مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره سوم (پیاپی ۸)، پاییز ۱۳۸۹
صفحات ۱۶۱ - ۱۵۵

Original Article

جداسازی و کلون سازی ژن آنزیم کوتیناز باکتری ترموبیفیدا فوسکا

الهه پورفخرایی[۱]، مهرداد بهمنش[۲]، مجید عرفانی مقدم*[۳]

[۱]کارشناس ارشد، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، [۲]دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، [۳]استادیار گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

سابقه و هدف: آنزیم کوتیناز متعلق به خانواده سرین هیدرولازها است و به دلیل خواص ساختاری و عملکردی در حذف آلودگی‌های زیست محیطی اهمیت بسیار زیادی دارد. هدف از این پژوهش، جداسازی و کلون سازی ژن آنزیم کوتیناز از باکتری ترموبیفیدا فوسکا (*Thermobifida fusca*) بود.

مواد و روش‌ها: نمونه برداری از خاک های جنگلی شمال ایران صورت گرفت. با استفاده از محیط کشت اختصاصی و شرایط محیطی مناسب (pH ۱۰ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد) جداسازی باکتری بومی ترموفیل ترموبیفیدیا فوسکا انجام شد. پس از طراحی پرایمر، ژن کوتیناز (*cut1*) از باکتری یاد شده جدا گردید. سپس در وکتور pBluescript sk کلون و به اشریشیا کلی DH5α انتقال داده شد. به منظور تایید کلون‌سازی، هضم آنزیمی انجام و نمونه‌ها برای تعیین توالی ارسال گردید.

یافته‌ها: در این تحقیق برای یافتن آنزیم کوتیناز با ویژگی‌های مطلوب‌تر، جداسازی و کلونینگ ژن آنزیم کوتیناز از باکتری ترموفیل بومی ترموبیفیدا فوسکا انجام شد. کلون‌سازی به‌کمک روش هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد تایید قرار گرفت. با توجه به نتایج BLAST بیشترین شباهت با ۹۸٪ همانندی با آنزیم کوتیناز *cut1* و ۹۶٪ شباهت با آنزیم کوتیناز cut-1.KW3 در باکتری ترموبیفیدا فوسکا مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با استفاده از آنزیم کوتیناز کلون شده در این تحقیق و با توجه به طیف وسیع عملکردی آن در برابر سوبستراهای متنوع و قابلیت تجزیه و سنتز انواع ترکیبات پلی استری، این آنزیم می‌تواند در رفع آلودگی‌های زیست محیطی نقش مهمی ایفا کند.

کلمات کلیدی: ترموبیفیدا فوسکا، کوتیناز، کلون سازی

دریافت مقاله: خرداد ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: مرداد ۱۳۸۹

مقدمه

کوتیناز یک آنزیم هیدرولازی است که کوتین را تجزیه می‌کند. کوتین در بیشتر گیاهان وجود دارد و دارای ترکیبات پلی‌استری هیدروکسی و اپوکسی اسید چرب (شکل ۱) است (۱). کوتین یک پلی‌استر بسیار هیدروفوب غیرمحلول در آب و از مشتقات گاما هیدروکسی اسید چرب می‌باشد که درساختار کوتیکول گیاهان وجود دارد (۲) و نقشی کلیدی در حفاظت از گیاه دربرابر عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند (۳). درواقع کوتیکول یک لایه‌ی محافظ چربی دوست است که برگ ها، ساقه‌ها و میوه ها را می‌پوشاند. روی کوتیکول لایه‌ای از موم پوشیده شده است که علاوه بر این‌که مانع از تبخیر آب گیاه می‌شود در برابر عوامل بیماری‌زا و آفات نیز از گیاه حفاظت می‌کند (۴).

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوفیزیک
تلفن: ۰۹۱۲۵۷۹۹۴۴۳
پست الکترونیکی: majid.erfani@gmail.com

کوتیناز توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی‌استرهای کوچک را داراست (شکل۲). یکی از مشکلات زیست محیطی در جوامع امروزی تجزیه‌ی زباله‌ها در محیط زیست است. کوتیناز به عنوان یک آنزیم سبز می‌تواند توانایی از بین بردن زباله‌های پلی‌استری را دارا باشد و می‌توان از آن در سنتز پلی‌استرهای قابل تجزیه در طبیعت استفاده کرد (۵).

