کلونینگ ژن آلفا آمیلاز در وکتور انتقالی pGFK114.1 اشرشیاکولی- باکتروئیدی و انجام کانژوگاسیون بین سویه های مختلف *Escherichia coli* جهت امکان استفاده از آن در محیط گوارشی نشخوارکنندگان

فاطمه مرادیان[۱*]، حشمت اله عقبی طلب[۲] ، قدرت اله رحیمی[۲] و حشمت اله رحیمیان[۳]

[۱] مازندران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، گروه علوم پایه

[۲] مازندران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم دام و شیلات، گروه علوم دامی

[۳] مازندران، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم زراعی، گروه گیاه پزشکی

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۸

چکیده

پیشرفتهای اخیر در تکنولوژیDNA نوترکیب وسیستم انتقال ژن، تغییرات ژنتیکی باکتریهای شکمبه ای را با توانایی تولید آنزیمهای هیدرولیز کننده در صنعت دامپروری ممکن ساخته است. این تکنولوژی می تواند ضمن کاهش معایب افزودنیهای آنزیمی باعث افزایش بازدهی مواد مغذی در شکمبه شود. از آنجایی که فرآیند ترانسفورماسیون باکتریهای سیستم گوارشی دارای بازدهی پایینی می باشد کانژوگاسیون می تواند یکی از روشهای مؤثر انتقال ژن در شکمبه باشد. در بیشتر تحقیقات صورت گرفته از باکتری اشرشیا کولی بهره می گیرند که یک باکتری بی هوازی اختیاری است و می تواند در شرایط بی هوازی شکمبه رشد نماید. در این تحقیق ژن آلفا آمیلاز که پیش از این در وکتور pET28a کلون شده بود با تکثیر در واکنش زنجیره ای پلیمراز در وکتور انتقالی pGFK114.1 ساب کلون شد و درون سویه ای از باکتری *Escherichia coli DH5α* ترانسفورم گردید. سپس عمل کانژوگاسیون بین سویه دیگری از باکتری اشرشیاکولی با کمک وکتور انتقالی pRK231 که در سویه *TG1 Escherichia coli* ترانسفورم شده بود، صورت گرفت. به این ترتیب باکتری اشرشیا کولی حاوی وکتور انتقال یافته از طریق کانژوگاسیون، بیانگر انتقال موفق مواد ژنتیکی توسط این روش می باشد که در محیط شکمبه هم طبق گزارشات موجود به راحتی قابل انجام می باشد.

واژه های کلیدی: DNA نوترکیب، کانژوگاسیون، کلونینگ، وکتور انتقالی، وکتور کمکی و ترانسفورماسیون

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱-۳۳۶۸۷۶۵۵ ، پست الکترونیکی: moradi_f@yahoo.com

مقدمه

یکی از برنامه های اصلاح نژاد ایجاد جانوران ترانس ژنیک است که به دنبال رسیدن به اهدافی از جمله؛ استفاده افزون تر از مواد غذایی، افزایش سرعت رشد، بهبود بخشیدن کیفیت لاشه و ترکیبات شیر و مقاومت در برابر بیماریها می باشد. جهت رسیدن به اهداف فوق انتقال ژن روش مفیدی برای ایجاد تغییرات مورد نظر در حیوانات اهلی است که این تغییرات می تواند مستقیم از طریق مواد غذایی مصرفی ترا ریخته یا دستکاری ژنتیکی اکوسیستم شکمبه ای صورت گیرد (۸ و ۲۴).در این راستا استفاده از سیستم باکتریهای تغییر یافته ژنتیکی در شکمبه ممکن است بهتر از انتقال مستقیم در ژنوم حیوانات عمل کند که البته با مشکلات خاص خود همراه است. اکوسیستم شکمبه منابع آنزیمهایی است که جهت متابولیسم مواد غذایی نقش مهمی دارد. میکروبهای شکمبه قادر به تولید

