

افزایش تحمل به علف کش گلایفوسیت در نتیجه بیان ژن نو ترکیب گلایفوسیت

اکسیدورداکتاز (*gox*) در باکتری اشرشیا کولی

سعیده آقایی^۱، امیر موسوی^{۱*}، علی هاتف سلمانیان^۱ و فرانک هادی^۲

^۱ ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی

^۲ ایران، خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

متحمل سازی گیاهان زراعی نسبت به علف کش گلایفوسیت از طریق دست ورزیهای ژنتیکی یکی از کاراترین روشهای موجود در مدیریت علفهای هرز محسوب می شود. راه حل مطلوب برای توسعه گیاهان متحمل در سطح تجاری، به کارگیری ژنهای عامل آنزیمهای تجزیه کننده گلایفوسیت نظیر گلایفوسیت اکسیدورداکتاز در کنار EPSPS مقاوم به گلیفوسیت می باشد. ژن گلایفوسیت اکسیدورداکتاز اولین بار از باکتری *Ochrobactrum anthropi* سویه LBAA جدا گردیده که آنزیم آن، علف کش گلایفوسیت را به آمینومیتیل فسفونیک اسید و گلی اکسالات تبدیل می کند. در تحقیق حاضر، برای مطالعه کارایی گلایفوسیت اکسیدورداکتاز، توالی ژن آن سنتز و در ناقل بیانی pet28a همسانه سازی گردید. پس از انتقال به باکتری اشرشیا کولی، بیان پروتئین هدف با روش SDS-PAGE مورد تأیید قرار گرفت. آزمایشات بهینه سازی بیان ژن در باکتری نشان داد که شرایط بهینه شامل دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای کشت، ۴ ساعت پس از القاء با IPTG یک میلی مولار در OD₆₀₀=0.6 می باشد. در مرحله بعد، به منظور انجام آزمون زیستی باکتریهای تراریخت، حد آستانه تحمل باکتریهای شاهد در محیط حداقل فاقد فسفات با غلظتهای مختلف گلایفوسیت انجام و با باکتریهای نو ترکیب مقایسه گردید. نتایج نشان داد که باکتریهای شاهد غلظت بیشتر از ۰/۵ میلی مولار گلایفوسیت را نمی توانند تحمل کنند؛ در صورتی که باکتریهای نو ترکیب تا غلظت ۱ میلی مولار زنده می ماندند. این نتایج با انجام روش شمارش کلونی و پس از سه تکرار تأیید گردید. بنابراین ژن گلایفوسیت اکسیدورداکتاز می تواند کاندید مناسبی در کنار سایر ژنهای عامل مقاومت به گلایفوسیت جهت دست ورزی ژنتیکی گیاهان استراتژیک با هدف به دست آوردن سطوح بالاتر و پایدارتر مقاومت به این علف کش باشد.

واژه های کلیدی: گلایفوسیت، بیان ژن، ژن مصنوعی گلایفوسیت اکسیدورداکتاز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۳۶، پست الکترونیکی: m-amir@nigeb.ac.ir

مقدمه

علف کش گلایفوسیت با نفوذ به درون گیاه از طریق ممانعت از عملکرد آنزیم EPSPS در مسیر شیکیمات مانع تولید اسید آمینه های حلقوی می گردد. آنزیم EPSPS توسط ژنهای هسته ای رمز می گردد ولی ساخت اسید آمینه های حلقوی در پلاستیدها (کلروپلاست) رخ می دهد؛ به عبارت دیگر محصول این ژن پس از ساخته شدن به کلروپلاست

در میان علف کشهای وسیع الطیف مرسوم، گلایفوسیت بیشترین میزان استفاده را به خود اختصاص داده است (۳) و (۲۶). گلایفوسیت یکی از مهمترین کشفهای صدسال اخیر است که اهمیت آن در تولید غذای جهانی به اندازه اهمیت پنی سیلین در مبارزه با بیماریها می باشد (۱۵).

و گلی اکسالات را بدون تولید پراکسید هیدروژن تولید می‌کند (۱۵). آنزیمهای سم زدای دیگر گلایفوسیت، آنزیم گلپسین اکسیداز (GO) از باکتری *Bacillus subtilis* (۱۳)، گلایفوسیت استیل ترانسفراز (GLYAT) از باکتری *Bacillus licheniformis* (۵) آنزیمهای گلایفوسیت دکربوکسیلاز از منابع فارچهای خاکزی (۱۱) و آنزیمهای تجزیه کننده لیگنین (لیگنولیتیک) مانند لاکاز و منگنز پراکسیداز (MnP) (۱۴) می باشند. در تحقیق حاضر، برای اولین بار به منظور ارزیابی توانایی آنزیم GOX به تنهایی در تجزیه گلایفوسیت، توالی آن به طور مصنوعی ساخته و در باکتری *E. coli* بیان گردید؛ سپس میزان مقاومت باکتری تراریخت حاوی محصول ژن مورد نظر و باکتری شاهد فاقد این ژن نسبت به گلایفوسیت مقایسه شد.

