

مطالعه فیلوژنتیکی باکتری سودوموناس پوتیدا/ تولید کننده پرولین دهیدروژناز و آنالیز بیوانفورماتیکی آنزیم جداسازی شده

انور سادات کیان مهر^۱ و رحمان مهدی زاده دهوسطی^{۲*}

^۱ تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده علوم نوین پزشکی تبریز، گروه زیست فناوری پزشکی

^۲ بندرجاسک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندر جاسک، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۲۵

چکیده

فلاوانزیم پرولین دهیدروژناز (EC 1.5.99.8) نقش مهمی را در زیست‌حسگرها و کیت‌های غربالگری به منظور تشخیص بیماری‌های متابولیک مرتبط با نقص پرولین ایفاء می‌نماید. هدف از این تحقیق، جداسازی و تعیین مشخصات میکروارگانیزم‌های تولید کننده آنزیم‌های دخیل در متابولیسم پرولین از نمونه‌های خاک ایران بود. غربالگری آنزیم‌های تخریب کننده L-پرولین از نمونه‌های خاک در سه مرحله شامل تکنیک کشت غنی، کروماتوگرافی لایه نازک و سنجش فعالیت آنزیمی انجام شد. میکروارگانیزم جداسازی شده توسط واکنش‌های بیوشیمیایی، آنالیز ژنهای RNA ریبوزومی ۱۶S، 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) و رسم درخت فیلوژنتیکی تعیین مشخصات گردید. مطالعات کینتیکی بر روی آنزیم شناسایی شده انجام شد و ساختار سه بعدی آن توسط روش‌های بیوانفورماتیکی شبیه‌سازی گردید. در بین ۱۵۰ میکروارگانیزم جداسازی شده از ۳۰ نمونه خاک، تنها یک سویه باکتری، فعالیت قابل ملاحظه‌ای نسبت به اسید آمینه L-پرولین (۱۰U/ml) از خود نشان داد. پارامترهای ثابت میکائلیس-متن و سرعت ماکزیمم به ترتیب ۰/۱۲ میلی مولار و ۰/۱۱ میلی مولار بر دقیقه محاسبه شدند. سویه باکتری با استفاده از آنالیز فیلوژنتیکی ژنهای RNA ریبوزومی ۱۶S و ITS به عنوان بیوتایپ جدیدی از سودوموناس پوتیدا/ شناسایی شد. ساختار سه بعدی شبیه‌سازی شده از آنزیم مذکور نیز قرار داشتن پرولین دهیدروژناز جداسازی شده در آنزیم‌های خانواده سودوموناس پوتیدا/ها را تأیید نمود. این تحقیق، اولین گزارش از تولید پرولین دهیدروژناز توسط باکتری سودوموناس پوتیدا/ جداسازی شده از نمونه خاک می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، غربالگری، پرولین دهیدروژناز، سودوموناس پوتیدا/

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۷۶۱۲۹۲۵، پست الکترونیکی: Rahman.biochem@gmail.com

مقدمه

طبیعت به عنوان اولین مرحله در مسیر تحقیق و توسعه محصولات آنزیمی محسوب می‌شود (۲). گروه مهمی از آنزیم‌ها که مطالعات غربالگری گسترده‌ای بر روی آنها انجام شده است، کاتالیزور زیستی پرولین دهیدروژناز می‌باشد (۱۳ و ۱۴). این آنزیم که نقش مهمی در مسیر متابولیسم پرولین به گلوتامات ایفاء می‌نماید از منابع مختلف باکتریایی، گیاهی و حیوانی گزارش شده است (۵).

میکروارگانیزم‌ها مهمترین و ایده آل‌ترین منبع تولید کننده آنزیم‌های مختلف با دامنه کاربردهای گسترده به شمار می‌آیند. از مزایای آنزیم‌های میکروارگانیزم‌ها می‌توان به امکان کنترل فیزیولوژیکی و فیزیکی شیمیایی، تنوع آنزیمی و مقادیر بالای تولید اشاره نمود (۱). در این راستا، جداسازی و غربالگری آنزیم‌های جدید با خصوصیات موثر و بهینه از میکروارگانیزم‌های ساکن

در اولین مرحله از این مسیر متابولیکی، پرولین دهیدروژناز در حضور کوفاکتور FAD پرولین را به ترکیب حدواسط Δ -پیرولین-۵-کربوکسیلات تبدیل می‌نماید. $FADH_2$ تولید شده نیز الکترونهای خود را به پذیرنده های زنجیره انتقال الکترون منتقل می‌کند. در دومین مرحله، Δ -پیرولین-۵-کربوکسیلات در یک واکنش غیر آنزیمی به گلوتامات-۷-سمی آلدئید هیدرولیز شده و سپس توسط آنزیم Δ -پیرولین-۵-کربوکسیلات دهیدروژناز و در حضور کوآنزیم NAD^+ به گلوتامات تبدیل می‌شود (۱۴).