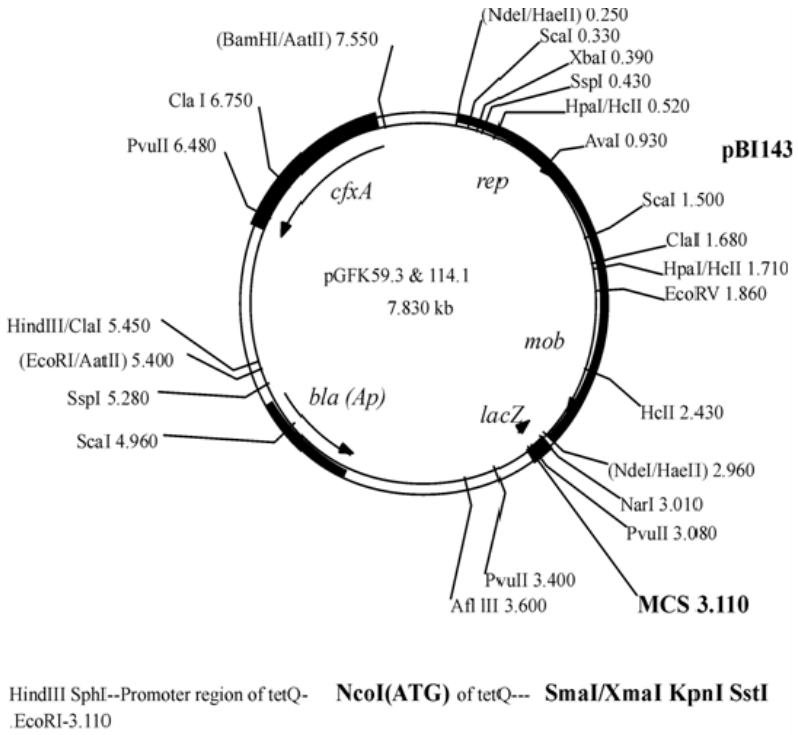
آنزیمها در مقیاسی که بتواند از همه مواد خوراکی مصرفی استفاده کامل نمایند نبوده و لذا تولید کنندگان آنها را به صورت مکمل به جیره غذایی دام می افزایند که کاربرد آنزیمها به عنوان مکمل به علت قیمت بالا، زمان طولانی برای تولید آنها، مشکلات نگهداری، نیمه عمر کوتاه و احتمال غیر فعال شدن سریع در سیستم گوارشی، استفاده از آنها را محدود کرده است (۱، ۳، ۹ و ۱۸). بنابراین با استفاده از کلونینگ و با وارد کردن ژن آنزیمهای هیدرولیز کننده میزان تولید آنها را در محیط دستگاه گوارش افزایش می دهند. آمیلاز یکی از آنزیمهایی است که به صورت مکمل به جیره غذایی نشخوارکنندگان افزوده می شود. امروزه این آنزیم در مقادیر زیاد حدود ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ واحد در روز به غذای دام افزوده می شود. این آنزیم هیدرولیز کننده از اهمیت برابری نسبت به سایر آنزیمها بر خوردار است و سودمندی زیادی در متابولیسم دارد از جمله بهبود بهره وری از مواد غذایی، افزایش وزن، کاهش حجم مدفوع و نیتروژن دفع شده می باشند(۱۲ و ۲۲). مطالعات گذشته نشان داده که هضم نشاسته شکمبه ای کامل نیست به خصوص در گاو هایی که با ذرت، گندم و سایر دانه های نشاسته ای تغذیه می شوند و این مقدمه ای برای مهندسی باکتریها جهت تولید بیشتر آمیلاز می باشد (۱۱) برای دستیابی به این هدف ایزوله کردن باکتریهای شکمبه جهت مهندسی ژنتیک، مستلزم هزینه های بالایی است که دراین راستا استفاده از سیستمهای انتقال ژن نقش مؤثرتری دارد (۱۸). از آنجایی که انتقال پلاسمید بین سویه های مختلف در شکمبه ثابت شده(۲۰) و باکتریها به صورت طبیعی در شکمبه مواد ژنتیکی خود را بیشتر از طریق کانژوگاسیون جا به جا می کنند(۱۸) این روش الگویی برای انجام تحقیق حاضر بوده است. در مطالعه حاضر، کلونینگ ژن آلفا آمیلاز در وکتور انتقالی pGFK114.1 اشر شیاکولی – باکتروئید و ترانسفورماسیون آن به سویه *Escherichia coli* $DH_5\alpha$ صورت گرفت زیرا انتقال به *Escherichia coli* راحت تر از باکتروئید ها انجام می گیرد و ترانسفورم کردن باکتروئید ها به آسانی صورت نمی پذیرد. برای انجام کانژوگاسیون بین سویه های مختلف اشرشیاکولی جهت بررسی عمل انتقال ژن به یک سیستم انتقالی احتیاج می باشد بدین جهت از ترانسفورماسیون سویه دیگری از باکتری TG1 *Escherichia coli* با وکتور انتقال دهنده pRK321 استفاده شده است. نتایج حاصل از کانژوگاسیون نشان داده که گونه باکتری فاقد وکتور حامل ژن هدف در محیط آزمایشگاه(in vitro) قادر به دریافت پلاسمید مورد نظر می باشد که این روش به طور طبیعی هم در محیط سیستم گوارشی به صورت in vivo می تواند انجام گیرد(۲۳). به این ترتیب از طریق سلولهای باکتری نوترکیب حاصل می توان جمعیت باکتروئیدهای شکمبه ای را به منظور بیان ژن هدف ترانسفورم نمود.