مواد و روشها

سویه های باکتری، ناقلها و محیط کشت: در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه های DH5α و BL21 (DE3) (Invitrogen) و ناقل همسانه سازی pUC57 (Fermentas) و ناقل بیانی باکتریایی pET-28a (Novagen) استفاده گردید. از محیط حداقل M9 و LB (Luria-Bertani) برای کشت باکتریها استفاده شد

ساخت سازه بیانی **pET-synth-gox**: توالی ژن *gox* در حدود ۱۲۹۶ جفت باز (EMBL Bank: GU214711.1) جستجو و انتخاب شد. این توالی با استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیک DNAsis MAX (Hitachi Software)، بانک اطلاعاتی و نرم افزارهای مختلف دیگر شامل: Codon (http://www.kazusa.or.jp/codon) و Database و همچنین Swissprot Reverse Translation Online tool (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) و Gen-Script (NJ, USA) متناسب با میزبان باکتریایی بهینه شد. در این آنالیز، حضور جایگاههای برشی برای آنزیمهای *BamHI* و *SacI* که جهت همسانه سازی ژن درون ناقلهای بیانی مدنظر بودند، درون توالی هدف بررسی

منتقل می‌شود (۲۴). امروزه دو روش اساسی برای ایجاد گیاهان مقاوم به گلایفوسیت موفقیت آمیز بوده است که عبارتند از بیان EPSPS غیر حساس و یا جهش یافته و دوم سم‌زدایی مولکول گلایفوسیت از طریق تغییر ساختار شیمیایی آن (۹ و ۱۵). با انتخاب طبیعی، جهشهای هدف دار و غربالگری باکتریهای متحمل، آنزیمهای EPSPS مقاوم زیادی شناسایی شدند (۱، ۳، ۶، ۸، ۱۶، ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۵ و ۲۷) همچنین با استفاده از روشهای غربالگری مناسب، ریزسازواره‌های مختلفی که قادرند این علفکش را تجزیه و یا سم‌زدایی کنند شناسایی و ژنهای مربوط به آنزیمهای مسئول جداسازی و برای ایجاد مقاومت در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته اند. یکی از این آنزیمها، گلایفوسیت اکسیدو رداکتاز (GOX) می‌باشد. ژن رمز کننده آنزیم GOX از باکتری خاکزی *antrophii* *Achromobacter* سویه LBAA شناسایی شده و در بانک ژن با شماره دسترسی GU214711.1 ثبت گردیده است. این باکتری قادر است گلایفوسیت را به عنوان تنها منبع فسفات استفاده کند، همچنین این باکتری AMPA (آمینومتیل فسفونیک اسید) و دیگر فسفوناتها را از طریق مسیر C-P لایز تجزیه می‌کند. در واقع جهت به دست آوردن این توالی، یک کتابخانه ژنی از DNA ژنومی باکتری تهیه و برای یافتن ژنهای مسئول تحمل گلایفوسیت غربال شده است. در نتیجه یک ORF متشکل از ۱۲۹۰ جفت باز که رمز کننده آنزیم GOX که یک فلاو پروتئین شامل FAD است و متشکل از ۴۳۰ اسید آمینه می‌باشد شناسایی شده است. مکانیسم تجزیه گلایفوسیت توسط این آنزیم شامل کاهش کوفاکتور FAD به وسیله اولین مولکول گلایفوسیت است و در نتیجه، یک مولکول AMPA با گلی اکسالات یک شیف باز تشکیل می‌دهد که در آخر به ترکیبات تک کربنه هیدرولیز می‌شود. فلاوین کاهش یافته دوباره به وسیله اکسیژن اکسید شده و یک حدواسط فلاوین اکسیژنه را به وجود می‌آورد که این حدواسط، اکسیژناسیون مولکول دوم گلایفوسیت را کاتالیز و AMPA

و حذف شد. بدین ترتیب، برای همسانه سازی ژن در باکتری و زیرهمسانه سازیهای مورد نظر آتی، در انتهای ۵' جایگاه برش برای آنزیم *Bam*HI و در انتهای ۳' آن، جایگاه برش برای آنزیم *Sac*I تعبیه شد.

پس از سنتز ژن *gox* (*synth-gox*) توسط شرکت (China) Shine Gene و تعیین توالی و اطمینان از صحت سنتز ژن مصنوعی، ترادف مورد نظر به طول ۱۳۱۴ جفت باز در بانک ژنی ثبت گردیده شد (Genbank:HQ110097.1). این توالی که درون پلاسمید pUC57 همسانه سازی (*pUC-synth-gox*) شده بود، به صورت لیوفیلیزه و به میزان ۲-۴ میکروگرم دریافت گردید. پلاسمید *pUC-synth-gox* به روش استاندارد شوک حرارتی به سلول مستعد *E. coli* DH5α انتقال یافت (۱۸). رسوب باکتریهای تراریخت بر روی پلیتهای حاوی آمپی سیلین (غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر) کشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت جهت ظهور کلونیهای نوترکیب نگهداری گردید. جهت تکثیر ژن هدف از پلاسمید نوترکیب، از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی و آنزیم (*Expand* (Roche) در کنار آنزیم *Taq* پلیمرز استفاده به عمل آمد. به این منظور، آغازگرهای 20-mer و NGT1 (5'-GGATCCATGTCTCGGAGAATCA-3') و 18-mer NG2 (5'-GAGCTCGGAGGCAGGACC-3') طراحی و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته شدند. شرایط واکنش زنجیره های پلیمرز شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال در ۵۷ درجه و تکثیر در ۷۲ درجه هر کدام به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش در روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز گردید. در عین حال، قطعه ژن هدف با روش تعیین ترادف مورد تأیید مجدد قرار گرفت. سپس، کلونیهای باکتریایی حاوی پلاسمید مورد نظر در حضور

گلیسرول ۲۰ درصد در فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد و به روش استاندارد نگهداری شدند.

به منظور زیرهمسانه سازی ژن هدف در ناقل بیانی pET-28a، در ابتدا توالی تکثیر یافته از طریق PCR در ناقل pTZ57 R/T همسانه سازی و تأیید کار از طریق کلونی PCR و نیز هضم ناقص مثبت با آنزیمهای *Bam*HI و *Sac*I انجام گرفت. توالی هدف در نهایت از طریق جایگاههای برشی مذکور هضم و در ناقل بیانی pET-28a مستقر و از طریق روش شوک حرارتی به باکتری میزبان *E. coli* سویه BL21(DE3) منتقل گردید (۱۸). با انجام کلونی PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن (NG1 و NG2) و سپس استخراج ناقص نوترکیب احتمالی و انجام واکنش هضم به کمک آنزیمهای *Bam*HI و *Sac*I، صحت همسانه سازی تأیید شد. در نهایت، سازه مورد نظر جهت توالی یابی به شرکت ژن فناوری ارسال شد.

