ترکیبات آلوده کننده دارای ساختارهای بسیار پیچیده بوده، تجزیه بیولوژیکی آنها بسیار دشوار و در مقادیر کم نیز قادر به ایجاد بیماری از جمله سرطان هستند. بنابراین یافتن راه‌های تجزیه این مواد و تولید مواد دارویی موثر اجتناب ناپذیر است. بدین منظور استفاده از روش‌های آنزیمی به سبب اختصاصیت و کارایی بالای آنزیم‌ها و سازگاری آنها با محیط زیست بسیار حائز اهمیت بوده و استفاده از عوامل بیولوژیک برای تولید این آنزیم‌ها از کارآمدترین و مقرون به صرفه‌ترین روش‌ها است.[۱] آنزیم‌های میکروبی نسبت به آنزیم‌های مشتق شده از منابع گیاهی و جانوری دارای مزیت‌هایی از جمله تنوع فعالیت‌های کاتابولیکی، هزینه تولید کمتر، منابع فراوان‌تر، مواد مضر همراه کمتر، دست کاری ژنتیکی راحت‌تر و حتی کمیت و پایداری نسبی بیشتر است.[۲] برای اولین بار در سال ۱۹۶۰، زوبل و روزنفلد ثابت کردند که باکتری‌های دریایی مواد دارویی موثری تولید

می‌کنند. تاکنون از بین صدها آنزیمی کاربری تولید شده بیش از نیمی از آنها از قارچ‌ها و مخمرها، یک سوم از باکتری‌ها و بقیه از منابع گیاهی (۴درصد) و منابع جانوری (۸درصد) استخراج شده‌اند.[۲]

برتری محیط‌های دریایی به عنوان منبعی برای تولید ترکیبات بیولوژیک به دلیل فراوانی زیاد این اکوسیستم بر سطح کره زمین، تنوع زیاد جانداران آن و پتانسیل بالای این جانداران در تولید طیف وسیعی از مواد، شوری آب دریا و مشابهت الکتروشیمیایی آن به پلاسمای خون انسان و سمیت کمتر محصولات آن است.[۳و۴] باکتری‌های دریایی آنزیم‌های متفاوتی را بر اساس زیستگاه و ساختار اکولوژیکی تولید می‌کنند.[۵]