مواد و روشها

کشت باکتری و تکثیر پلاسمید: باکتری ترانسفورم شده با پلاسمید pET28a در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰µ g/ml) تکثیر گردید سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید(Bioneer)صورت گرفت. وکتور های pGFK114.1 و pRK231 از طرف پروفسور نادجا شومیکر از دانشگاه ایلینویز، آمریکا به صورت هدیه دریافت شده است (شکل ۱).

واکنش زنجیره ای پلی مراز: جهت تکثیر ژن آمیلاز یک جفت پرایمر آغازگر رفت F-*Nco*I: 5'-CATGCCATGGCGCCATCAATAAAGAGCGGGACG-3' و آغازگر برگشت R-*Sac*I: 5'-TTCGAGCTCGATGGGGAAGAGAACCGCTTAA-3') طراحی شدند که در انتهای ۵' حاوی توالی مربوط به آنزیمهای برشی Sac I و Nco I براساس اطلاعاتی که از جایگاه چند گانه کلونینگ وکتور انتقالی وجود داشت، تعبیه شدند. واکنش زنجیر ه ای پلیمراز به صورت: واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به

مدت ۵ دقیقه ، واسرشته سازی دوم در همین دما به مدت ۱ دقیقه، واکنش اتصال در دمای ۶۸ به مدت ۱:۳۰، واکنش تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱:۳۰ و بسط نهایی در همین درجه به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

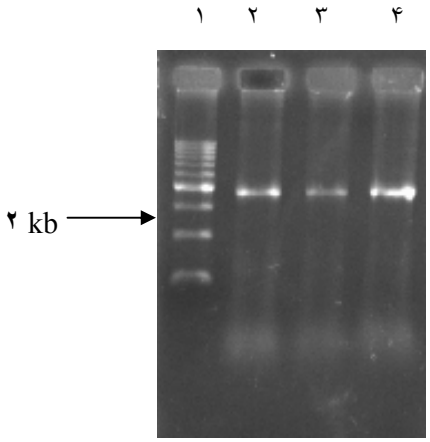


شکل۱ – وکتور انتقالی pGFK114.1 . این وکتور دارای پروموتور بیانی در باکتروئیدها می باشد وهمچنین قادر به همانند سازی در اشرشیاکولی می باشد.

کلونینگ ژن در وکتور انتقالی pGFK114.1: واکنش اتصال بین ژن هضم شده و وکتور هضم شده با آنزیمهای برشی در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد با استفاده از آنزیم T4 DNA ligaseبه صورت شبانه(over night) انجام گرفت. بعد از واکنش اتصال، با روش شوک گرمایی به باکتری *Escherichia coli* ترانسفورم گردید . به این صورت که ابتدا باکتری و وکتور را در یخ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می گردد و سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱–۲ دقیقه تحت شوک حرارتی قرار می گیرد و مجددا به مدت ۵ دقیقه به یخ منتقل شده سپس به آن محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک اضافه شده و در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شود. باکتری ترانسفورم شده به محیط x-Gal و IPTG و آنتی بیوتیک آمپی سیلین منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت کشت، کلنیهای سفید و آبی ظاهر شده که کلنیهای سفید حاوی وکتور انتقالی می باشند. جهت اطمینان از ورود وکتور حاوی ژن کلون شده، استخراج پلاسمید از کلنی های سفید و آبی صورت گرفت سپس با ژل آگارز مشاهده گردید. همچنین واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمر های طراحی شده برای تکثیر ژن، نیز انجام گرفت.