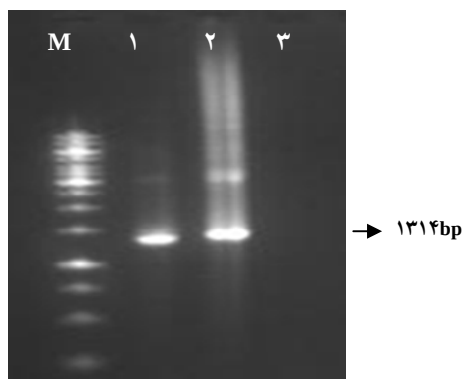
الفای بیان پروتئین نوترکیب: به منظور بیان ژن هدف در پلاسمید pET-28a، بررسی بر روی چند کلونی نوترکیب انجام گرفت که در این شرایط کلونیایی با توانایی تولید پروتئین بیشتر انتخاب شدند برای این منظور، چند کلونی در محیطهای LB مایع حاوی ۵۰ μg/ml کانامایسین به مدت ۱۵ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ rpm کشت داده شدند. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر کشت به طور جداگانه به ۵ میلی لیتر محیط LB ۱/۴ دارای ۵۰ μg/ml کانامایسین اضافه شدند؛ پس از رسیدن کدورت رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۶، IPTG با غلظت نهایی یک میلی-مولار در شرایط استریل اضافه شده و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰ rpm در شیکر انکوباتور نگهداری شدند. یک لوله شاهد نیز بدون افزودن IPTG طبق شرایط فوق تهیه شد. پس از اتمام زمان فوق، مقدار ۱/۵ میلی لیتر از هر کدام از لوله های کشت مورد آزمایش و شاهد مربوط به هر کلونی درون

و یالهای ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و به کمک سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سلولها رسوب داده شدند. سلولهای جمع شده مستقیماً با Sample Buffer با رقت 2.5X مخلوط و پس از جوشانیدن به مدت ۵ دقیقه در ژل اکریل آمید دنا توره ۱۲ درصد (SDS- PAGE) الکتروفورز شدند (۴).

جهت بهینه سازی بیان ژن مورد نظر، فاکتورهایی نظیر میزان OD₆₀₀ در زمان القاء، غلظت ماده القاگر IPTG، زمان القاء و دمای رشد باکتریهای نو ترکیب مورد بررسی قرار گرفتند و الگوی پروتئینهای حاصل از بیان ژن در شرایط متفاوت به کمک SDS-PAGE آنالیز و مقایسه شدند.

نتایج و بحث

همسانه سازی ژن *synt-gox* در ناقل بیانی: در مرحله نخست، پس از استخراج ناقل پلاسمیدی pUC-synth-gox از باکتری میزبان، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف (NG1 و NG2) و الگو قرار دادن ناقل مذکور، قطعه *synth-gox* (حدود ۱۳۱۴ bp) از طریق PCR تکثیر گردید (شکل ۱). قطعه ۱۳۱۴ bp نهایتاً جهت وارد شدن به جایگاه همسانه سازی حامل pET28a، با آنزیمهای *Bam*HI و *Sac*I برش و آماده گردید.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی محصول PCR حاصل از تکثیر ژن *Synth-gox* در ناقل pUC57 نو ترکیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی NG1 و NG2. M. نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas); ۱، قطعه تکثیر شده (۱۳۱۴bp) توسط آنزیم Expand; ۲، قطعه تکثیر شده (۱۳۱۴bp) توسط آنزیم Taq polymerase; ۳، کنترل منفی شامل مواد واکنش PCR بدون پلاسمید pUC57+*Synth gox*

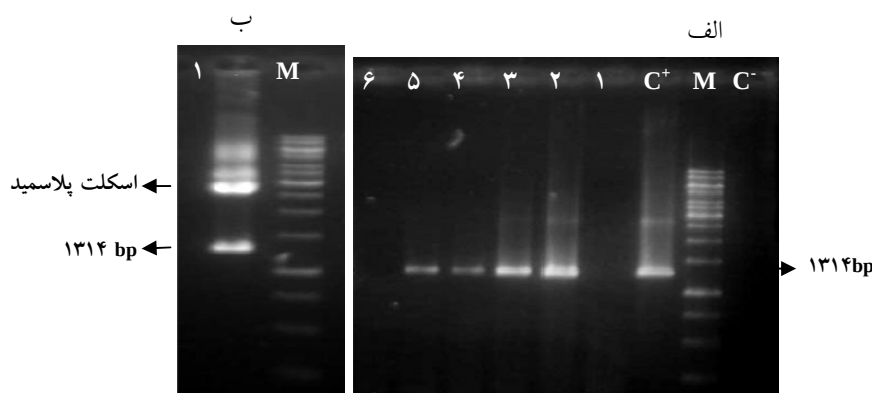
روش زیست سنجی برای تعیین حداقل غلظت گلائیفوسیت برای مهار باکتری *E. coli*: میزان ۱۰ میکرولیتر از کشتهای شبانه باکتری *E. coli* BL21-DE3 در محیط LB به پلیتهای محیط کشت جامد حداقل (M9) حاوی غلظتهای ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ از گلائیفوسیت، اضافه و کشت خطی انجام گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و در روز بعد، رشد یا عدم رشد کلونیهها بررسی شد. در این روش، از محیط کشت حداقل استفاده گردید که فاقد هر گونه اسید آمینه برای مصرف باکتریهاست. بدین ترتیب در صورت رشد باکتریها بر روی محیط می توان گفت که باکتری توانسته است با غلبه بر مهار کننده (ماده گلائیفوسیت) و استفاده از آنزیمهای موجود در مسیر بیوشیمیایی شیکیمات، اسید آمینه های ضروری و متابولیتهای ثانویه را برای خود بسازد و در غیر این صورت آنزیم نسبت به مهار کننده حساس خواهد بود.