در تمام یوکاریوتها و برخی از باکتریها نظیر ترموس ترموفیلوس (*thermus thermophilus*)، دو دومن این فلاوانزیم توسط دو ژن جداگانه کد می‌شوند (۶). نقص ژنتیکی در مسیر متابولیکی پرولین به گلوتامات باعث بروز بیماری هایپرپرولینمیا در انسان می‌شود (۷). هرچند که شواهدی نیز در خصوص ارتباط بین نقص مسیر متابولیسم پرولین و بروز بیماری اسکیزوفرنی و همچنین نقش آنزیم پرولین دهیدروژناز در مهار سرطان کشف شده است (۸). هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتریهای تولید کننده پرولین دهیدروژناز با خصوصیات کینتیکی مناسب بود. برای این منظور نمونه های مختلفی از شهر تهران جمع آوری شده و مطالعات غربالگری گسترده‌ای بر روی آنها صورت گرفت. بدیهی است که این آنزیمهای باکتریایی می‌توانند مدل‌های مناسبی برای انجام مطالعات ساختاری و درک آنزیمهای همتای آنها در انسان باشند. این مطالعه، اولین گزارش از جداسازی سودوموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*) تولید کننده پرولین دهیدروژناز می‌باشد.

مواد و روشها

مواد: L-پرولین و پلیتهای TLC سیلیکاژل 20x20cm از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. (2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium

غربالگری آنزیمهای تخریب کننده L-پرولین: روشهای اصلی غربالگری برای تولید کنندگان آنزیمهای متابولیزه کننده پرولین، به شرح زیر بودند:

تکنیک کشت غنی: غربالگری اولیه باکتریهای تولید کننده آنزیمهای دخیل در متابولیسم پرولین توسط تکنیک کشت غنی در محیط کشت حاوی پرولین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، انجام شد. یک گرم از هر نمونه خاک به ۵ میلی لیتر محیط انتخابی PYP که حاوی ۵ درصد (w/v) L-پرولین، یک گرم در لیتر کلرید سدیم، دو گرم در لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات، نیم گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و ۵ گرم در لیتر پلی پپتون با pH= ۷/۰ بود اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱۴۰rpm انکوبه گردید. از هر نمونه تا 10^{-4} سریال رقت تهیه شده و پس از کشت در پلیتهای آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. تک کلنیهای رشد کرده براساس خصوصیات مورفولوژیکی متمایز گردیده و سپس هر کلنی به یک محیط آگار جدید انتقال داده شد (۲).

کروماتوگرافی لایه نازک: در غربالگری ثانویه، توانایی تخریب L-پرولین در میکروارگانیسیمهای جداسازی شده توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک، بررسی شد. به مقدار دو ماکرولیتر از هر یک از محیطهای کشت میکروارگانیسیمهای رشد کرده بر روی پلیتهای سیلیکاژل کروماتوگرافی لایه نازک قرار داده شد و تخریب پرولین

INT، ۰/۲ میلی مولار PMS، بافر ۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl (pH=۷/۵)، ۰/۲ میلی مولار FAD و محلول آنزیم بود. در شاهد، سوبسترای اسید آمینه به وسیله آب جایگزین گردید.

شناسایی سوش جدا شده: شناسایی باکتری توسط مشخصات مورفولوژیکی، روشهای بیوشیمیایی و تکثیر اختصاصی PCR انجام شد (۱۱ و ۱۰).

مشخصات مورفولوژیکی: بررسی خصوصیات مورفولوژی کلونی باکتریها به وسیله کشت آنها در سه محیط Nutrient agar, Blood agar و MacConkey agar (MAC) انجام شد (۱۱).

روشهای بیوشیمیایی: مهم ترین تستهای بیوشیمیایی به شرح زیر بودند: Triple Sugar Iron Agar (TSIA)، مصرف سیترات، متیل قرمز، Voges-Proskauer test (VP)، تست حرکت، هیدرولیز اوره، تولید ایندول، اکسیداز، کاتالاز، تولید سولفید هیدروژن و تولید پلی ساکارید لوان که به این منظور سوش مورد نظر در محیط PYP حاوی ۱/۵ درصد آگار و ۱۰ درصد ساکاروز کشت داده شد. تشکیل کلونیهای بزرگ و موکوئیدی نشان دهنده *سودوموناس فلورسانس* بودن و عدم تشکیل این کلونیاها از ویژگی *سودوموناس پوتیل* بود (۱۱ و ۱۰).

تخلیص DNA ژنومی برای واکنش PCR: DNA ژنومی باکتری با استفاده از روش Dr. R.H. Doi استخراج گردید و صحت خلوص با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۷ درصد تأیید گردید (۱۲).

کلونینگ و توالی یابی ژن RNA ریپوزومی ۱۶s: ژن RNA ریپوزومی ۱۶s توسط پرایمرهای اختصاصی S-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و S-R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') تکثیر شد

توسط قراردادن پلیت در حلال فاز متحرک تشکیل شده از آب واتانول، بررسی و شناسایی گردید. پلیتها پس از خشک شدن بر روی Hot plate در محلول نین هیدرین ۲ درصد قرار داده شدند. ظهور لکه صورتی بر روی پلیت به منزله عدم تخریب پرولین و ترشح نشدن آنزیم پرولین دهیدروژناز در سویه‌ها بود که به عنوان نتیجه منفی در غربالگری تلقی می‌شد. میکروارگانیزمهایی که لکه‌های صورتی رنگ بر روی پلیتها تشکیل ندادند به منزله نتیجه مثبت در غربالگری محسوب شده و جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب گردیدند (۹).