باکتری ترموبیفیدا فوسکا (*Thermobifida fusca*) یک اکتینومیست ترموفیل است که نقش مهمی در تجزیه‌ی گیاهان در خاک و تولید کودها بر عهده دارد. از نکات جالب توجه این است که باکتری یاد شده در دمای ۶۰ درجه و pH ۱۰ به رشد خود ادامه می‌دهد. در حالی که این شرایط برای بیشتر موجودات زنده غیر قابل تحمل است (۶).

یکی از خصوصیات ویژه آنزیم کوتیناز، فعالیت آن با گستره‌ای از سوبستراهای مختلف می‌باشد که باعث شده این آنزیم در صنعت و تکنولوژی مورد توجه قرار گیرد. آنزیم کوتیناز قارچ فوزاریوم سولانی پیسی (*Fusarium solanipisi*) که در مقایسه با سایر کوتینازها دارای بیشترین میزان فعالیت می باشد. اما کوتیناز باکتری ترموبیفیدا فوسکا در برابر دما و حلال‌های آلی پایداری بسیار بیشتری را از خود نشان می‌دهد. با توجه به ویژگی‌های خاص آنزیم کوتیناز و کاربردهای آن در صنعت و بیوتکنولوژی و نیز چشم‌انداز روشن در فرآیند تجزیه‌ی پلاستیک و آلاینده‌های پلی استری موجود در طبیعت، یافتن آنزیمی با شرایط مطلوب‌تر همواره مورد توجه بوده است. آنزیم‌های کوتیناز گونه‌های باکتریایی تاکنون به میزان کمتری مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آنزیم مورد مطالعه در این تحقیق، کوتیناز باکتری ترموفیل از گونه‌ی ترموبیفیدا فوسکا است که دارای توان مقاومت بالا در برابر pH، دما و حلال‌های آلی است (۷ و ۸).

هدف از این پژوهش، جداسازی سویه بومی باکتری ترموفیل ترموبیفیدا فوسکا، کلون‌سازی و تعیین توالی ژن کوتیناز آن بود.

مواد و روش‌ها

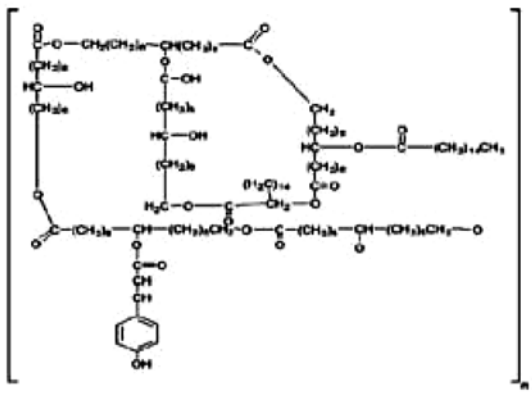
الف) جداسازی: برای جداسازی باکتری ترموبیفیدا فوسکا از خاک جنگل‌های شمال ایران نمونه‌گیری شد و کشت در محیط اختصاصی Czapek Pepton و گرم‌خانه‌گذاری در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH۱۰ به مدت ۱۶ ساعت غنی سازی و سپس به محیط کشت جامد کشت مجدد داده شد. بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، اسپور و تست‌های بیوشیمیایی احیای نیترات، اکسیداز، فسفاتاز، رشد در دامنه‌های حرارتی و pH و محیط‌های تک قندی شناسایی مرفولوژی باکتری صورت گرفت (۹).

به کمک کیت استخراج DNA ژنومی از کمپانی فرمنتاز (Fermentas) ژنوم باکتری استخراج شد و واکنش PCR توسط آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq* از کمپانی فرمنتاز و پرایمرهای طراحی شده از کمپانی سیگما (Sigma) انجام گرفت. پرایمرها به صورت زیر طراحی گردید:

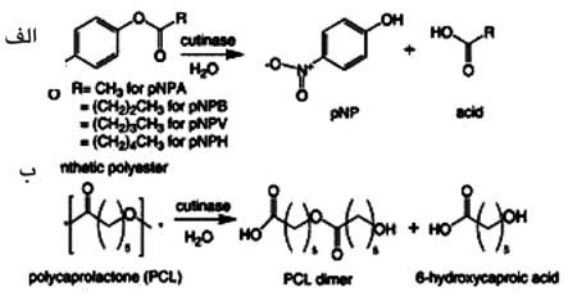
Forward 5'-CGATATTAGGATCCGAAAATCTATATTTCCAAGGAAT GGCCAACCCCTACGAGC -3'

Reverse 5'-TGCTCTGAATTCTCAGAACGGGCAGGTGGAGC-3'

طراحی به کمک ژن کوتیناز ۱ (*cut1*) سویه *Thermobifida fusca* DSM:44342 به شماره ثبت ژنی HQ147787 به کمک



شکل ۱: ساختار کوتین.