تهیه رقتهای متوالی از غلظتهای متفاوت گلائیفوسیت به منظور شمارش کلونی: باکتریها به مدت ۶ ساعت در محیط LB ۱/۴ به همراه آنتی بیوتیک کانامایسین در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰ rpm کشت داده شدند. پس از رسیدن OD₆₀₀ به حدود ۰/۵، سلولها با

تهیه رقتهای متوالی از غلظتهای متفاوت گلائیفوسیت به منظور شمارش کلونی: باکتریها به مدت ۶ ساعت در محیط LB ۱/۴ به همراه آنتی بیوتیک کانامایسین در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰ rpm کشت داده شدند. پس از رسیدن OD₆₀₀ به حدود ۰/۵، سلولها با

و واکنش هضم آنزیمی، کلونهای حاوی pET-synth-gox بررسی و گزینش شدند (شکل ۲). همسانه های مثبت نهایتاً از طریق توالی یابی تأیید گردیدند.

پس از قرارگیری synth-gox در جایگاه همسانه سازی سازه مورد نظر، با کشت باکتریهای تراریخت در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین و سپس انجام کلونی PCR



شکل ۲- تأیید صحت همسانه سازی قطعه ژن هدف (Synth-gox) در ناقل pET28a. الف: نتایج حاصل از Colony PCR؛ M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb (Fermentas)؛ C⁺: کنترل مثبت (پلاسمید pUC57+Synth gox). C⁻: کنترل منفی محلول واکنش PCR بدون الگو؛ ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ کلونهای دارنده Synth gox و ۱ و ۶ کلونهای فاقد حامل نوترکیب. ب: واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی (BamHI-SacI). M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb (Fermentas)؛ ۱، قطعه 1314 bp (Synth gox) و اسکلت حامل pET28a.

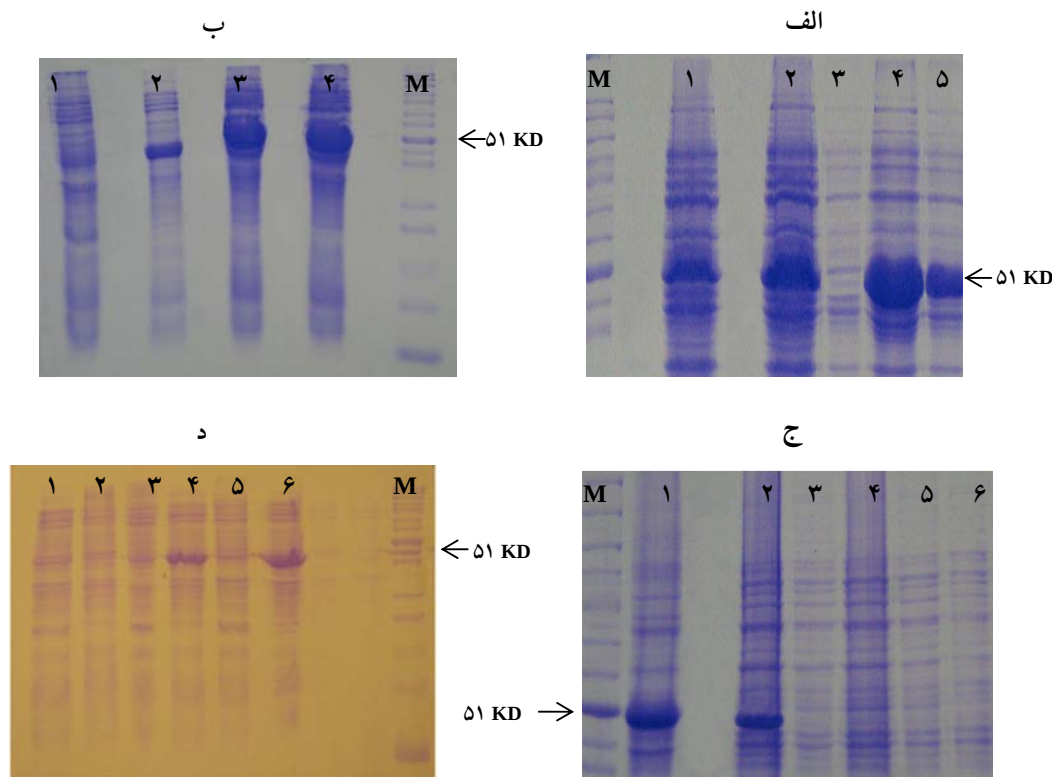
تعیین بهترین زمان القاء، باکتریهای نوترکیب حاوی-pET-synth-gox در سه مرحله (قبل از القاء، ۲ و ۴ ساعت بعد از القاء) با غلظت ۱ میلی مولار IPTG، با باکتریهای E. coli BL21 DE3 حاوی pET28a بدون synth gox مقایسه شدند و نتایج نشان داد چهار ساعت بعد از القاء بهترین شرایط بیان پروتئین مربوط به ژن synth-gox می-باشد (شکل ۳ ج). باکتریهای حاوی pET-synth-gox در سه دما (۳۷، ۳۳ و ۲۸ درجه سانتی گراد) و در غلظت ۱ میلی مولار IPTG با باکتریهای E. coli BL21 DE3 حاوی pET28a بدون ژن هدف مقایسه شدند و نتایج الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲ درصد (شکل ۳ د) نشان داد که بهترین دما برای بیان پروتئین GOX، ۳۷ درجه سانتی گراد می-باشد. مقایسه نتایج حاصل از بهینه کردن شرایط بیان در این تحقیق با دیگر کارهای مشابه که از سیستم pET معرفی شده توسط شرکت Novagen، استفاده کرده بودند، نشان می-دهد که دمای بهینه رشد برای باکتری میزبان پلاسمید pET، ۳۷ درجه سانتی گراد می-باشد. در ارتباط با دانسیته سلولی مناسب جهت انجام عمل القاء، ۱