در حدود ۲۳۰۰۰ متابولیت ثانویه فعال زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها تولید و گزارش شده است که از این تعداد بیش از ۱۰۰۰۰ مورد آنها توسط اکتینومیست‌ها تولید شده است. اکتینومیست‌ها گروه حد واسط بین باکتری‌ها و قارچ‌ها و رشته‌ای‌ترین باکتری‌ها بوده، گرم مثبت و اساساً هوازی هستند. *استرپتومایستاسه* یکی از مفیدترین خانواده‌های راسته اکتینومیست‌ها است که شمار زیادی متابولیت‌های ثانویه جدید از جمله آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها تولید می‌نماید. معروف‌ترین جنس این خانواده *استرپتومایسس* است.[۲و۴و۶] این جنس از رسوبات دریایی خاک، آب و منابع مختلف دیگر جدا می‌شود. بیش از ۵۰۰ گونه *استرپتومایسس* وجود دارد که ظاهر خشک کلنی بالغ، فشردگی طبیعی و رنگ آن بر روی محیط بلاد آگار تشخیص کلنی‌های *استرپتومایسس* را آسان می‌کند.[۷] در میان ترکیبات تولید شده توسط اکتینومیست‌ها، ۷۶۰۰ مورد توسط جنس *استرپتومایسس* تولید شده است. در میان میکروارگانیسم‌های دریا، اکتینومیست‌ها به دلیل تولید ترکیبات شیمیایی متنوع با طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی شناخته شده مانند فعالیت ضدمیکروبی، دارای اهمیت بسیاری هستند.[۸] از جمله آنزیم های مورد استفاده در اهداف تجزیه‌ای و دارویی می‌توان به *اورات اکسیداز* اشاره نمود. آنزیم اوریکاز یا *اورات اکسیداز* یک آنزیم تترامر پراکسیزومی متعلق به کلاس اکسیدازهای بدون کوفاکتور بوده و در مسیر کاتابولیسم پورین‌ها، اکسیداسیون اوریک اسید به ۵ -هیدروکسی ایزواورات را کاتالیز می‌نماید. ترکیب اخیر در نهایت به آلانتوئین تبدیل می‌شود که ۱۰ برابر محلول‌تر از اسید اوریک بوده و به راحتی توسط کلیه‌ها دفع می‌گردد.[۲] علیرغم توزیع گسترده این آنزیم در میکروارگانیسم‌ها و پستانداران، ژن اوریکاز در ژنوم پریمات‌های عالی (میمون و انسان) در طی تکامل غیرفعال شده است. لذا در این جانداران اسید اوریک محصول نهایی کاتابولیسم پورین‌ها است. در وضعیت سلامت تولید و دفع اسید اوریک در بدن متعادل است. در صورت بر هم خوردن این تعادل، افزایش غلظت اسید اوریک در خون منجر به بیماری هیپراوریسمی و متعاقباً شکل‌گیری کریستال‌های اوریک اسید در مفاصل و دستگاه اداری و ابتلا به نقرس و نفروپاتی خواهد شد. تجویز *اورات اکسیداز* به منظور کاهش تجمع اورات سمی، روشی درمانی برای تیمار اختلالات مذکور بوده و در کاهش اسید اوریک ناشی از سندروم لیز تومور نیز مؤثر است.[۱] امروزه یکی از منابع تولید آنزیم اوریکاز *استرپتومایسس* است.[۹] با پیدایش تکنولوژی DNA نوترکیب و امکان دستکاری برخی از گونه‌های جانداران، شرایط تولید بیشتر این مواد موثر بهینه، شده است.[۵] هدف از مطالعه حاضر کلونیگ ژن *اورات اکسیداز* *استرپتومایسس*های جدا شده از آب دریا در باکتری *اشریشیاکلی اوریگامی* به منظور تولید آنزیم *اورات اکسیداز* بود. با رسم درخت فیلوژنیک روابط تکاملی بین *استرپتومایسس*های جدا شده و سایر گونه‌های میکروارگانیسم‌ها بررسی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی تعداد ۶۰ نمونه آب و رسوب از اعماق متفاوت سواحل دریای خزر در استان مازندران در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری گردید.

نمونه برداری *استرپتومایسس*: سواحل دریای خزر در استان مازندران به ۵ ایستگاه تقسیم شد و در هر ایستگاه شش نمونه آب و شش نمونه رسوب از اعماق ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ سانتی‌متری جمع‌آوری گردید. همچنین یک نمونه آب و یک نمونه رسوب از مصب رودخانه‌ها جمع‌آوری شد. مکان‌هایی جهت انجام نمونه‌گیری انتخاب گردید که کمترین فعالیت انسانی در آنها وجود داشت و نیز شرایط اکوسیستم از جمله عمق برداشت نمونه، فاصله از ساحل، زمان نمونه گیری در فصل و در شبانه روز، به صورت دقیق همسان‌سازی گردید.

خالص‌سازی کلنی های مشکوک به *استرپتومایسس*: پس از کشت اولیه، رقت‌های ضریب ۱۰۰ از هر نمونه تهیه و بر روی محیط مارین آگار کشت سفره‌ای داده شد. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت پر گنه‌های مختلف باکتریایی در محیط کشت آشکار گردید. کلنی‌هایی که دارای شباهت ظاهری به کلنی‌های *استرپتومایسس* تهیه شده از بانک میکروبی بودند؛ در محیط جدید تریپتیک سوی آگار کشت خطی داده شدند.

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به *استرپتومایسس*: بررسی‌های ماکروسکوپی شامل مشاهده ساختار و رنگ‌آمیزی کلنی‌های باکتریایی در محیط کشت، میکروسکوپی شامل مشاهده مورفولوژی باکتری‌ها در زیر میکروسکوپ و تست‌های بیوشیمیایی شامل آزمون‌های گرم، متیل رد،VP، سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، احیا نیترات، اکسیداز وکاتالا به منظور تعیین هویت جدایه‌های مشکوک به *استرپتومایسس* انجام گردید.