شکل۲: توانایی تجزیه (الف) و سنتز (ب) ترکیبات پلی استری توسط آنزیم کوتیناز.

جدول ۱: برنامه دمایی مورد استفاده در PCR برای تکثیر ژن *cut1*.

مراحل انجام	دمای واکنش(°C)	زمان واکنش	تعداد تکرار
مرحله اولیه	۹۵	۲ دقیقه	۱
دناتوره کردن	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۵
اتصال پرایمرها	۵۵	۳۰ ثانیه	۳۵
طویل سازی	۷۲	۹۰ ثانیه	۳۵
مرحله نهایی	۷۲	۱۵ دقیقه	۱

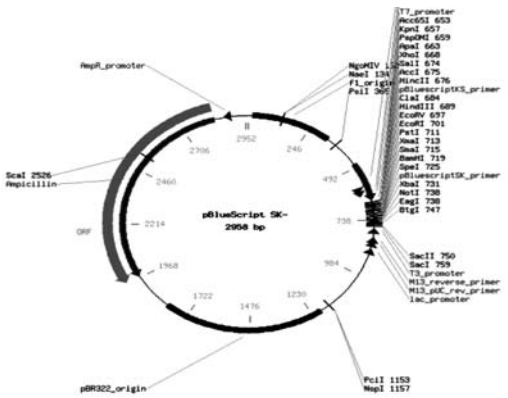
نرم افزار Gene Runner انجام گرفت. برای یافتن دمای اتصال پرایمرها از شیب دمایی در PCR استفاده گردید. برنامه PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای انجام الکتروفورز بافر TAE 50X تا غلظت ×۱ رقیق شد و مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از مارکر ۱kb مناسب کد SM0311 از کمپانی فرمنتاز نمونه‌ها بر روی ژل قرار گرفتند. استخراج باند DNA از ژل به کمک دستگاه Gel dock و با استفاده از تیغ برش انجام گرفت. باندی که اندازه مناسب داشت جدا شد و توسط کیت استخراج DNA از ژل کیاژن مراحل خالص سازی صورت گرفت.

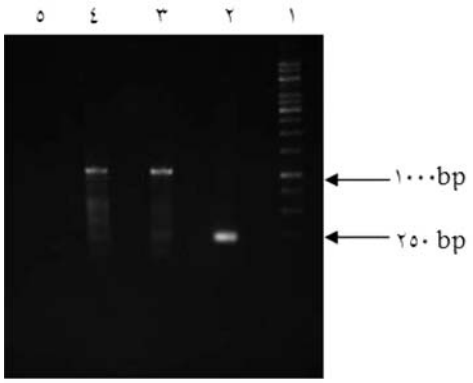
ب) هضم آنزیمی: محصول PCR با جایگاه‌های برش و نیز پلاسمید pBluescriptsk (شکل ۳) توسط آنزیم‌های برش دهنده مشابه هضم شدند. این آنزیم‌ها شامل *BamHI* با ویژگی برش نسبت به توالی GGATCC و *EcoRI* با ویژگی برش نسبت به توالی GAATTC می باشند. هر دو آنزیم ایجاد انتهای چسبنده می‌کنند. واکنش هضم به طور همزمان به مدت ۴ ساعت توسط آنزیم‌های *BamHI* و *EcoRI* انجام شد. از هر آنزیم میزان ۱ میکرولیتر با سمپلر برداشته شد و از بافر مشترک Tango ×۲ به میزان ۴ میکرولیتر و ۱ میکروگرم DNA افزوده گردید و با افزودن آب به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

ج) الحاق محصول *PCR* با پلاسمید *pBluescript sk*: به ترتیب ۱ میکرولیتر ازناقل پلاسمیدی هضم شده با غلظت (۸۰ng/µl)، ۳ و ۱ میکرولیتر از قطعه PCR هضم و تخلیص شده با غلظت (۵۷ng/µl)، ۲میکرولیتر بافر الحاق ×۱۰، آب دیونیزه تا حجم ۲۰ میکرولیتر و در نهایت ۱ میکرولیتر DNA لیگاز *T4* اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید.