بهینه سازی شرایط بیان ژن نوترکیب در باکتری E. coli: براساس پیش بینی وزن مولکولی پروتئین GOX و محاسبه بخشهای His-Tag اضافه شده، قطعه مشاهده شده در ژل اکریل آمید با وزن تخمین زده شده ۵۱ KD تشخیص داده شد (شکل ۳). به منظور بهینه سازی و تعیین بهترین شرایط القاء باکتریهای واجد pET-synth-gox فاکتورهای مهم دخیل در این رابطه از جمله میزان OD₆₀₀ در زمان القاء، غلظت ماده القاگر IPTG، زمان القاء و دمای رشد باکتریهای نوترکیب بررسی شد. بدین منظور باکتریها در چهار مرحله از کشت با میزان OD₆₀₀ برابر با ۱، ۰/۸، ۰/۶ و ۰/۴ با IPTG ۱ میلی مولار القاء شدند. الکتروفورز محصولات پروتئینی حاصل بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد نشان داد که بهترین نتیجه مربوط به OD₆₀₀= ۰/۶ می باشد (شکل ۳ الف).

همچنین باکتریهای نوترکیب به طور جداگانه با غلظتهای متفاوت ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی مولار از IPTG القاء شدند. نتایج نشان داد که اختلاف چندانی بین غلظتهای ۰/۸ و ۱ میلی مولار از IPTG وجود ندارد (شکل ۳ ب). برای

میزان بهینه استفاده از القاگر IPTG، ۰/۲ میلی مولار گزارش شده است. در ارتباط با بهترین زمان نمونه برداری پس از القاء به منظور بررسی میزان بیان نیز، زمانهای ۴ تا ۵ ساعت پس از القاء توصیه شده است که با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مطابقت دارند.

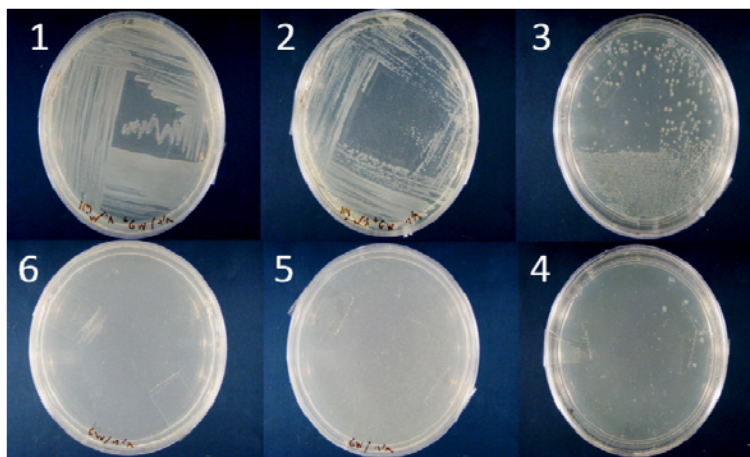
تا $OD_{600} = 0.4$ توسط شرکت Novagen سفارش شده است. همچنین، در بررسی بیان ژنهای *epsps* جهش یافته در میزبان *E. coli* در راستای ایجاد مقاومت به گلایفوسیت، $OD_{600} = 0.4$ برای رسیدن به بالاترین میزان بیان گزارش گردیده است (۱۷). در بررسی مذکور، حداقل



شکل ۳- بهینه سازی شرایط القای باکتریهای نوترکیب حاوی pET-Synt- *gox* (الف) تعیین مناسب OD_{600} جهت القاء بیان. ۱: $OD_{600} = 1$; ۲: $OD_{600} = 0.8$; ۳: بدون القاء با IPTG; ۴: $OD_{600} = 0.6$; ۵: $OD_{600} = 0.4$ (ب) استفاده از غلظتهای متفاوت IPTG. ۱: باکتری تراریخت قبل از القاء; ۲: بعد از القاء با IPTG ۰/۶ میلی مولار; ۳: بعد از القاء با IPTG ۰/۸ میلی مولار; ۴: بعد از القاء با IPTG ۱ میلی مولار (ج) نتایج حاصل از القاء در زمانهای متفاوت در باکتریهای نوترکیب حاوی pET-Synt- *gox* و باکتریهای شاهد. ۱: باکتریهای نوترکیب چهار ساعت بعد از القاء; ۲: باکتریهای نوترکیب دو ساعت بعد از القاء; ۳: باکتریهای نوترکیب قبل از القاء; ۴: باکتری شاهد چهار ساعت بعد از القاء; ۵: باکتری شاهد دو ساعت بعد از القاء; ۶: باکتری شاهد قبل از القاء (د) نتیجه حاصل از القاء در دماهای متفاوت ۱: القاء باکتری شاهد در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد; ۲: القاء باکتری نوترکیب در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد; ۳: القاء باکتری شاهد در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد; ۴: القای باکتری نوترکیب در دمای ۳۳ درجه سانتی گراد; ۵: القای باکتری شاهد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد; ۶: القای باکتری نوترکیب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد. M: نشانگر وزن پروتئینی (Fermentas) #SM0661. پروتئین هدف در عکسها با فلش مشخص گردیده است.