کشت باکتری و تولید آنزیم: تولید آنزیم در محیط مشابه استفاده شده برای غربالگری انجام شد با این تفاوت که در آن آگار اضافه نشد. سویه‌های انتخاب شده در محیط تولید تلقیح شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار (Kühner shaker Switzerland ISF-1-W) انکوبه شدند. سلولهای رشد کرده در اواخر فاز لگاریتمی در ۵۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و بعد از خارج کردن محلول روئی، رسوب حاصل دو مرتبه با محلول سوم فیزیولوژیکی، شستشو داده شد. سلولهای شستشو داده شده پس از حل شدن در ۵۰ میلی لیتر از بافر ۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl (pH=۸/۰) توسط سونیکاتور و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد لیز شدند. سپس سلولها و مواد نامحلول توسط سانتریفیوژ جدا شده و از محلول رویی در ادامه آزمایشات استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیمی: فعالیت آنزیمی پرولین دهیدروژناز با احیاء INT در حضور L-پرولین در طول موج ۴۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر Shimadzu uv-visible-1601PC-spectrophotometer, Japan) مورد سنجش قرار گرفت. مخلوط واکنش با حجم ۱ میلی لیتر شامل محلول ۲۰۰ میلی مولار پرولین، ۰/۵ میلی مولار

سودوموناس با استفاده از نرم‌افزار MEGA روی هم‌اندازی شدند. درختهای فیلوژنتیکی توسط روش Neighbor joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA رسم شد (۱۵) و تست BootStarp به منظور تایید صحت و اعتبار درختهای به دست آمده ۱۰۰۰ برابر تکرار گردید.

شماره دسترسی به توالی نوکلئوتیدی: توالیهای کامل ژنهای ۱۶S و ITS سوش جدا شده تحت شماره‌های دسترسی GU208206 برای 16S rDNA و Gu289189 برای ITS در بانک ژن ثبت شدند.

تعیین پارامترهای کینتیکی: مطالعات کینتیک حالت پایا به منظور محاسبه پارامترهای ثابت میکائلیس-متن (K_m) و سرعت ماکزیمم (V_{max})، انجام شد. جهت تعیین پارامترهای کینتیکی از نمودار معکوس دو طرفه که معادله لینیور-برک نامیده می‌شود، استفاده شد. برای این منظور فعالیت آنزیمی در حضور غلظتهای مختلف سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت و نمودار به صورت عکس تغییرات غلظت سوبسترا در مقابل عکس سرعت فعالیت آنزیمی تهیه شد (۲).

جداسازی ژن کد کننده پرولین دهیدروژناز و شبیه سازی ساختار سه بعدی آنزیم: ژن پرولین دهیدروژناز توسط پرایمرهای (5'- POS-F (TATCATATGCTGACCTCCTCGCTCACC-3') و (3'- POS-R (AGGATCCAATCGGCGATGCGG) تکثیر شد. مخلوطهای واکنش همچنانکه در بالا شرح داده شد تهیه شدند. محصول PCR از روی ژل آگاروز خالص شد و در حامل pET23a کلون گردید. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن آنزیم توالی‌یابی شد و جستجوی شباهت DNA توسط پایگاه NCBI با استفاده از خدمات شبکه BIAST انجام گرفت. با استفاده از توالی نوکلئوتیدی به دست آمده، توالی پروتئینی آنزیم توسط برنامه DNASIS MAX (DNASIS version 2.9, Hitachi Software software Engineering Co., Ltd., Japan) پیش بینی گردید و با

(۱۳). تکثیر PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، بافر PCR1x، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی مولار، ۰/۳ میلی گرم DNA الگو و ۲/۵ واحد از DNA Taq پلی مرز در دستگاه ترمو سایکلر (Thermal Cycler, Eppendorf, Germany) انجام شد. محصول PCR به دست آمده در ژل آگاروز ۱/۵ درصد افقی آنالیز شده و پس از برش از روی ژل تخلیص گردید. rDNA ریپوزومی ۱۶S تکثیر شده در وکتور pJET1.2 کلون شد و به داخل اشریشیا کلی (*Escherichia coli* JM107) ترانسفورم گردید. حامل پلاسمیدی توسط پروتکل استخراج پلاسمید از کلونهای مثبت، جدا شد. توالی یابی توسط شرکت ماکروژن (سئول کره) با پرایمرهای توالی یابی مناسب انجام شد. توالی ژن rDNA ریپوزومی ۱۶S سویه با توالیهای مرجع rDNA ریپوزومی ۱۶S با استفاده از برنامه BLAST در NCBI روی هم اندازی شد. روی هم اندازی چندگانه توالیها و محاسبات میزان شباهت توالی توسط برنامه Clustalw انجام گرفت.

تکثیر PCR و توالی‌یابی 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS): ناحیه ITS توسط پرایمرهای ITS-F (5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3') و ITS-R (5'-TCCGGGTTACTTAGATGTTTC-3') تکثیر شد (۱۴). مخلوطهای واکنش همچنان که در بالا شرح داده شد تهیه شدند. محصول PCR از روی ژل آگاروز خالص شد و در حامل PJET 1.2 کلون گردید. پلاسمید نوترکیب حاوی ژن ITS توسط پرایمرهای توالی‌یابی مناسب در شرکت ماکروژن توالی‌یابی شد و جستجوی شباهت DNA توسط پایگاه NCBI با استفاده از خدمات شبکه BLAST انجام شد.

آنالیز فیلوژنتیکی ژنهای RNA ریپوزومی ۱۶S و ITS: توالیهای مرجع استفاده شده برای آنالیز فیلوژنتیکی از بانک ژن به دست آمدند. ژنهای ITS و RNA ریپوزومی ۱۶S سویه جدا شده و سویه‌های مرتبط از گونه‌های

استفاده از توالی پروتئینی، ساختار سه بعدی توسط برنامه Modeler version 9v9 شبیه‌سازی شد.