کانژوگاسیون بین سویه های مختلف باکتری *Escherichia coli* : برای کانژوگاسیون از روش تغییر یافته شومیکر و همکاران استفاده شد(۱۹). باکتریهای *Escherichia coli* از سویه DH5α حاوی وکتور pGFK114.1 و سویه TG1 دارای وکتورpRK231 و سویه بدون وکتور ($BL_{21}(DE_3$ (دارای ژن مقاوم به کلرامفنیکل)

در محیط جداگانه LB مایع (دارای آنتی بیوتیکهای اختصاصی) به صورت شبانه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۴۴ دور رشد داده شدند. پس از سانتریفیوژ در ۳۰۰۰×g، فاز بالایی دور ریخته شده سپس به هر یک از رسوب ها ۵ میلی لیتر محیط کشت LB تازه بدون آنتی بیوتیک اضافه و به صورت سوسپانسیون در آورده شدند و برای شستشوی کامل آنتی بیوتیکها مجدد سانتریفیوژ انجام گرفت.

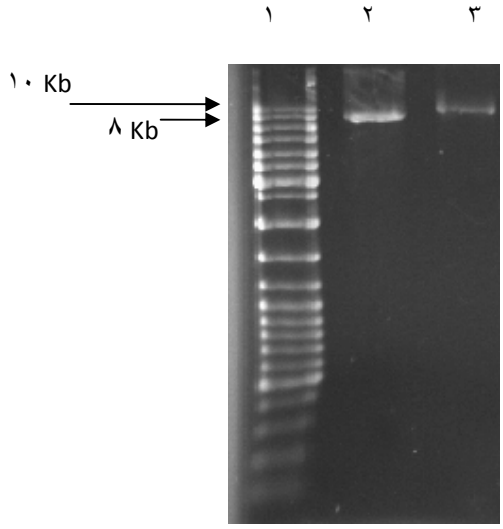


شکل۲ – باند bp ۱۸۵۰ ژن آمیلاز بعد از تکثیر با واکنش زنجیره ای پلیمراز. ستون ۱ مارکر(500bp Fermentas ,DNA ladder) وزن مولکولی، ستون های ۲و۳و۴ باند ژن تکثیر شده

سپس ۵ میلی لیتر محیط کشت LB تازه بدون آنتی بیوتیک به رسوبها اضافه و از هر محیط به مقدار ۲ میلی لیتر برداشته و در یک لوله کشت منتقل شدند و برای مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۲۴۴ دور در انکوباتور قرار گرفتند تا فرصت تماس فیزیکی و انتقال مواد ژنتیکی فراهم شود. پس از انجام کانژوگاسیون سانتریفیوژ صورت گرفت و رسوب باقیمانده را در ۲۰۰ میکرو لیتر محیط LB محیط تازه به صورت معلق در آورده و به محیط انتخابی LB جامد حاوی آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و کلرامفنیکل منتقل شد. برای کنترل منفی در مرحله کشت همزمان سه باکتری، سویه TG1 حاوی وکتور کمکی pRK231 که عمل انتقال وکتور کلونینگ به آن وابسته است به محیط کانژوگاسیون اضافه نگردید .

نتایج

واکنش زنجیره ای پلیمراز: تکثیر ژن آمیلاز با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز صورت گرفت. باند ۱۸۵۰bp بر روی ژل آگارز قابل مشاهده می باشد(شکل ۲).



شکل۳ – استخراج پلاسمید بعد از برداشت کلنیهای آبی و سفید جهت تایید کلونینگ ژن. ستون اول؛ مارکر وزن مولکولی (mi-1Kb DNA marker, metabion)، ستون دوم ؛ پلاسمید بدون ژن هدف (۷٫۸kb) حاصل از استخراج کلنی آبی، ستون سوم؛ پلاسمید حاوی ژن هدف (۹٫۶۸ kb) حاصل از استخراج کلنی سفید.