میلی مولار از گلایفوسیت در محیط کشت جامد حداقل M9 اعمال شد. باکتری فوق بر روی این محیطها کشت داده شد. نتایج نشان داد که رشد باکتری در غلظت ۰/۵ میلی مولار از گلایفوسیت متوقف شد (شکل ۴).

نتایج بررسی فعالیت زیستی آنزیم Synth-GOX در مجاورت مهار کننده (گلایفوسیت): به منظور تعیین حداقل غلظت لازم از گلایفوسیت برای مهار باکتری *E. coli* BL21 DE3، غلظتهای ۰، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۱/۵



شکل ۴- بررسی حد آستانه غلظت گلایفوسیت برای مهار رشد باکتریهای *E. coli* BL21DE3 در نمونه هایی از محیط کشت حداقل M9 حاوی غلظتهای مختلف گلایفوسیت. ۱: پلیت فاقد گلایفوسیت، ۲: پلیت حاوی ۰/۰۵ میلی مولار گلایفوسیت، ۳: پلیت حاوی ۰/۱ میلی مولار گلایفوسیت، ۴: پلیت حاوی ۰/۵ میلی مولار گلایفوسیت، ۵: پلیت حاوی ۱ میلی مولار گلایفوسیت، ۶: پلیت حاوی ۱/۵ میلی مولار گلایفوسیت.

به منظور بررسی مقاومت باکتری تراریخت حاوی pET-*synth-gox* و باکتری شاهد در مجاورت گلایفوسیت، رقتهای متوالی از محیط کشتهای حاوی باکتریهای تراریخت که در مجاورت غلظتهای متفاوت گلایفوسیت بودند تهیه شد. مشاهدات نشان داد که رقت 10^6 بهترین رقت برای به دست آوردن کلونیهای تک به منظور شمارش کلونی می باشد.

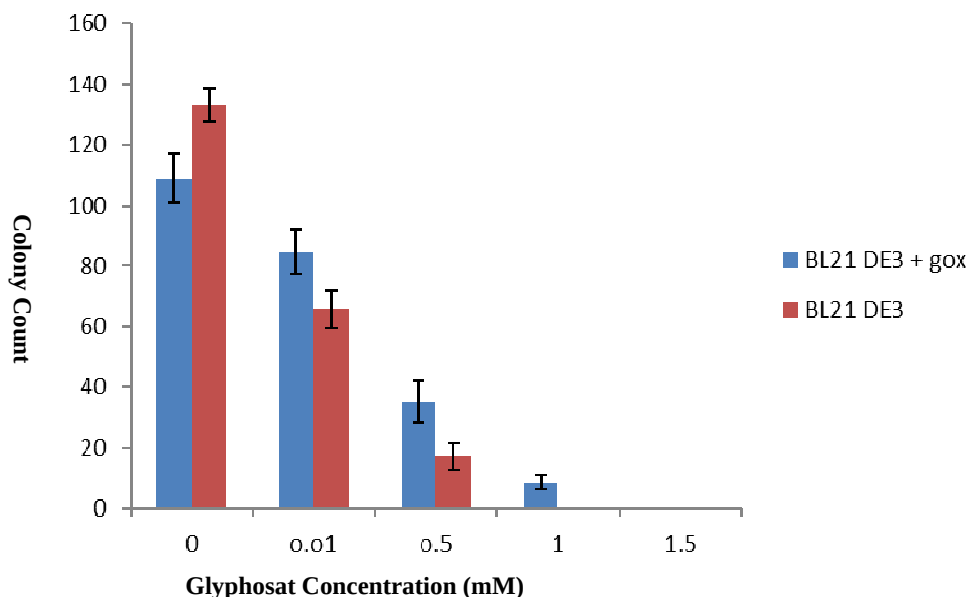
نتایج حاصل از شمارش کلونی باکتریهای نوترکیب و باکتری شاهد در نمودار شکل ۶ نمایش داده شده است که حاکی از مقاومت برتر کلونیهای نوترکیب نسبت به کلونیهای بدون ژن هدف جهت رشد در غلظتهای ۰/۰۱ و ۰/۵ میلی مولار از گلایفوسیت و نیز برتری مطلق این کلونیاها در غلظت ۱/۰ میلی مولار از این علفکش می باشد.

در طی بررسیهای زیستی باکتریهای تراریخت شده با *synth-gox* نتایج نشان داد که باکتریهای نوترکیب حاوی *synth-gox* تا غلظت ۱ میلی مولار زنده ماندند در صورتی که این باکتریهای غیر تراریخت غلظت بیشتر از ۰/۵ میلی مولار گلایفوسیت را نمی توانند تحمل کنند. این نتایج با انجام روش شمارش کلونی و پس از سه تکرار اثبات شدند.

همچنین به منظور تأیید عملکرد آنزیم GOX در تجزیه گلایفوسیت، فرآیند القاء باکتری نوترکیب حاوی ژن مورد نظر (*pET-synth gox*) و باکتری شاهد در محیط حداقل مایع M9 و در حضور ۱ میلی مولار IPTG با سه بار تکرار انجام شد. نتایج نشان داد در هر سه تکرار، باکتری شاهد پس از گذشت ۹ ساعت در غلظت ۱ میلی مولار گلایفوسیت قادر به رشد نمی باشد، در حالی که باکتریهای بیان کننده آنزیم GOX توانایی رشد در این غلظت از گلایفوسیت را به خوبی داشتند (شکل ۵).



شکل ۵- تأیید عملکرد پروتئین نوترکیب با مقایسه رشد باکتری بیان کننده آنزیم GOX (الف) و باکتری شاهد فاقد ژن هدف (ب) در مجاورت ۱ میلی مولار از مهار کننده گلایفوسیت پس از گذشت ۹ ساعت.