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه باکتری جدا شده.

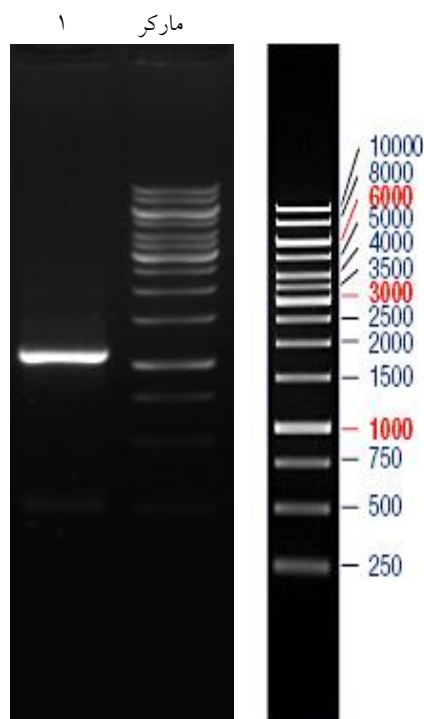
| نتایج | خصوصیات |
|--|---|
| میله ای | شکل |
| صاف، گرد، برآمده، براق با قطر ۱-۲ میلی متر | مورفولوژی کلنی |
| + | رشد بر روی محیط Blood agar |
| + | رشد بر روی محیط مکانکی |
| + | رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد |
| - | رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی گراد |
| - | رنگ آمیزی گرم |
| محلول آبکی و غیر موکونیدی | تست هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد |
| قهوه‌ای مایل به قرمز | تولید رنگدانه |
| آلکان / آلکان | Triple Sugar Iron Agar (TSIA) |
| + | مصرف سیترات |
| - | قرمز متیل |
| + | Voges-Proskauer (VP) |
| + | حرکت |
| - | تولید ایندول |
| - | هیدولیز اوره |
| + | اکسیداز |
| + | کاتالاز |
| - | تولید گاز سولفید هیدروژن |
| + | آرژینین دهیدرولاز |
| - | لسیتیناز (واکنش زرده تخم مرغ) |
| + | احیاء نترات |
| - | هیدرولیز ژلاتین |
| - | تولید پلی ساکارید Levan |
| - | لیزین دکربوکسیلاز |
| - | اورنیتین دکربوکسیلاز |
| - | تریپتوفان دامیناز |
| - | سرف کربوهیدرات‌های مانیتول، اینوزیتول، سوربیتول، ساکاروز، آمیگدال |
| + | مصرف کربوهیدرات‌های گلوکز، ملیبوز، آرابینوز |

نتایج و بحث

آمینواسید L-پرولین توسط آنزیم‌های پرولین دهیدروژناز و دلتا پرولین دهیدروژناز به گلوتامات تبدیل می‌شود. آنزیم‌های باکتریایی شرکت‌کننده در متابولیسم پرولین، الگوهای مستعد جالب توجهی برای مطالعه ساختار و عملکرد هومولوگ‌های انسانی و همچنین اندازه‌گیری اختصاصی پرولین پلاسما در کیت‌های تشخیصی و زیست‌حسگرها می‌باشند (۱۶).

با در نظر گرفتن کاربردهای پزشکی آنزیم‌های کاتابولیزکننده پرولین در تشخیص نقایص مادرزادی متابولیسم پرولین باعث شد تا در این مطالعه تصمیم به جداسازی این کاتالیزورهای زیستی از میکروارگانیسم‌های ساکن خاک گردد. در جریان غربالگری اولیه در محیط حاوی L-پرولین به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، ۱۵۰ سویه جدا شدند. توانایی هر سوش جدا شده در تخریب L-پرولین نیز مورد آزمایش قرار گرفت. ۲۰ تا از میکروارگانیسم‌های جدا شده که قادر به تخریب پرولین بودند توسط کروماتوگرافی لایه نازک تعیین شدند. ظاهر شدن لکه بر روی ورقه کروماتوگرافی لایه نازک به عنوان عدم تخریب پرولین در نظر گرفته شد. به منظور تایید این انتخابها، سوشهای باکتریایی که قادر به استفاده از L-پرولین بودند در محیط تولید کشت داده شدند و فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. در مجموع از میان ۲۰ سویه جدا شده، تنها سوش POS-F84 که از خاک آب گل‌آلود جدا شده بود، به عنوان سوش تخریب‌کننده L-پرولین در نظر گرفته شد. به منظور شناسایی سوش POS-F84، آنالیزهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی انجام شد. باکتری جدا شده، گرم منفی، میله‌ای شکل و متحرک بود. نتایج تستهای بیوشیمیایی در جدول ۱ نشان داده شده است. خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد که سویه جداسازی شده شبیه به سودوموناس پوتیدا می‌باشد.