کلون کردن ژن *اورات اکسیداز* در باکتری *اشریشیا کلی اوریگامی*

واکنش PCR: استخراج DNA باکتری توسط کیت استخراج ذخایر مرکز ژنتیک ایران انجام گردید. محصولات استخراج بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شده سپس واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ژن *اورات اکسیداز* (جدول یک) انجام گردید. محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت Bioneer ارسال شد.

جدول ۱ : پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژن‌های *اورات اکسیداز* و 16srRNA

Primer Name	Primer Sequence
Uricase F	GATATACCATGGCAGCCG
Uricase R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
16srRNA F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16srRNA R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

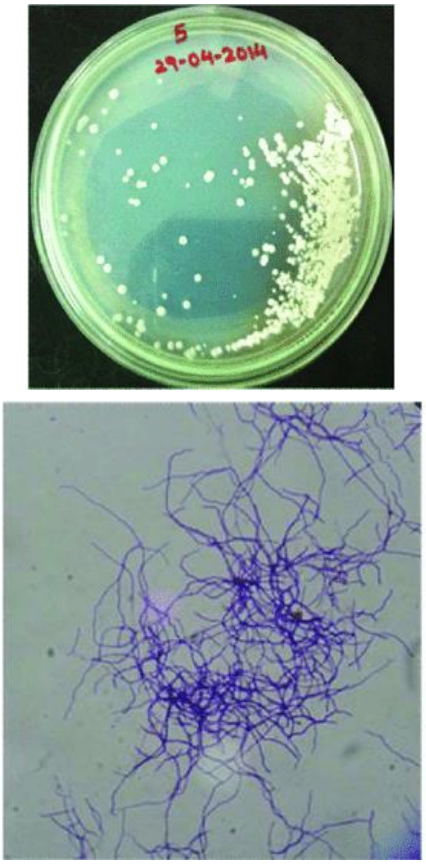
TA Cloning : به منظور کلون کردن محصول PCR، از کیت PCR TA-Cloning شرکت سینا ژن استفاده شد. وکتور PTG19-T به عنوان ناقل، BamH1 به عنوان آنزیم محدودگر و باکتری *E.Coli* سویه *اریگامی* تهیه شده از دانشگاه تهران به عنوان میزبان به کار گرفته شد که سویه نوترکیب تجاری حساس به کانامایسن بوده و به سبب دارا بودن موتاسیون‌هایی در برخی ژن‌های دخیل در متابولیسم از جمله گلوتاتیون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز، در محیط کشت قابلیت کنترل و ردیابی دارد. غربالگری ورود وکتور به میزبان توسط محیط دارای آمپی‌سیلین و شناسایی باکتری‌های نوترکیب توسط غربالگری سفید-آبی در محیط IPTG-XGAL انجام گردید. تایید حضور ژن *اورات اکسیداز* درون کلنی‌های سفید توسط تعیین توالی ناحیه با پرایمرهای ژن *اورات اکسیداز* و نیز پرایمر M13 به انجام رسید.

تعیین میزان بیان ژن *اورات اکسیداز* با روش Real time PCR: استخراج RNA توسط میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) از سوسپانسیون باکتریایی کلنی‌های سفید در فاز نمایی رشد (در OD600=۰/۴-۰/۶) انجام شد. خلوص و کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ و فرایند ژل الکتروفورز تایید گردید. سنتز CDNA با استفاده از کیت تاکارا انجام شده و واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت شرکت Genet bio کره جنوبی به انجام رسید. ژن خانگی بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژنی آنزیم *اورات اکسیداز* و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار REST استفاده گردید. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد با استفاده از روش ΔΔCT انجام شد.