کلونینگ ژن آمیلاز در وکتور انتقالی pGFK114.1 : ژن تکثیر شده و ناقل پلاسمیدی پس از هضم با آنزیمهای برشی Nco I و Sac I در واکنش اتصال به هم ملحق شدند. و پس از ترانسفورم در باکتری *Escherichia coli* به محیط کشت LBجامد حاوی آنتی بیوتیک ، X-Gal و IPTG منتقل شد و پس از رشد، کلنیهای سفید حاوی وکتور کلون شده و کلنیهای آبی بدون وکتور بر روی پلیت محیط کشت قابل رؤیت بودند. جهت تأیید کلونینگ از هر کلنی سفید و آبی استخراج پلاسمید صورت گرفت و بر روی ژل آگارز برده شد همچنین با استفاده از پرایمر های طراحی شده برای تکثیر ژن واکنش زنجیره ای پلیمراز صورت گرفت و نتایج حاصل از وجود ژن وارد شده در ناقل پلاسمیدی قابل مشاهده می باشد (شکل۳).

کانژوگاسیون بین سویه های مختلف باکتری: عمل کانژوگاسیون بین سه سویه از *Escherichia coli* شامل DH5α حاوی وکتور کلونینگ (pGFK114.1) و TG1 حاوی وکتور کمکی(pRK231) برای انتقال به عنوان دهنده با سویه BL21(DE3 (که به طور ژنتیکی مقاوم به کلرامفنیکول است به عنوان گیرنده انجام گرفت. پس از انجام کانژوگاسیون باکتریها در محیط انتخابی حاوی آنتی بیوتیک کلرآمفنیکول و آمپی سیلین رشد داده شدند. کلنی رشد یافته بیانگر باکتریهایی است که حاوی وکتور کلون شده و ژن مقاوم به کلرامفنیکول با عمل کانژوگاسیون هستند (شکل۴) در فرآیند کانژوگاسیون در کشت توام سه باکتری، دو باکتری دهنده (حاوی وکتور)، پس از تماس فیزیکی با باکتری گیرنده (بدون وکتور) ، تولید ساختار پروتئینی به نام پیلی را می نمایند. سپس قسمت mob (ژن مسئول حرکت پلاسمید) در وکتور انتقالی باعث شکافی درOriT در وکتور کمکی شده و به این ترتیب دو وکتور به هم ملحق شده و انتقال به باکتری **ب** وکتور (($BL_{21}(DE_3$)) انجام می شود. با قرار دادن این مجموعه باکتریها روی محیط انتخابی دارای آنتی بیوتیک، فقط باکتریی زنده خواهد ماند که دارای وکتور کلونینگ (مقاوم به آمپی سیلین)و حاوی ژن مقاوم به کلرامفنیکل (باکتری گیرنده) باشد. در این آزمایش باکتری ($BL_{21}(DE_3$ حاوی وکتور انتقالی، در محیط کشت انتخابی قادر به رشد بود. اما در کنترل منفی که باکتری حاوی پلاسمیدpRK321 وجود نداشت انتقالی صورت نگرفته و در نتیجه باکتری ($BL_{21}(DE_3$ فاقد وکتورهای مورد نظر خواهد بود که در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیکها قادر به رشد نبوده و هیچ کلنی باکتری مشاهده نشده است. این نتایج با نتایج بدست آمده توسط فلینت ،اسکات و نیکولیچ که انتقال کانژوگاتیو یک پلاسمید مقاوم به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بین دو سویه از باکتری اشیرشیا کولی که تحت شرایط بی هوازی در محتویات شکمبه صورت گرفته بود، مطابقت دارد (۷ و ۱۵).

الف

شکل۴ – نتیجه حاصل از کانژوگاسیون. شکل الف، کنترل منفی ؛ کانژوگاسیون بدون حضور وکتور کمکی pRK231 و شکل ب، کنترل مثبت؛ رشد باکتری پس از عمل کانژوگاسیون موفق.