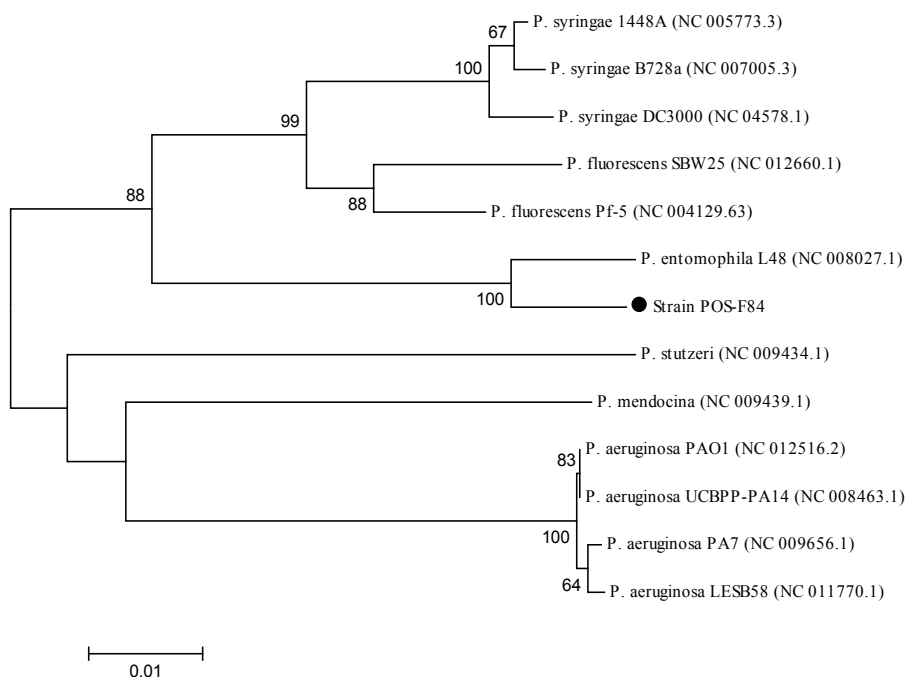
تشخیص بیشتر توسط مقایسه توالی rDNA ۱۶S و دیگر باکتریها در پایگاه بانک ژن انجام شد. به این منظور ابتدا ژن DNA ریبوزومی ۱۶S توسط واکنش PCR تکثیر شد و توالی یابی گردید. شکل ۱ محصول حاصل از PCR انجام شده بر روی ریبوزومی ۱۶S را نشان می‌دهد که طول محصول ۱۵۰۰ جفت باز تخمین زده شد. توالی ژن DNA ریبوزومی ۱۶S سویه POS-F84 دارای ۹۹ و ۹۸ درصد شباهت به ترتیب با توالیهای سودوموناس پوتیدا و سودوموناس اتموفیلا بود. روی هم‌اندازی متعدد توالیها و آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که سوش جدا شده به سودوموناس اتموفیلا نزدیک‌تر بود (شکل ۲).



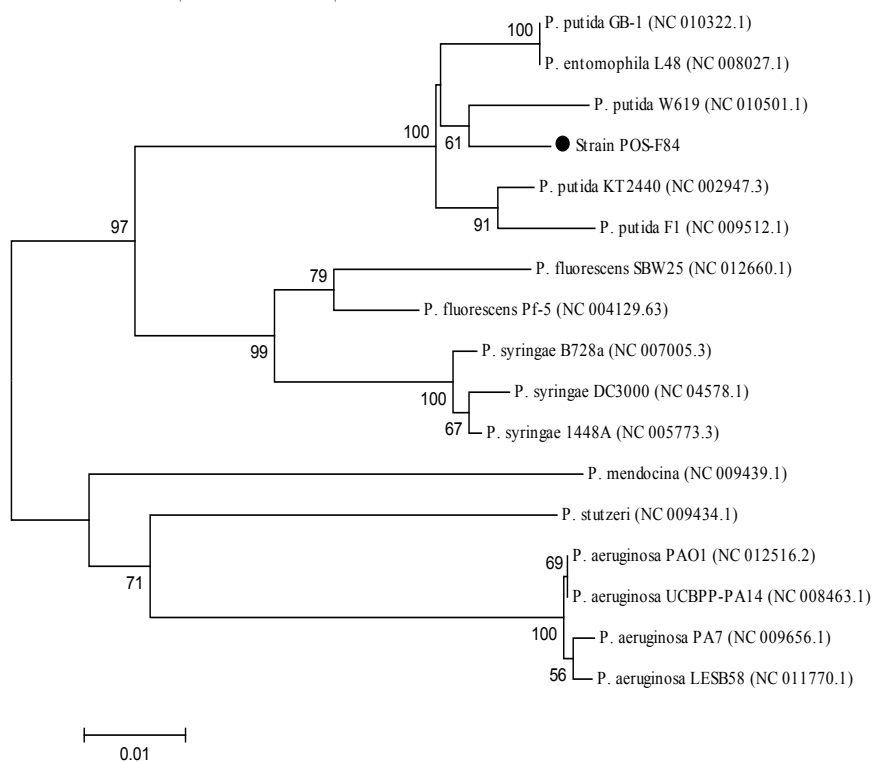
شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگاروز ۱ درصد از PCR انجام شده بر روی ژن RNA ریبوزومی ۱۶S. مارکر ۱ kb. ۱: ژن RNA ریبوزومی ۱۶S PCR شده (۱۵۰۰ bp).