شکل ۶- نمودار ستونی درصد بقای باکتریهای بیان کننده پروتئین GOX و باکتریهای شاهد در برابر غلظتهای متفاوت مهار کننده گلایفوسیت.

در عین حال، با مقایسه میزان مقاومت ایجاد شده در باکتریهای نو ترکیب بیان کننده آنزیم گلایفوسیت اکسیدوردکتاز با باکتریهای بیان کننده آنزیم ۵-انول پیروویل شیکیمات ۳-فسفات سنتاز (EPSPS) (۱۷)، می توان به این نتیجه رسید که سطح مقاومت بروز یافته پایین تر می باشد. این امر می تواند ناشی از مکانیسمهای اعمال شده توسط این دو آنزیم بوده باشد، به طوری که سم زدایی از علف کش سهم کمتری را نسبت به کاهش اتصال علف کش به آنزیم هدف در ایجاد تحمل به آن ایفاء می نماید. البته این حقیقت نمی تواند از اهمیت سودمندی آنزیم GOX در طی پروژه های دست ورزی ژنتیکی گیاهان استراتژیک بکاهد، چرا که به کارگیری همزمان دو آنزیم مذکور همواره می تواند باعث افزایش و پایداری سطوح مقاومت بروز یافته به علف کش گلایفوسیت در محصولات هدف شود. برای مثال در رخدادهای تجاری مقاوم به گلایفوسیت کلزا شامل GT200 و GT73 (۲)، از ژن تجزیه کننده گلایفوسیت اکسیدوردکتاز (*gox*) که توسط شرکت Monsanto از باکتری خاک-زی *Ochrobactrum anthropi* سویه LBAA جداسازی شده، در کنار ژن *epsps* مربوط به آگروباکتری سویه CP4

استفاده شده است (۷). در ایران مطالعه ای توسط هادی و همکاران (۲۰۱۲) به منظور ارزیابی عملکرد ژن تجزیه کننده گلایفوسیت به تنهایی در ایجاد مقاومت و همچنین اثرات احتمالی آن در گیاه صورت گرفته است (۱۰). در این تحقیق، توالی ژن *gox* موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، به صورت مصنوعی تهیه و سپس برای تراریختی گیاه کلزا به کار رفته است. نتایج تحمل گیاهان تراریخت شده با ژن *gox* مصنوعی نسبت به گلایفوسیت در حد ۱/۵ میلی مولار گزارش شده است که در مقایسه با گیاهانی که با دریافت ژنهای *epsps* مقاوم، متحمل شدند پایین تر است (۱۰). برای مثال کهریزی و همکاران میزان مقاومت به گلایفوسیت را برای گیاه کلزای تراریخت با ژن *epsps* مقاوم دارای جهش دوگانه (Ala183Thr و Gly96Ala) در حدود ۱۰ میلی مولار گزارش نموده اند (۱۲). البته این موضوع با در نظر گرفتن نقش کمکی آنزیم GOX در کنار آنزیم EPSPS که نقش کلیدی تری را در مهار گلایفوسیت دارد، طبیعی و قابل قبول می تواند باشد. همچنین تجربی و همکاران در (۱۳۸۸) پس از بررسی پایداری و توارث ژن *epsps* جهش یافته در نسل اول گیاهان کلزای تراریخت، گزارش کردند که بیان این ژن قادر است اثرات

نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت تأمین اعتبار مالی این پروژه (طرح مأموریت محور ۴۰۷-م) کمال تشکر و سپاسگزاری را دارا می باشند.

گلایفوسیت را در گیاه تراریخت تا حدودی کاهش دهد (۲۰). لذا، به نظر می رسد به کارگیری ژن *gox* در کنار ژن جهش یافته *epsps* بتواند برای ایجاد گیاهان تراریخت تجاری متحمل به گلایفوسیت به کار رود.

قدردانی

منابع

- 1- Barry, G., Kishore, G., Padgett, S. 1992. DNA encoding class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for producing plants and bacteria tolerant to glyphosate herbicides. World Patent WO. 9(204,449): Q03321.
- 2- Barry, G.F., Kishore, G.M. 1995. Glyphosate tolerance crop plants, US Patent 5463175.
- 3- Baylis, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. Pest management science. 56(4): 299-308.
- 4- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. 1996. Protein Methods (New York: Wiley-Liss)
- 5- Castle, L.A., Siehl, D.L., Gorton, R., Patten, P.A., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H.J., Duck, N., Wong, J., Liu, D., Lassner, M.W. 2004. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. Science. 304 (5674): 1151-4.
- 6- Du, W., Wallis, N.G., Mazzulla, M.J., Chalker, A.F., Zhang, L., Liu, W.S., Kallender, H., Payne, D.J. 2000. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase and its activation by univalent cations. FEBS Journal. 267(1): 222-227.
- 7- Duke, S.O., Powles, S.B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science. 64: 319-25.
- 8- Fitzgibbon, J., Braymer, H. 1990. Cloning of a gene from *Pseudomonas* sp. strain PG2982 conferring increased glyphosate resistance. Applied and environmental microbiology. 56(11): 3382-3388.
- 9- Green, J.M., 2014. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. pest management science. 70(9): 1351-1357
- 10- Hadi, F., Mousavi, A., Salmanian, A.H., Akbari Noghabi, K., Khajeh, K. 2012. Glyphosate Tolerance in Transgenic Canola by a Modified Glyphosate Oxidoreductase (*gox*) Gene. Progress in Biological Science. 2(1):50-58
- 11- Hammer, P.E., Hinson, T.K., Duck, N.B., Kozie, M.G. 2005. Protein and DNA sequences of fungal TPP-binding decarboxylases encoded by GDC-1 and GDC-2 genes and their uses in conferring glyphosate resistance in transgenic plants, US Patent 204 436
- 12- Kahrizi, D., Salmanian, A.H., Afshari, A., Moieni, A., Mousavi, A. 2007. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Report. 26(1): 95-104.
- 13- Nishiya, Y., Imanaka, T. 1988. Purification and characterization of a novel glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. FEBS Letter. 438(3): 263-6.
- 14- Pizzul, L., Castillo Mdel, P., Stenström, J. 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. Biodegradation. 20: 751-9.
- 15- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D. 2011. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. Febs Journal. 278(16):2753-66.
- 16- Priestman, M.A., Funke T., Singh, I.M., Crupper, S.S., Schönbrunn, E. 2005. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. FEBS Letter. 579(3): 728-732.
- 17- Salmanian, A.H., Zakikhan, K., Afshari, A., Moshashaie, M., Jafari, M., Mousavi, A. 2006. Site-directed mutagenesis, expression and biological activity of *E. coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene. Iranian Journal of Biotechnology. 4 (4): 224-229.
- 18- Sambrook, J., Russell, D. 2004. editors. Molecular cloning A Laboratory Manual, Third edition.