د) تراسفورمیشن: برای انجام ترانسفورمیشن ۷۰ میکرولیتر از باکتری‌های مستعد باکتری اشریشیا کلی سویه DH5α به یک



شکل ۳: نقشه وکتور pBluescript sk (۲۹۵۸bp).



شکل۴: ردیف ۱) سایز مارکر 1Kb، ردیف ۲) کنترل مثبت، ردیف‌های ۳ و ۴) ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز و ردیف ۵) کنترل منفی.

جدول ۲: نتایج بلاست ژن کوتیناز ۱ ترموبیفیدا فوسکا.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ147787.1	Thermobifida fusca culture-collection DSM:44342 cutinase 1 (cut1) gene,	1380	1380	99%	0.0	98%	
FR727680.1	Thermobifida fusca cut-1.KW3 gene for cutinase	1279	1279	99%	0.0	96%	
FR727681.1	Thermobifida fusca partial cut-2.KW3 gene for cutinase	1238	1238	98%	0.0	95%	
HQ147785.1	Thermobifida cellulosilytica culture-collection DSM:44535 cutinase 1 (cut:	1230	1230	99%	0.0	94%	
AJ810119.1	Thermobifida fusca bta1 gene for BTA-hydrolase 1 and bta2 gene for BTA	1229	2419	99%	0.0	95%	
CP000088.1	Thermobifida fusca YX, complete genome	1223	2413	99%	0.0	95%	
HQ147784.1	Thermobifida alba culture-collection DSM:43185 cutinase 1 (cut1) gene,	1203	1203	99%	0.0	94%	
HM193859.1	Thermobifida fusca strain NTU22 acetylxylan esterase gene, partial cds	1192	1192	95%	0.0	95%	
HQ147786.1	Thermobifida cellulosilytica culture-collection DSM:44535 cutinase 2 (cut:	1186	1186	99%	0.0	93%	
AB445476.2	Thermobifida alba est1, est2 genes for esterase, complete cds	785	1533	98%	0.0	85%	
U03114.2	Streptomyces albus lipase precursor (lip) and LipR genes, complete cds;	267	267	78%	1e-67	75%	
AL939106.1	Streptomyces coelicolor A3(2) complete genome; segment 3/29	244	244	91%	5e-61	74%	
AF009336.1	Streptomyces coelicolor lipase (lipA), and LipR activator (lipR) genes, com	244	244	91%	5e-61	74%	
CP000750.2	Kineococcus radiotolerans SRS30216, complete genome	239	239	79%	3e-59	74%	
CP002896.1	Amycolatopsis mediterranei S699, complete genome	167	167	91%	1e-37	72%	
CP002000.1	Amycolatopsis mediterranei U32, complete genome	167	167	91%	1e-37	72%	
M86351.1	Streptomyces sp. triacylglycerol acylhydrolase (lipA) and lipA transcriptio	167	167	91%	1e-37	72%	
CP001738.1	Thermomonospora curvata DSM 43183, complete genome	137	137	56%	9e-29	73%	

میکروتیوب سرد منتقل و ۱۰ میکرولیتر محصول الحاق به میکروتیوب اضافه شد و سپس مراحل انتقال با روش شوک دمایی انجام گردید.

ه) غربال‌گری کلون‌های مثبت: این مرحله با استفاده از PCR-Cloning و نیز هضم توسط آنزیم‌های برش دهنده *BamHI* و *EcoRI* انجام شد.

و) تعیین توالی *DNA* کلون شده: پلاسمید دارای ژن مورد نظر توسط کیت کیاژن استخراج و جهت تعیین توالی ارسال گردید.