لیکن، با در نظر گرفتن ارتباط نزدیک بین سودوموناس پوتیدا و سودوموناس اتموفیلا (۷۰/۲ درصد از ژنهای سودوموناس اتموفیلا دارای شباهت با ژنوم سودوموناس

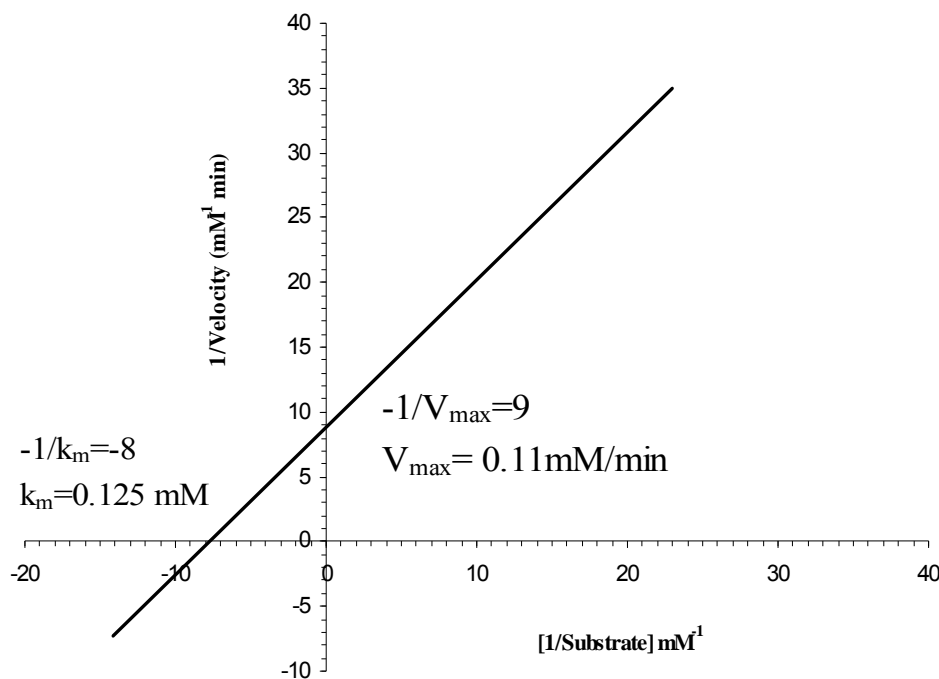
پوتیدا/ هستند)، این تفاوت ۱ درصدی نمی‌توانست برای تشخیص دقیق سوش مورد نظر کافی باشد (۱۷).



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده از ژن rDNA ریپوزومی ۱۶S سوش جدا شده و باکتریهای خانواده سودوموناس ها. درخت فیلوژنتیکی توسط روش Neighbor joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA رسم شد.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده از ژن ITS سوش جدا شده و باکتریهای خانواده سودوموناس ها. درخت فیلوژنتیکی توسط روش Neighbor joining و با استفاده از نرم‌افزار MEGA رسم شد.



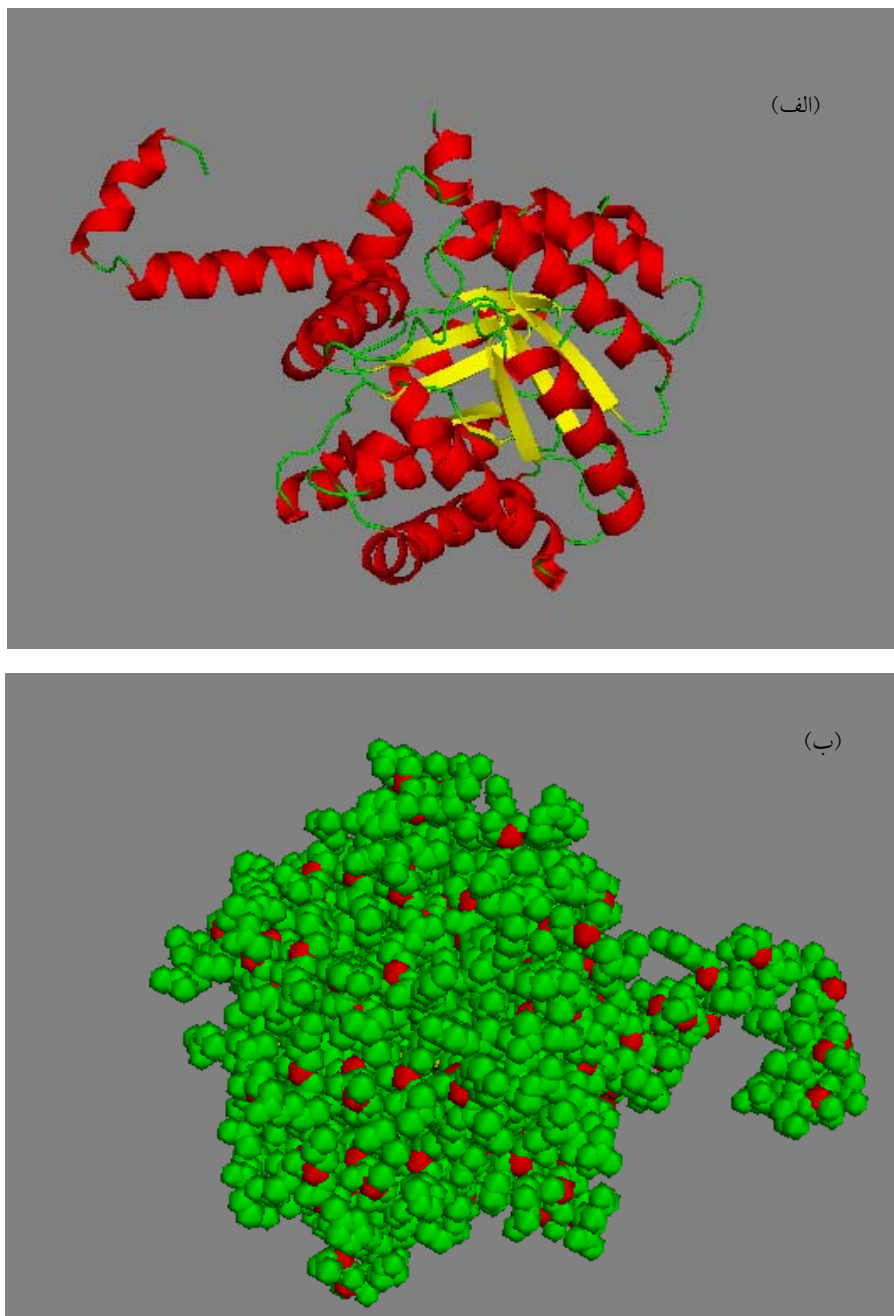
شکل ۴- نمودار لینویر-برک ترسیم شده برای پرولین دهیدروژناز در حضور سوبسترای L-پرولین.