رسم درخت فیلوژنی: با استفاده از پرایمرهای ارایه شده در جدول یک، PCR ژن‌های 16srRNA در دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد و تعیین توالی در شرکت Bioneer انجام گردید. توالی‌های حاصله پس از بررسی در نرم‌افزارBioEdit، توسط DNA Baser مکمل‌سازی گردید. نتیجه با جدایه‌های ثبت شده در NCBI از طریق n Blast مقایسه شد و سپس در نرم‌افزار W Clustal هم ردیف گردید. سپس با استفاده از برنامه MEGA 5.10 درخت‌های فیلوژنیک ترسیم شدند و با استفاده از روش الحاق ترسیم M در برنامه Neighbor Joining همسایه شدند. پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel (Version: 15.0.4675-64bit) نمودار مربوطه رسم شد.

یافته‌ها

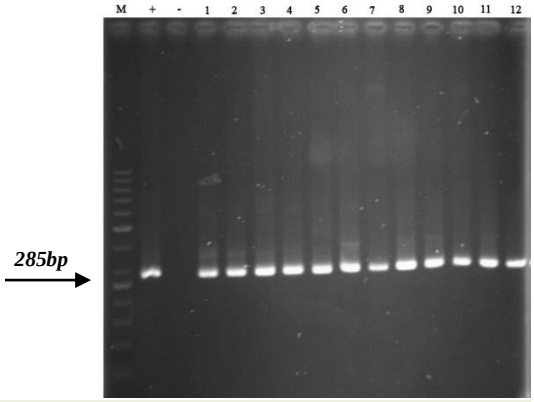
جداسازی و تعیین هویت *استرپتومایسس* دریا: به منظور غربالگری کلنی‌های مشکوک به *استرپتومایسس*، رنگ آمیزی گرم انجام شده و باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت انتخاب شدند (شکل یک). سپس جدایه‌هایی که نتایج تست‌های بیوشیمیایی آنها با نتایج مورد انتظار برای *استرپتومایسس* انطباق داشت؛ جدا گردیدند. به طور کلی از نمونه‌های آب دریا که به آزمایشگاه ارسال شد، براساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی، ۱۲ ایزوله *استرپتومایسس* جداسازی گردید.



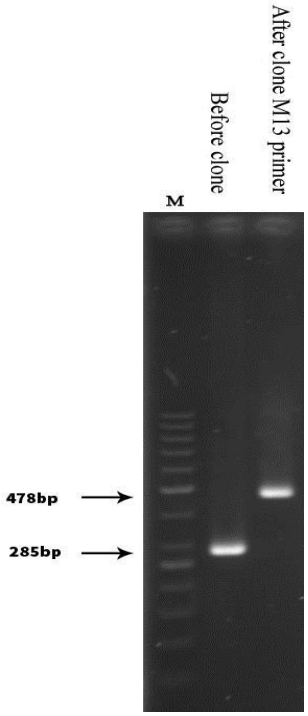
شکل ۱ : ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های استرپتومایسس حاصل از غربالگری

واکنش PCR: نتیجه الکتروفورز محصولات PCR ژن *اورات اکسیداز* در شکل ۲ نشان داده شده است. از ۱۲ سویه استرپومایسس جدا شده همگی واجد ژن *اورات اکسیداز* بودند. محصولات PCR

ژن *اورات اکسیداز* برای تعیین توالی به شرکت Bioneer ارسال گردید.



شکل ۲ : الکتروفورز محصولات PCR ژن اورات اکسیداز برای ۱۲ سویه جداسازی شده. چاهک اول مارکر ۵۰ جفت بازی، دوم کنترل مثبت و سوم کنترل منفی

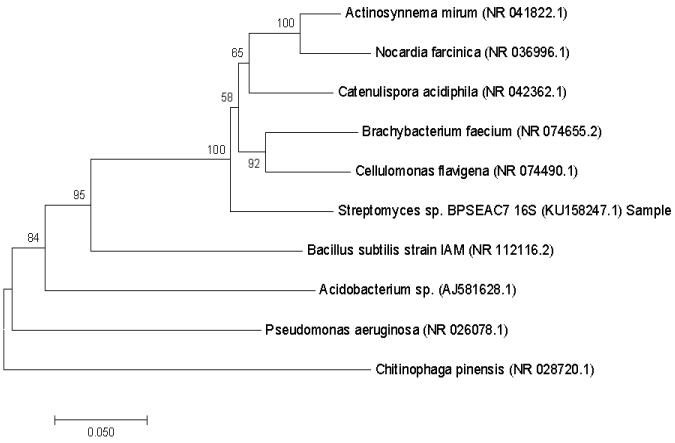


شکل ۳ : الکتروفورز محصول PCR انجام شده توسط پرایمرهای M13 بر روی کلون‌های نوترکیب و غیرنوترکیب و تایید وجود قطعه insert درون وکتور نوترکیب (ژل آگارز ۲ درصد)