نتایج

برای طراحی پرایمر از ژن کوتیناز ۱ (*cut1*) سویه *Thermobifida fusca* DSM:44342 به شماره ثبت ژنی HQ147787 به عنوان الگو استفاده شد. نتیجه PCR پس از الکتروفورز به صورت زیر در ژل مشاهده شد (شکل ۴). در ردیف ۳ و ۴ ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰bp دیده می شود. ردیف ۲ وکتور بدون قطعه مورد نظر است که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

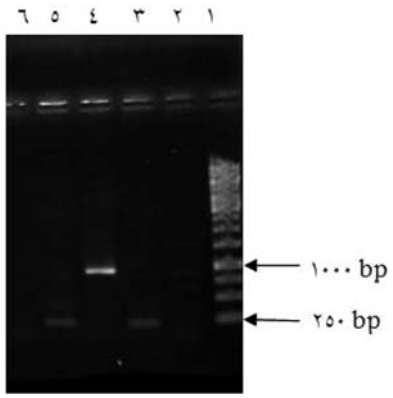
PCR-cloning: در ردیف ۲ و ۴ ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰bp مشاهده می‌گردد (شکل ۵). با توجه به سایز قطعه، کلنی‌های مناسب برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند.

نتیجه هضم آنزیمی (*digestion*): با توجه به شکل ۶ در هضم آنزیمی صورت گرفته ژن مورد نظر از داخل پلاسمید خارج شده است که نشان دهنده موفقیت آمیز بودن کلون سازی ژن مورد نظر می‌باشد.

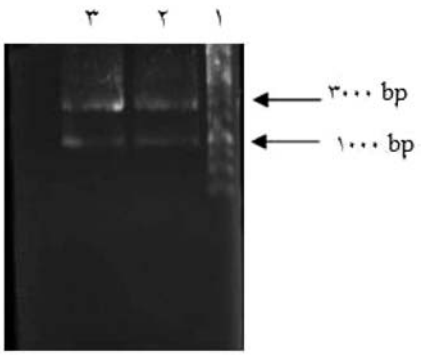
نتیجه تعیین توالی و بررسی آن: پس از تعیین توالی به کمک نرم‌افزار The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) نتایج زیر در جدول ۲ به دست آمد:

توالی ژن به دست آمده در این تحقیق به صورت زیر بود.

-ACTACCGCTCGACCGCCGCCTTCTGAGCC
- G C G A G G T C G A A G
-CCCGGACCGCGCGACGGACTCTTCG
-C C G C T A C A C C C A G T T C C T C T G C



شکل۵: ردیف ۱) سایز مارکر1kb، ردیف‌های ۲ و ۴) ژن مورد نظر با اندازه حدود ۱۰۰۰bp، ردیف ۳) پلاسمید فاقد ژن، ردیف ۵) کنترل مثبت و ردیف ۶) کنترل منفی.



شکل۶: ردیف ۱) سایز مارکر 1kb، ردیف‌های ۲ و ۳) نتیجه هضم آنزیمی اندازه وکتور حدود ۳۰۰۰bp و ژن ۱۰۰۰bp.

-CTGGCTCAAGCGGTTCGTCGACAACGACAC
-CAACAAGATCATCGGCAAGTACAGCGTCGC
-GCGCAACCCACTTCGCCCCGAACATCCC
-CAGCAAGGCCTACCTGGAGCTGGACG
-GCCCTTCTACAACAGCCTCCCGACCTCGAT
-CATCGCTCCGGTCCTCACCCACGCCCG
-CACCCTCATCATCGGTGCTGACCTGGACAC
-AAGAACTGGAGCAGTGTGCGGGTTCC
-CATCCCGCTCACCCCGTGGCACCTCAAC
-GCCTCCCAGCGTCCCGACCTGAAGGCCGC
-TCCATGGGCGGCGGCGGCAGCCTGCGTCTG
-CAGCCGACTGGCGGTCATGGGCCAC
-TCCTCCACGGTGCGCAGCCGGATCGACAG
-GCCGCGCTGAACCACATGATCAACCGGGCG
-CCGGACAGCCGGGCAGAGCAGCTCAAC
-CATCGACACCATCACCACCCTCGACCAG
-CGCCTCCCACGGCTTCGTCGTCATCAC
-GCTTCCATCGCCTGGCTGGGCGAGCGCAT
-GCGATCTCCCCCGGCTACACCGGCACTGAG
-CCGCGGGAGAACAACACCTACGGTGCGGTG
-CGGCTTCGGCGGCGGCACCATCTACTAC
-CGAGGAGAACGTCTCCCGGTTGAGCGCCAG
-GCCCGCAGCGGCCCCTTCTCCGTCAG
-CCGAACCCCACGGACGCCCTCCTCGAT
ATCGCCAACGCCTACGACCGGGGC