تشخیص داده شد. پارامترهای ثابت میکائلیس-منتن و سرعت ماکزیمم برای آنزیم پرولین دهیدروژناز در سودوموناس پوتیدا به ترتیب ۰/۱۲ میلی مولار و ۰/۱۱ میلی مولار بر دقیقه اندازه گیری شدند. شکل ۴ نمودار لینویر-برک ترسیم شده برای آنزیم مذکور را نشان می‌دهد. ثابت میکائلیس-منتن پرولین دهیدروژناز جدا شده نسبت به آنزیم مشابه در سویه‌های باکتریایی دیگر نظیر سودوموناس آئروجینوزا (۴)، سالمونلا تیفوموریم (*Salmonella typhimurium*) (۵) و اشریشیا کلی (۷) پایین تر بود که این خصوصیت از ویژگی‌های قابل توجه آنزیم جدا شده محسوب می‌شود. جهت مطالعات بیوانفورماتیکی بر روی آنزیم، ساختار سه بعدی توسط برنامه Modeler شبیه سازی شد. شکل ۵ تصویر ساختار سه بعدی پرولین دهیدروژناز را در دو نمایش نواری (Ribbon) و کره ای (Sphere) نشان می‌دهد. ساختار

در حقیقت، تنوع ناکافی در توالیهای ژن rRNA ۱۶s به منظور تمایز گذاشتن در میان ارگانیسم‌های نزدیک به هم خصوصاً در سطوح بین گونه‌ای وجود دارد (۱۸). از این رو پیشنهاد شده است که ناحیه ITS می‌تواند به دلیل تفاوت زیادتر در طول و توالی، بر این مشکل غلبه کند. در حقیقت، استفاده از پلی مورفیسم ITS یک ابزار قدرتمند در آنالیز فیلوژنتیکی است. به این دلایل، در این تحقیق به منظور تمایز دقیق سویه جدا شده POS-F84، ناحیه ITS توالی‌یابی گردید. نوکلئوتید ITS توسط برنامه BLAST آنالیز شد و به ترتیب ۹۷ و ۹۴ درصد شباهت با ITS سویه‌های سودوموناس پوتیدا و سودوموناس اتموفیلا نشان داد. براساس درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای توالیهای ITS (شکل ۳). نتیجه گیری شد که سوش POS-F84 بیشتر شبیه به سودوموناس پوتیدا بود. بنابراین، این سویه به عنوان بیوتایپ جدیدی از سودوموناس پوتیدا

در اتصال به کوفاکتور و واکنش کاتالیتیکی دخالت دارند که این دنباله‌های آمینواسیدی در پرولین دهیدروژنازهای سودوموناسها حفاظت شده می‌باشند.

شبه‌سازی شده شباهت قابل ملاحظه‌ای با آنزیم‌های خانواده سودوموناسها نظیر سودوموناس آئروجینوزا و سودوموناس فلورسانس داشت (۲۰۱۹). آنالیز جایگاه فعال نشان داد که دنباله‌های تیروزین، لیزین و اسپارژین



شکل ۵- ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده برای پرولین دهیدروژناز. الف) نمایش نواری، ب) نمایش کره ای.

مجموع، یک سوش سودوموناس پوتیدا تولیدکننده آنزیم پرولین دهیدروژناز در جریان مطالعات غربالگری بر روی

این ویژگی نیز از دلایل دیگر قرار داشتن آنزیم جداسازی شده در گروه پرولین دهیدروژنازهای سودوموناسها بود. در

سودوموناس پرتیلا/ واجد توانایی تولید پرولین دهیدروژناز است.