تولید کلون‌های نوترکیب در T-A Cloning: از محیط کشت دارای کلنی‌های سفید و آبی، کلنی‌های نوترکیب سفید برای مراحل بعد جمع‌آوری شدند. همچنین توسط پرایمرهای M13، PCR انجام شده و اختلاف اندازه محصول PCR قبل و بعد از کلونینگ معین گردید. همانطور که در شکل ۳ مشخص است؛ قطعه ژنی *اورات اکسیداز* در وکتور وارد گردیده است. همچنین تعیین توالی ناحیه اتصال نیز موید ورود قطعه ژنی به محل مورد نظر است.

نتایج بررسی میزان بیان ژن کلون شده توسط PCR Real time: پس از استخراج RNA و انجام فرایند Real Time PCR، میزان بیان ژن *اورات اکسیداز* در باکتری نوترکیب و غیر نوترکیب در مقایسه با ژن کنترل 16s-rRNA مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد که ژن *اورات اکسیداز* در *اشریشیاکلی* نوترکیب بیان شده و در *اشریشیاکلی* غیر نوترکیب بیان ندارد.

نتایج رسم درخت فیلوژنی: درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) با استفاده از نتایج تعیین توالی انجام شده بر روی این محصولات PCR رسم شد (شکل ۴). گونه‌های *استرپتومایسس* با بوت استرپ ۱۰۰ درصد و باسیلوس سوبتیلیس با بوت استرپ بالای ۹۶ درصد در یک خوشه قرار گرفتند که بیانگر رابطه خوشاوندی نزدیک آنها با یکدیگر است.



شکل ۴ : درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16S r DNA استرپتومایسس

بحث

با توجه به نتایج این مطالعه، Real-Tima PCR روش مناسبی برای بیان ژن *اورات اکسیداز* در *اشریشیاکلی اوریگامی* تعیین شد.

نیاز روز افزون جامعه بشری تولید داروهایی با تاثیرگذاری مناسب و کمترین عوارض جانبی است. همچنین آنزیم‌های کمک کننده به سلامت و بقاء حیات با تجزیه مواد زائد محیط، باعث شده است که تحقیقات بر منابع زیستی متمرکز گردد. منابع میکروبی مقرون به صرفه‌ترین و سریع‌ترین سیستم‌های تولیدی هستند. از جمله آنزیم‌های مهم *اورات اکسیداز* است که به دلیل کاربرد گسترده در صنایع دارویی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است. به علت خواص درمانی و ضدتوموری این آنزیم تاکنون مطالعات متعددی به منظور جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد این آنزیم به عمل آمده است. اکثر میکروارگانیسم‌هایی که دارای فعالیت *اورات اکسیدازی* هستند؛ از خاک جدا شده‌اند. با این حال مطالعات زیادی وجود دارد که جداسازی این میکروارگانیسم‌ها از زیستگاه‌های آبی را گزارش نموده‌اند.[۳و۱۰] به علت فراوانی آب در سطح کره زمین،

جداسازی این میکروارگانیسم‌ها از آب مژده دهنده کشف منبع بزرگی از کارخانجات تولید دارو و آنزیم است. در مطالعه حاضر باکتری‌های مولد به کار رفته، از دریا استخراج شدند.