قابل توجه است که چنین انتقالی اساسا در نرخ پایین تری در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی که تلاقیها در شرایط هوازی رخ می دهد صورت می گیرد(۷، ۱۳، ۱۵ و ۱۶). از آنجایی که باکتروئیدها هدف نهایی برای بیان ژن هستند و در دستگاه گوارش نشخوار کنندگان درصدی از باکتروئیدها پیدا می شوند که دارای فعالیت آمیلازی نیستند و با تلقیح باکتری ($BL_{21}(DE_3$ که دارای وکتور انتقالی است، می توان از آن در فرآیند کانژوگاسیون بین این باکتریها با باکتروئیدهای شکمبه ای استفاده نمود. زیرا وکتور انتقالی حاضر، خاصیت انتقال پذیری بین اشرشیا

کولی ها و همچنین به باکتروئید را دارد و ضمن اینکه این باکتری می تواند شرایط دستگاه گوارش را به خوبی تحمل نماید.

بحث

گزارشهای زیادی در رابطه با کلونینگ ژن از میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای وجود دارد (۷ و۲۰). رامبک و همکاران در سال ۱۹۹۱ و وایت هد و کوت در سال ۱۹۹۳ ژنهای آمیلاز را به ترتیب از گونه های بوتیریو فیبروسولونس و استرپتوکوکوس بوویس در اشرشیاکولی بیان کردند (۴ و ۱۴). در سال ۱۹۹۵ کلارک، ژن آلفا آمیلاز را از باکتری استرپتوکوکوس بوویس در بوتیریو فیبروسولونس بیان کرد و سلینگر در سال ۱۹۹۷گزارش دیگری از کلونینگ و بیان ژن آمیلاز و ژنهای هضم کننده دیواره سلولی را از استرپتوکوکوس بوویس اعلان کردند (۲ و ۱۷). محققان استرالیایی توانستند با انتقال ژن فلورو استات دی هیدروژناز که از یک باکتری خاکزی ایزوله شده به چهار سویه از باکتری شکمبه ای، گوسفندان را در برابر سم فلورو استات محافظت کنند (۱۰). امروزه تغییر متابولیسم و هضم مواد غذایی مورد توجه می باشد که یا از طریق تغییرات ژنتیکی در باکتری جهت تولید آنزیم یا از طریق افزودنیهای آنزیمی به جیره غذایی دام این کار صورت می گیرد. آنزیمها و پروبیوتیکهای افزودنی به خوراک دامهای اهلی از جمله نشخوار کنندگان، خارج از کشور تأمین می شوند که مستلزم هزینه های زیادی هستند. از سوی دیگر به دلیل نیمه عمر کوتاه نیاز به افزودن مکرر آنها به خوراک دام می باشد که هزینه های تولید را افزایش می دهد. به همین دلیل جهت رفع این نگرانی و کاهش هزینه های تولید،ایجاد باکتری نوترکیب با قابلیت تولید آمیلاز سبب سودمندیهای زیادی در دام می شود به خصوص در دامهای پر تولید که درصد بالایی از جیره آنها را کنستانتره تشکیل می دهد که برای افزایش بازدهی تبدیل نشاسته و جلوگیری از دفع آن ضروری به نظر می رسد. اثر آمیلاز در تخمیر شکمبه ای و تولید شیر در گاوهای شیری هلشتاین سبب افزایش محصولات شیر و میزان پروتئین و کمتر شدن نیتروژن اوره ای شیر شده است. بهبود محصول شیر نتیجه اثرات آنزیم بر تخمیر شکمبه ای و تغییر متابولیسم بوده که بر ترکیبات شیر، افزایش تولید آن و کاهش درصد چربی شیر اثر گذاشته است. همچنین به طور قابل ملا حظه ای سبب بهبود بالانس انرژی در گاو های شیری، افزایش وزن و بهبود خصوصیات لاشه در گاو های گوشتی شده است (۵، ۱۲، ۲۱ و ۲۲).