نمونه‌های خاک جداسازی شد و با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و تعیین هویت گردید. این تحقیق، اولین گزارش از جداسازی یک سوش

منابع

- ۱- شهباز محمدی، ح. و امید نیا، ا. ۱۳۸۷. جداسازی، غربالگری و تعیین خصوصیات آنزیمی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آمینواسید دهیدروژنازها از نمونه‌های خاک ایران. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۱، ص ۹۴-۱۰۴.
- ۲- مشایخی، ف.، امید نیا، ا.، شهباز محمدی، ح.، ابراهیمی راد، م.، حسین خانی، س. و گره گوریان، آ. ۱۳۸۹. تخلیص و بازیافت آلکالین پروتئاز مقاوم به حرارت در سامانه‌های دوفازی آبی. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۳، شماره ۳، ص ۳۶۷-۳۷۶.
- 3- Asano Y., Tanetani M. 1998. Thermostable phenylalanine dehydrogenase from a mesophilic *Microbacterium* strain DM86-1. Arch. Microbiol. 169, 220-224.
- 4- Baban B.A., Vinod M.P., Tanner J.J., Becker D.F. 2004. Probing a hydrogen bond pair and the FAD redox properties in the proline dehydrogenase domain of *Escherichia coli* PutA. Biochem. Biophys. Acta. 1701, 49-59.
- 5- Baron E.J., Finegold S.M. 1990. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*, 8th Ed. The C.V. Mosby Company, ST. Louis. Baltimore. Philadelphia. Toronto. pp. 363-407.
- 6- Bodilis J., Calbrix R., Guerillon J., Merieau A., Pawlak B., Orange N., Barry S. 2004. Phylogentic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. Appl. Microbiol. 27, 93-108.
- 7- Hongpattarakere T., Seksun N., Suriya A. 2003. Isolation and screening of D-amino acidamidase producing bacteria from soil samples. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2, 255- 265.
- 8- Jeng R.S., Svircev A.M., Myers A.L., Beliaeva L., Hunter D.M., Hubbes M. 2001. The use of 16S and 16S-23S rDNA to easily detect and differentiate common gram-negative orchard epiphytes. Microbiol. Methods. 44, 69-77.
- 9- Krieg N.R., Holt J.G. 1984. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Vol.1. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- 10- Lee Y.H., Nadaraia S., Gu D., Becker D.F. Tanner J.J. 2003. Structure of the proline dehydrogenase domain of the multifunctional PutA flavoprotein. Nat. Struct. Biol. 10, 109-114.
- 11- Meile L., Leisinger T. 1982. Purification and properties of the bifunctional proline dehydrogenase/1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Eur. J. Biochem. 129, 67-75.
- 12- Nakagawa T., Shimada M., Mukai H., Asada K., Kato I., Fujino K., Sato T. 1994. Detection of alcohol-tolerant Hiochi bacteria by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60, 637-640.
- 13- Palmer T. 2003. *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry*. Harwood Publishing Limited, International Publishers, Coll House, Weatergate, Chichester, Weat Sussex, England, pp. 354-355.
- 14- Shahbaz Mohammadia H., Omidinia E., Sahebghadam Lotfi A., Saghiri R. 2007. Preliminary report of NAD⁺-dependent amino acid dehydrogenases producing bacteria isolated from soil. Iranian Biomed. J. 11, 131-135.
- 15- Straub P.F., Reynolds P.H.S., Althomsons S., Mett V., Zhu Y., Shearer G., Kohl DH. 1996. Isolation, DNA sequence analysis, and mutagenesis of a proline dehydrogenase gene (*putA*) from *Bradyrhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 221-229.
- 16- Scarpellini M., Franzetti L., Galli A. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. Microbiol. Lett. 236, 257-260.
- 17- Satomura T., Kawakami R., Sakuraba H., Ohshima T. 2002. Dye-linked D-proline dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum* is a novel FAD-dependent amino acid dehydrogenase. J. Bio. Chem. 277, 12861-12867.
- 18- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution .24, 1596-1599.

- 19-Vilchez S., Molina L., Ramos C., Ramos J. 2000. Proline metabolism by *Pseudomonas putida*: cloning, characterization, and expression of the *put* genes in the presence of rootexudates. J. Bacteriol. 182, 91-99.
- 20-White T.A., Krishnan N., Becker D.F., Tanner J.J. 2007. Structure and kinetics of monofunctional proline dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. J. Biol. Chem. 282, 14316-14327.

Phylogenic Study of Proline Dehydrogenase Producing *Pseudomonas putida* Bacterium and Bioinformatics Analysis of Isolated Enzyme

Kianmehr A.S.¹ and Mehdizadeh R.²

¹Medical Biotechnology Dept., School of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R. of Iran

²Biology Dept., Islamic Azad University, Bandar Jask Branch, Bandar Jask, I.R. of Iran

Abstract

Proline dehydrogenase flavoenzyme (ProDH; EC 1.5.99.8) plays an important role in the biosensors and diagnostic kits for the diagnosis of proline related metabolic disorders. The purpose of this research was to isolate and characterize proline metabolizing enzymes producing microorganisms from Iranian soil samples. Isolation and screening of L-proline degradative enzymes from soil samples was carried out in three steps employing enrichment culture technique, thin layer chromatography (TLC) and enzyme activity assay. The isolate was characterized by biochemical reactions, 16S rRNA gene analysis and 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) sequencing. Kinetic studies were performed and 3-D structure of the enzyme of interest was predicted through bioinformatics methods. Among the 150 soil isolates recovered from 30 samples, only one strain displayed the highest enzyme activity toward L-proline (10 U/ml) than others. The K_m and V_{max} values were calculated as 0.12 mM and 0.11 mM/min. The strain was characterized as a new biotype of *Pseudomonas putida* using phylogenetic analysis of 16s rRNA and 16S-23S rRNA ITS. The predicted 3-D structure of target enzyme also confirmed the similarity of isolated ProDH to the family of *P. putida* enzymes. This is the first report concerning the ProDH production by a *P. putida* bacterium isolated from soil sample.

Key words: Proline dehydrogenase (ProDH), *Pseudomonas putida*, Phylogenic Analysis