ایمانی و همکاران ژن کدکننده‌ی اوریکاز را از طریق ناقل پلاسمیدی pET-28a (+) به باکتری Bl21 انتقال دادند و با بررسی بیان این پروتئین شرایط بیان حداکثری آن را بهینه کردند. نتایج نشان داد که ژن اوریکاز را می‌توان به آسانی در سیستم بیانی pET کلون و بیان کرد.[۱۱] این نتیجه با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

اصغری و همکاران به بررسی سویه‌های آرکی نمک دوست مولد آنزیم اوریکاز به عنوان یک منبع جدید تولید این آنزیم پرداختند و شرایط بهینه رشد این آرکی‌ها را ارزیابی کردند و فعالیت آنزیم تولید شده توسط آنها را در شرایط فیزیولوژیک بدن آزمودند.[۲]

جامعی و همکاران وکتور بیانی pET28a حاوی ژن اوریکاز آسپرژیلوس فلاووس را به *اشریشیاکلی* سویه *BL21* منتقل نموده و پروتئین نوترکیب بیان شده را با ستون کروماتوگرافی نیکل آگارز تخلیص کردند.واثر دما و افزودنی‌های مختلف از جمله گلوکز بر پایداری پروتئین را آزمودند. نتایج نشان داد که افزودنی‌هایی همچون گلوکز که باعث افزایش کشش سطحی می‌شوند؛ بیشترین اثر پایدارکنندگی را روی آنزیم اوریکاز دارند. افزایش پایداری پروتئین تاثیر بسیار زیادی در دوام دارویی داشته و می‌تواند مورد بررسی قرار گیرد.[۴]

گزارشات مشابهی از کلون کردن ژن *اورات اکسیداز* استخراج شده از سودوموناس آئروژینوزا، Streptomyces cyanogenus و غیره در میزبان‌های مختلف *E.coli* از جمله (*DE3*) *BL21* ارائه شده است.[۱و۹و۱۲] غربالگری و شناسایی منابع جدید مولد اوریکاز می‌تواند استفاده‌های قابل توجهی برای اهداف درمانی و کاربردهای بیوشیمی بالینی داشته باشد. تحقیق حاضر نیز باکتری *استرپتومایسس* استخراج شده از بستر دریا را به عنوان منبعی بومی برای تولید آنزیم *اورات اکسیداز* و ساخت داروها و ترکیبات ضد میکروبی و ضدقارچی مطرح کرده و با ترسیم درخت فیلوژنیک کاندیدهای قدرتمند دیگری که در خویشاوندی با این باکتری هستند را به عنوان نامزدهای مطالعات بعدی معرفی می‌نماید. در مطالعه حاضر کلونینگ ژن *اورات اکسیداز استرپتومایسس* در باکتری *E.coli* اوریگامی مورد آزمون قرار گرفت. مطالعات بعدی می‌تواند در راستای بهینه‌سازی شرایط مختلف برای تولید این آنزیم باشد. بهینه‌سازی شرایط شامل تغییر محرک‌های رشد باکتری، تغییر دما، تنظیم دقیق غلظت IPTG، Xgal و نیز استفاده از محیط‌های کشت غنی‌سازی شده است. با توجه به این که هر باکتری شرایط رشدی منحصر به فرد خود را می‌طلبد؛ با شناسایی این شرایط و عوامل رشد و تکثیر بهینه که منجر به افزایش جمعیت باکتری‌ها می گردد؛ به صورت ضمنی محصولات تولید شده از این باکتری‌ها نیز افزایش می‌یابد. علاوه بر این با شناسایی دقیق ساختار ژن‌هایی که محصولات آنها برای تولید مناسب است؛ می‌توان به شاه کلیدهای تنظیمی بیان آن ژن‌ها دست یافته و با ایجاد محرک‌هایی در محیط کشت، بیان ژن‌های مذکور را در حد بهینه افزایش داد. همچنین با یافتن روش‌های مناسب برای پرورش میکروارگانیسم مولد و یا تثبیت آنزیم می‌توان بازده تولید *اورات اکسیداز* را تا چند برابر افزایش داد. قابل ذکر است که در مطالعه حاضر کلونینگ ژن *اورات اکسیداز* به انجام رسیدت و از بررسی بیان جهت تایید انجام صحیح کلونینگ استفاده گردید. بررسی حضور ژن *اورات اکسیداز* در سایر باکتری‌ها، شناسایی ژن سایر آنزیم‌های مفید در *استرپتومایسس* دریا، کلونینگ *اورات اکسیداز* در سایر سلول‌های مستعد و باکتری‌های میزبان مختلف به منظور یافتن مناسب‌ترین سیستم بیانی، پیشنهاد می‌گردد. تولید *اورات اکسیداز* در باکتری‌های متعددی به انجام می‌رسد. باکتری‌ها به سبب پتانسیل بالایی که در دستکاری ژنتیکی و کلونینگ دارند؛ منبع ارزان قیمت و سریعی در تولید داروهای بیولوژیک هستند. آنزیم‌های تولید شده توسط باکتری‌ها سازگاری بالایی در انسان دارند. با شناسایی اقسام متفاوت باکتری‌های تولید کننده داروها و آنزیم‌ها طیف وسیع‌تری از داروهای بیولوژیک قابل دستیابی خواهند بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که باکتری *استرپتومایسس* می‌تواند به عنوان منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای فراوان مورد توجه قرار گیرد و به عنوان سویه‌ای بومی به منظور تولید آنزیم *اورات اکسیداز* به کار رود. با به کار بردن میزبان‌های کلونینگ مختلف و بررسی شرایط بهینه تولید، این سویه می‌تواند نامزد مطالعات آینده به منظور ساخت داروها و ترکیبات ضدمیکروبی باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم نیره سادات جنابان برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق بود.