در این تحقیق از ژن آنزیم آلفا آمیلاز با منشاء باسیلوسی، دارای فعالیت در دامنه pH مشابه به آنزیمهای آمیلازهای شکمبه ای و مقاوم به حرارت و pH اسیدی استفاده شده است. مقایسه این آنزیم با سایر آمیلاز ها در NCBI از لحاظ مناطق حفظ شده و دمینهای مختلف صورت گرفت (www.ncbi.nlm.nih). ژن آلفا آمیلاز ایزوله شده از باکتری باسیلوس برای اولین بار در وکتور انتقالی pGFK114.1 کلون و سپس به باکتری اشرشیاکولی منتقل شد. پژوهش انجام گرفته همانند مطالعات گذشته که اکثراً کلونینگها در باکتری اشرشیا کولی صورت گرفته است، مطابقت دارد (۲۵ و۲۳و۶). وکتور pGFK114.1 مورد استفاده در این تحقیق یک شاتل وکتور بوده که توانایی همانند سازی هم در اشرشیاکولی و هم در باکتروئیدها را داشته و به علاوه دارای پروموتور باکتروئیدی می باشد که فقط در باکتروئیدها قابلیت بیان دارد (unpublished). به این ترتیب باکتری اشرشیا کولی حامل ژن آمیلاز را می توان برای انجام کانژوگاسیون با باکتروئید ها در شکمبه تلقیح نمود تا ژن آمیلاز در باکتروئید هایی که فاقد این ژن هستند بیان گردد تا نیاز به افزودن این آنزیم به عنوان مکمل غذایی مرتفع گردد زیرا اکوسیستم شکمبه ای قادر به تولید آنزیم در مقیاسی که بتواند از همه مواد غذایی خورده شده بهره وری گردد، نیستند (۸) همچنین افزودن آنزیم به مواد غذایی نیز با مشکلات خاص خود همراه است که به آن اشاره شده است.

منابع

۱- ۱۳۸۵ با هاتیا س. ک.، کومار ش.، سانگوان د.س.، اکوسیستم شکمبه تغذیه گاو و گاومیش، ترجمه عباسعلی ناصریان، رضا مجید زاده هروی، مرتضی هاشمی عطار. مشهد،انتشارات بنفشه.

2-Clark R.G., Cheng K.J., Selinger L.B. and Hynes M.F. 1995, Expression of a Streptococcus bovis amylase in the rumen bacterium Butyrivibrio fibrisolvens. Proceedings of the 95th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Washington., p: 526

3- Chesson A. and Austin S. 1996, Overview of enzyme technology in animal. In Rode L. (ed) Animal Science research and development-meeting future challenges, addendum, proc can soc anim Sci, lethbridge.

4- Cotta M. A. and Whitehead T.R. 1993, Regulation and cloning of the gene encoding amylase activity of the ruminal bacterium Streptococcus bovis. Appl. Environ. Microbiol., 59: 189.

5- Defrain J.M., Hippen A.R., Kalscheur K.F. and Tricarico J.M. 2005, Feeding α- amylase improve the glycemic status and performance of transition dairy cows. J. Dairy Science 88:4405-4413.

6- Flint H. J. 1994, Molecular genetic of obligate anaerobes from the rumen. FEMS Microbiol Lett 121: 259-268.

7- Flint H.J., Thomson A.M. and Bisset J. 1988, Plasmid-associated transfer of tetracycline resistance in Bacteroides ruminicola. Appl. Environ. Microbiol., 54: 855.

8- Forsberg C.W. and Cheng K.j. 1992, Molecular strategies to optimize forage and cereal digestion by ruminants. Biotechnology and Nutrition. Butterworth, Heineman, Stoneham.p: 107-147.

9- Forsberg C.W., Crosby B. and Thomas D.Y. 1986, Potential for manipulation of the rumen fermentation through the use of recombinant DNA techniques. J. Animal Sciences 63:310-325.

10-Gregg K., Hamdorf. B., Henderson K., Kopecny J. and Wong C. 1998, Genetically modified ruminal bacreria protect sheep from fluoroacetate poisoning. AEM. 64: 3496-3498.

11- Hespell R.B. 1987, Biotechnology and modification of the rumen microbial ecosystem. Proceeding of the Nutrition Society 46: 407-413.

12-Michael D.A. 2004, Effect and mechanism of action of a fungal amylase preparation on performance characteristics of finishing beef cattle. A disseration in animal science. Texas, Tech University.

13-Nikolich M.P., Hong G., Shoemaker N.B., Salyers A.A. 1994, Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. Appl. Environ. Microbiol., 60: 3255-3260.