بحث

آنزیم کوتیناز از خانواده‌ی سرین هیدرولازها بوده و دارای پیچش α/β هیدرولاز می‌باشد. زیر خانواده‌ی رایج کوتینازها شامل ۲۰ عضو است که دارای توالی آمینو اسیدی مشابه هستند. آنزیم کوتیناز در قارچ ها و باکتری‌ها یافت شده است. اگر چه کوتینازهای قارچی و باکتریایی دارای خصوصیات کاتالیتیکی و مکانیسم عمل مشابه هستند اما از نظر توالی و ساختار متفاوتند، از این رو پیشنهاد می‌شود به دو زیر خانواده‌ی کوتینازهای یوکاریوتی و پروکاریوتی تقسیم شوند. بیشتر مطالعات بر روی آنزیم‌های قارچی صورت گرفته است. اما آنزیم‌های باکتریایی از پایداری و مقاومت بیشتری برخوردارند. کوتیناز توانایی هیدرولیز انواع استرها و پلی استرهای کوچک را داراست. یکی از مشکلات زیست محیطی در جوامع امروزی تجزیه‌ی زباله‌های پلی استری و پلاستیک در محیط زیست است. کوتیناز به عنوان یک آنزیم سبز می تواند قادر به از بین بردن زباله‌های پلی‌استری باشد و می‌توان از آن‌ها در سنتز پلی استرهای قابل تجزیه در طبیعت استفاده کرد.

باکتری ترموبیفیدا فوسکا یک اکتینومایست ترموفیل است که نقش مهمی در تجزیه‌ی گیاهان در خاک و تولید کودها بر عهده دارد. آنزیم کوتیناز در باکتری ترموفیل ترموبیفیدا فوسکا در مقایسه با گونه‌ی فوزاریوم سولانی دارای پایداری بسیار بالا در حلال‌های آلی و همچنین پایداری دمایی بیشتری می‌باشد، در حالی‌که فعالیت نزدیک به کوتیناز قارچی مذکور در برابر سورفاکتانت‌ها و یون‌های فلزی را از خود نشان می‌دهد.

با توجه به رشد باکتری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط قلیایی (pH۱۰)، انجام تست گرم و اسپور، باکتری جدا شده گرم مثبت بوده و دارای اسپور انتهایی می باشد که با خصوصیات باکتری ترموبیفیدا فوسکا مطابقت دارد.

باکتری ترموبیفیدا فوسکا دارای دو ایزوآنزیم کوتیناز با شباهت (identity) ۹۳٪ در اسیدهای آمینه است. یکی از این دو دارای ۳۱۹ زیر واحد است. ۵۸ اسید آمینه به عنوان سیگنال پپتید از رشته‌ی پلی پپتیدی جدا می‌شود. در دیگری ۳۰۱ اسید آمینه شناسایی شده که ۴۰ اسیدآمینه به صورت پپتید نشانه از پیکره‌ی آنزیم جدا می‌شود. در نهایت، هر دو دارای ۲۶۱ زیر واحد و وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون خواهند بود (۷).

در این تحقیق به کمک توالی‌های مشابه در گونه‌های شناخته شده باکتری ترموبیفیدا فوسکا طراحی پرایمر صورت گرفت و با توجه به عدم وجود سایت برش آنزیم‌های محدودکننده *EcoRI* و *BamHI* در داخل ژنوم آنزیم یاد شده و عملکرد آنزیم‌ها با بافر مشابه، سایت برش این آنزیم‌ها برروی پرایمر تعبیه شد. وکتور pBluescript sk برای کلون سازی انتخاب شد زیرا دارای اندازه ۲۹۵۸ نوکلئوتید بوده و سایت‌های برش آنزیمی *EcoRI* و *BamHI* بر روی آن وجود داشت. اندازه کوچک و میزان تکثیر بالا از خصوصیات این وکتور است. انتخاب این وکتور به کمک مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین صورت می‌گیرد. پس از

کلون‌سازی و تعیین توالی و با توجه به نتایج BLAST از جدول ۲ بیشترین شباهت با ۹۸٪ همانندی با آنزیم کوتیناز *cut1* که توسط ژانگ (Zhang) و همکارانش در ۱۹۹۸ گزارش شده (۱۰) و ۹۶٪ شباهت باآنزیم کوتیناز *cut-1*.KW3 که توسط وی (Wei) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ تعیین توالی شده است در باکتری ترموبیفیدا فوسکا مشاهده گردید (۱۱).