References

1. Cheng X, Liu F, Zhang Y, Jiang Y. Cloning and expression of a urate oxidase and creatinine hydrolase fusion gene in Escherichia coli. Ren Fail. 2013; 35(2): 275-8. DOI: 10.3109/0886022X.2012.745787

2. Asghari N, Shahzadeh Fazeli SA, Amoozegar MA. [Screening and biosynthesis of Uricase enzyme-producing salt-loving arc strains]. M.A Thesis. University of Science and Culture. Faculty of Basic Sciences. 2016. [Persian]

3. Tork SE, Aly MM, Elsemin O. A new l-glutaminase from Streptomyces pratensis NRC 10: Gene identification, enzyme purification, and characterization. Int J Biol Macromol. 2018 Jul;

113: 550-57. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.080

4. Ebrahimi Sh, JameiR, Imani M. [Cloning and expression of Uricase gene of Baciluss subtilis in bacterial strain (BL21) E.coli]. M.A Thesis. Faculty of Sciences. Urmia University. 2014.

5. Satoh E, Niimura Y, Uchimura T, Kozaki M, Komagata K. Molecular cloning and expression of two alpha-amylase genes from Streptococcus bovis 148 in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol. 1993 Nov; 59(11): 3669-73. DOI: 10.1128/aem.59.11.3669-3673.1993

6. Kämpfer P. The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. (eds). The Prokaryotes. New York: Springer. 2006; pp: 538-604. DOI: 10.1007/0-387-30743-5_22

7. Mabrouk AM, Hamed ER, Farag MM, Ahmed NE. Purification and Characterization of Uricase Enzyme Produced by Gliomastix gueg. Gate 2 Biotech. 2010; 2(11): 1-13.

8. Song J, Lee SC, Kang JW, Baek HJ, Suh JW. Phylogenetic analysis of Streptomyces spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. Int J Syst Evol Microbiol. 2004 Jan; 54(Pt 1): 203-209. DOI: 10.1099/ijs.0.02624-0

9. Ohe T, Watanabe Y. Purification and properties of urate oxidase from Streptomyces cyanogenus. J Biochem. 1981 Jun; 89(6): 1769-76. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133376

10. Ciesarova Z, Kiss E, Boegl P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. J Food and Nutr Res. 2006;45(4):141-46.

11. Imani M, Pazhang M, Mirzaeinia S. [Cloning and Expression of Therapeutic Enzyme, Aspergillus Flavus Uricase in E. coli]. J Adv Med Biomed Res. 2016; 24(106): 109-121. [Article in Persian]

12. Shaaban MI, Abdelmegeed E, Ali YM. Cloning, Expression, and Purification of Recombinant Uricase Enzyme from Pseudomonas aeruginosa Ps43 Using Escherichia coli. J Microbiol Biotechnol. 2015 Jun; 25(6):887-92. DOI: 10.4014/jmb.1410.10041