14- Rumbak E., Rawlings D.E., Lindsey G.G. and Woods D.R.. 1991b, Cloning, nucleotide sequence, and enzymatic characterization of an alpha-amylase from the ruminal bacterium Butyriuibrio fibrisolvens H17c. J. Bacteriol., 173: 4203.

15-Scott K.P., Barbosa T.M., Forbes K.J., Flint H.J. 1997, High-frequency transfer of a naturally occurring chromosomal tetracycline resistance element in the ruminal anaerobe Butyrivibrio fibrisolvens. Appl. Environ. Microbiol., 63: 3405-3411.

16- Scott K.P., Flint H.J. 1995, Transfer of plasmids between stains of Escherichia coli under rumen conditions. J. Appl. Bacteriol., 78: 189-193.

17-Selinger L.B., Cheng P., Clark R.G., Hynes M.F. and cheng K.J. 1996, Characterization of an amylase gene isolated from streptococcus bovis. Proceeding of the Canadian society of animal science., p: 24.

18-Selinger L.B., Forsberg C.W. and Cheng K.J. 1996, The Rumen: Aunique Source of Enzymes for enhancing livestock production. Anaerobe., 2: 263-28.

19-Shoemaker N.B., Anderson K.L., Smithson S.L. and Wang G.R. 1991, Conjugal transfer of a shuttle vector from human colonic anaerobe Bacteroides uniformis to the ruminal anaerobe Prevotella ruminicola B_1 4. Applied and Environmental Microbiology 57: 2114-2120.

20-Smith M. G. 1975, In vivo transfer of factors between Escherichia coli strains inoculated into the rumen of sheep. J. Hyg. (Camb.) 75: 363-370.

21- Tricarico J.M., Bney M.D., Galyean M.L., Rivera J.D., Hanson K.C., McLeod K.R. and Harmon D.L. 2007, The effects of an

Aspergillus oryzae extract containing alpha-amylase activity on performance and carcass characteristics of finishing deef cattle. Anim. Sci., 85: 802-811.

22- Tricarico J.M., Johnston J.D., Dawson K.A., Hanson K.C., McLeod K.R. and Harmon D.L. 2005, The effects of an Aspergillus oryzae extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. Anim. Sci., 81: 365-374.

23-Wallace R. J. 1994, Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. J Animal Sci 72:2992-3003.

24-Wheeler M.B., Walter E.M. and Clark S.G. 2003, Transgenic animal in biomedicine and agriculture outlook for the future. Animal Production Science 79: 265-289.

25-Whitehead T.R. and Hespell R.B. 1990, Heterologous expression of the bacteroides ruminicola xylanase gene in bacteroides fragilis and bacteroides uniformis. FEMS Microbiol Lett 66: 61-66.

Cloning of amylase gene in *E.coli-Bacteroides* shuttle vector pGFK114.1 and conjugation between *Escherichia coli* strains for possible its application in rumen digestive system.

Moradian F.[1], Oghbatalab H.A.[2], Rahimi Gh.A.[2], Rahimian H.A.[3]

1-Basic Sciences Dept., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R. of Iran

2- Animal Science Dept., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R. of Iran

3- Plant Protection Dept., Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, I.R. of Iran

Abstract

Recently progress in recombinant DNA technology and gene transfer system, genetic modifying of ruminal bacteria with ability of hydrolytic enzyme production has been possible in livestock industry. Resulting this technology, reduction of disadvantages of enzyme supplements as well as increase of nutrient flow in rumen. Since transformation in rumen bacteria has low efficiency therefore conjugation can be effective for moving genetic elements. In more previous studies *Escherichia coli* as a facultative anaerobe bacteria has used because could grow in rumen. The present study, an amylase gene previously cloned in pET28a and amplified by polymerase chain reaction then subcloned in shuttle vector pGFK114.1 following transformed in *Escherichia coli DH5α*. Conjugation was performed between two *Escherichia coli* DH5α and TG1 donors containing pGFK114.1 and pRK231 helper plasmid respectively and one recipient *Escherichia coli BL21 (DE3*). We have successfully transformed cloned amylase gene to recipient bacteria such rumen environment as reported before.

Key words: Recombinant DNA, Conjugation, Cloning, Shuttle vector, Helper vector and Transformation.