نتیجه گیری

با بیان آنزیم کوتیناز کلون شده در این تحقیق و بررسی‌های ساختاری-عملکردی متعاقب آن و فعالیت آنزیم در واکنش با سوبستراهای مختلف، کاربرد بیشتر این آنزیم در بیوتکنولوژی و صنعت می تواند مورد توجه قرار گیرد. آنزیم کوتیناز به دلیل طیف وسیع عملکرد در برابر سوبستراهای متنوع و قابلیت تجزیه و سنتز انواع ترکیبات پلی استر می‌تواند در رفع آلودگی‌های زیست محیطی نقش مهمی ایفا کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از خانم نیلوفر نیک نام، آقای ترکزاده و خانم دکتر محبوبه نظری به دلیل همکاری‌های ارزنده کمال امتنان را دارند.

References

1. Carvalho CML, Aires-Barros MR, Cabral1 JMS. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. Electron J Biotechnol. 1998; 1(3): 160-173.
2. Heredia A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. Biochim Biophys Acta. 2003; 1620(1-3): 1-7.
3. Degani O, Salman H, Gepstein S, Dosoretz CG. Synthesis and characterization of a new cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methyl sulfone ester) hexadecanoate. J Biotechnol. 2006; 121(3): 346-350.
4. Xia Y, Yu K, Navarre D, Seebold K, Kachroo A, Kachroo P. The glabra1 mutation affects cuticle formation and plant responses to microbes. Plant Physiol. 2010; 154(2): 833-846.
5. Liu Z, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong XP, Gross R, Montclare JK. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: Enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. J Am Chem Soc. 2009; 131(43): 15711-15716.
6. Billig S, Oeser T, Birkemeyer C, Zimmermann W, Hydrolysis of cyclic poly (ethyle terephthalate) trimers by a carboxylesterase from *Thermobifida fusca* KW3. Appl Microbiol Biotechnol. 2010; 87(5): 1753-1764.
7. Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J, Wu J. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. J Mol Catal B Enzym. 2010; 63(3-4): 121-127.
8. Gonçalves AP, Cabral JM, Aires-Barros MR. Immobilization of a recombinant cutinase by entrapment and by covalent binding. Kinetic and stability studies. Appl Biochem Biotechnol. 1996; 60(3): 217-28.
9. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The Prokaryotes. Third Edition. USA: Springer Science-Business Media, Inc. 2006.
10. Zhang Z, Wang Y, Ruan J. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. Int J Syst Evol Microbiol. 1998; 48(2): 411-422
11. Wei R, Oeser T, Zimmermann W. Cloning, expression and mutagenesis of cutinases isolated from *Thermobifida fusca* KW3 and their applications for polyethylene terephthalate hydrolysis. Submitted to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. Cited for: NUCLEOTIDE SEQUENCE. 2010.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 3, Sep. 2010

Isolation and cloning of the *cutinase* gene obtained from indigenous thermophiles *Thermobifida fusca* bacteria

Elahe Pourfakhraei[1], Mehrdad Behmanesh[2], Majid Erfani Moghadam[3]

[1]M.Sc., Department of Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives: Cutinase belongs to serine hydrolase family that is used for elimination of environmental pollutions due to its special structural and functional properties and applications. In this study, cutinase gene was isolated from indigenous thermophiles *Thermobifida fusca* and was cloned in *E. coli.*

Material and Methods: Sampling was performed from forest soils in the north of Iran. *Thermobifida fusca* bacteria were isolated with suitable cultures under optimized conditions (pH 10 and T=62 °C). After primer designation, *cut1* gene was isolated from bacterium and then, was cloned in pBluescript sk vector and was introduced into *E. coli* DH5α. The colonization was confirmed based on enzymatic digestion and sequencing.

Result: Based on BLAST software, there was 98% and 96% similarities were obtained with *cut1* and cut-1.KW3, respectively.

Conclusions: Based on broad functions of the enzyme on various substrates and its ability for synthesis of various polyester compounds, this enzyme has an important role in environmental decontamination.

Keywords: *Thermobifida fusca*, Cutinase, Cloning

Correspondance to: Majid Erfani Moghadam
Email: majid.erfani@gmail.com
Tel:+989125799443
Journal of Microbial World 2010 3(3): 155-161