- 19- Sun, Y.C., Chen, Y.C., Tian, Z.X., Li, F.M., Wang, X.Y., Zhang, J., Xiao, Z.L., Lin, M., Gilmartin, N., Dowling, D.N. 2005. Novel AroA with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China. *Applied and environmental microbiology*. 71(8): 4771-4776.
- 20- Tajrishi, M.M., Salmanian, A.H., Mousavi, A., Kahrizi, D. 2009. Investigation on Inheritance of Glyphosate tolerance in T1 Generation of Transgenic Rapeseed (*Brassica napus* L.) with the mutated bacterial EPSPS gene. *Iranian Journal of Biology*. 22(2):282-292.
- 21- Tian, Y.S., Xiong, A.S., Xu J., Zhao, W., Gao, F., Fu, X.Y., Xu, H., Zheng, J.L., Peng, R.H., Yao, Q.H. 2010. Isolation from *Ochrobactrum anthropi* of a novel class II 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate. *Applied and environmental microbiology*. 76(17): 6001-6005.
- 22- Tian, Y.S., Xu, J., Han, J., Zhao, W., Fu, X.Y., Peng, R.H., Yao, Q.H. 2013. Complementary screening, identification and application of a novel class II 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(3): 549-557.
- 23- Tian, Y.S., Xu, J., Xiong, A.S., Zhao, W., Gao, F., Fu, X.Y., Peng, R.H., Yao, Q.H. 2012. Functional characterization of Class II 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Halothermothrix orenii* H168 in *Escherichia coli* and transgenic *Arabidopsis*. *Applied and environmental microbiology*. 93(1): 241-250.
- 24- Vaughn, K.C., Duke, S.O. 1991. Biochemical Basis of Herbicide Resistance. In: Ebing, W., Börner, H., Martin, D., Sjut, V., Stan, H.J., Stetter, J. (eds) *Herbicide Resistance—Brassinosteroids, Gibberellins, Plant Growth Regulators*. Chemistry of Plant Protection, vol 7. Springer, Berlin, Heidelberg.
- 25- Wang, L., Peng, R., Tian, Y., Han, J., Zhao, W., Wang, B., Liu, M., Yao, Q. 2014. Characterization of a class II 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate from *Sinorhizobium fredii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(11): 2967-2973.
- 26- Yu, Q., Cairns, A., Powles, S. 2007. Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype. *Planta* 225(2): 499-513.
- 27- Zhang, Y., Yi, L., Lin, Y., Zhang, L., Shao, Z., Liu, Z. 2014. Characterization and site-directed mutagenesis of a novel class II 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase from the deep-sea bacterium *Alcanivorax* sp. L27. *Enzyme and Microbial Technology*. 63: 64-70.

Increasing tolerance to glyphosate herbicide in *Escherichia coli* by expression of recombinant glyphosate oxidoreductase (gox) gene

Saeedeh Aghaei¹, Amir Mousavi^{*1}, Ali Hatefe Salmanian¹, Faranak Hadi²

¹ Dept. of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, I.R. of Iran

Abstract

Genetic manipulation of crop plants to obtain resistance to herbicide glyphosate is one of the most effective approaches for weed management. Application of the genes encoding glyphosate degrading enzymes such as glyphosate oxidoreductase (GOX) in combination with a glyphosate-tolerant EPSPS is the ultimate approach to provide commercial rates of glyphosate tolerance. The *gox* gene was first isolated from *Ochrobactrum anthropi* strain LBAA that catalyses the cleavage of glyphosate into aminomethylphosphonic acid and glyoxalate. In this study, the *gox* gene was synthesized and cloned in pET28a expression vector and transformed in *E. coli*. The expression of the target protein was confirmed by SDS-PAGE. The experiment for

optimization of gene expression showed that the optimal condition was 37°C for bacterial culture, 4 hours of induction time using 1 mM IPTG in OD₆₀₀=0.6. In the next step, in order to perform a bioassay on transformed bacteria, the threshold of tolerance of control bacteria in minimum phosphate-free medium with different concentrations of glyphosate was investigated and compared with recombinant bacteria. The result indicated that the wild type bacteria were not able to tolerate concentration of more than 0.5 mM glyphosate but the recombinant bacteria survived to a concentration of 1 mM. These results were confirmed by colony counting on selective media with three repetitions. Hence, glyphosate oxidoreductase gene could be a suitable candidate besides the other glyphosate resistance genes for genetic manipulation of strategic plants with the aim of obtaining higher and more sustainable levels of resistance to this herbicide.

Key words: Glyphosate, gene expression, glyphosate oxidoreductase, protein expression.