مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۹
صفحه ۱۸-۱۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

ایجاد سیستم شناسایی وجود کوفاکتور مولیبدئوم در باکتری *Escherichia coli*

Establishment of molybdeum cofactor detection system in *Escherichia coli*

کیانا کبیر[۱]، خلیل زینلی نژاد*[۱]، آندریاس وبر[۲]، سیده ساناز رمضانپور[۱]، ماریون آیسنهوت[۲]

Kiana Kabir[1], Khalil Zynali Nezhad[1*], Andreas Weber[2], Seyede Sanaz Ramezanpour[1], Marion Eisenhut[2]

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۲- گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه هاینریش هاینه، دوسلدورف، آلمان

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Iran
2. Plant Biochemistry Group, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khalil1381@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۲۶)

چکیده

یکی از آنزیم‌های درگیر در تطبیق پذیری با شرایط مختلف محیطی، آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز (BisC) است که علاوه بر توانایی تبدیل بیوتین سولفوکساید به بیوتین در شرایط اکسیداتیو، می‌تواند متیونین سولفوکساید را نیز به متیونین تبدیل کند. اسید آمینه متیونین چه بصورت آزاد و چه در زنجیره پروتئینی اهمیت بسیاری در فرایند سنتز پروتئین و فعالیت آن داراست. آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز (BisC) برای فعال بودن وابسته به کوفاکتور باکتریایی Bis_MGD می‌باشد. در این مطالعه به منظور تایید فعال بودن کوفاکتور باکتریایی Bis_MGD روشی غیرمستقیم طراحی شد که در این روش از آنزیم باکتریایی بیوتین سولفوکساید (BisC) به عنوان ژن گزارشگر استفاده شد. در این راستا سازه ژنی pJet_BisC ساخته شد و شوک حرارتی به باکتری *E.coli* استرین Mach۱ منتقل شد. کلون‌های تشکیل شده در محیط LB جامد با آنتی بیوتیک آمپیسیلین 200 µg/ml انتخاب شدند و سپس واکنش PCR روی آنها صورت گرفت. پس از تایید نتایج توالی یابی کلون‌های مثبت، قطعه مورد نظر جدا و به ناقل بیانی pETDuet انتقال داده شد. کلون‌های حاوی ژن به باکتری میزبان Rossetta منتقل شدند. فرابیان آنزیم BisC بر روی ژل SDS_PAGE مورد بررسی قرار گرفت و نیز فعالیت این آنزیم بصورت باند بی‌رنگ بر اثر اکسید شدن متیل وایولوژن روی ژل Native مشاهده شد که نشان دهنده حضور فعال کوفاکتور Bis_MGD بود.

واژه‌های کلیدی

اشریشیا کلای،
بیان بیش از حد،
بیس ـ ام جی دی،
بیوتین سولفوکساید،
مولیبدئوم

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]

مقدمه

باکتری اشریشیا کلای (*Escherichia coli*) توانایی تطبیق با تغییرات شرایط مختلف را دارا بوده و می‌تواند در شرایط رشدی متنوعی زنده بماند (Gon et al 2000). یکی از آنزیم‌های درگیر در تطبیق پذیری با شرایط مختلف محیطی آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز (BisC) است. این آنزیم در شرایط اکسیداتیو، بیوتین سولفوکساید را به بیوتین تبدیل می‌کند (Ezraty et al. 2005). چراکه گونه‌های فعال اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، آنیون سوپر اکسید (O_2^-) و رادیکال هیدروکسیل می‌توانند خسارات گسترده‌ای را به سلول وارد کنند. پروتئین‌ها، آمینو اسیدها، لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و کربوهیدرات‌ها به اینگونه‌های فعال اکسیژن حساس هستند و در این بین، اسیدهای امینه حاوی سولفور، متیونین و سیستئین چه در زنجیره پروتئینی و چه بصورت آزاد، حساسیت بسیاری به گونه-های آزاد اکسیژن دارند (Alcock et al 2018). همچنین این آنزیم فعالیت متیونین سولفوکساید ریداکتازی نیز دارد و متیونین سولفوکساید را به متیونین تبدیل می‌کند (Ezraty et al. 2005) و به این ترتیب از خسارت ناشی از رادیکال‌های فعال اکسیژن می-کاهد. آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز خالص شده از باکتری اشریشیا کلای نشان داده که یک پروتئین حل شونده است (Pierson and Campbell1990) و آنالیز شیمیایی، حضور کوفاکتور مولیبدئوم باکتریایی (Bis-MGD) را در فعالیت آنزیم نشان داد (Temple et al 2000). عنصر قابل انتقال مولیبدئوم در طیف وسیعی از آنزیم‌های فلزی باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و دیگر موجودات به صورت بخشی از مرکز فعال آنزیم ایفای نقش می‌کند (Mendel and 2010; Mendel and Schwarz 2006 Britter). به منظور داشتن فعالیت بیولوژیک، مولیبدئوم باید با گروه پترین ترکیب شده و مولیبدوپترین یا Mo-MPT (Moco) را به وجود آورد (Mendel and Schwarz 2011). در باکتری‌ها Moco پس از تغییراتی که شامل اضافه شدن نوکلئوتیدهای مونوفسفات به گروه فسفات آن و تشکیل بیس مولیبدوپترین گوانین دی نوکلئوتید (Bis-MGD) است، فرم فعال این کوفاکتور را به وجود می‌آورد (Neumann et al. 2011). آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز موجود در باکتری اشریشیا کلای نیز دارای دو گروه بیس مولیبدوپترین گوانین دی نوکلئوتید (Bis-MGD) متصل به مولیبدئوم در جایگاه فعال آنزیم می‌باشد که وجود آن برای فعالیت این آنزیم ضروری است (Lobbi Novel and Leikmuhler 2013). بنابراین در مطالعات انتقال ژن این آنزیم یا آنزیم‌های دیگر وابسته به این کوفاکتور به موجودات زنده دیگر غیر از باکتری بایستی ژن‌های مربوطه به تولید این کوفاکتور نیز منتقل و تایید شوند. از آنجاییکه اسید آمینه متیونین در زنجیره پروتئینی نقش مهمی در عملکرد پروتئین داشته و اکسیداسیون آن منجر به از دست رفتن فعالیت پروتئین می‌گردد و نیز متیونین آزاد نیز از عوامل ضروری در فرایند سنتز پروتئین به شمار می‌رود (Ezraty et al. 2005)، بررسی آنزیم‌های درگیر در این سیستم مورد توجه می‌باشد. در این تحقیق به منظور اثبات وجود کوفاکتور فعال باکتریایی بیس مولیبدوپترین گوانین دی نوکلئوتید (Bis-MGD)، روشی غیرمستقیم با نشان دادن فعالیت آنزیم باکتریایی BisC وابسته به کوفاکتور Bis-MGD به عنوان ژن گزارشگر طراحی شد.

مواد و روش‌ها

این پروژه در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه بیوشیمی گیاهی دانشگاه Heinrich Heine در شهر دوسلدورف آلمان انجام شد.

تکثیر ژن BisC با استفاده از PCR Phusion

برای این منظور از باکتری *E.coli* استرین Mach۱ به عنوان الگو برای تکثیر ژن *BisC* استفاده شد. آغازگرهای مناسب برای تکثیر این ژن با نرم افزار آنلاین net primer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/) طراحی شد. توالی آغازگر فرادست شامل توالی CACGGATCCAATGCTGGTTGAAACCGACG بگونه‌ای طراحی شد که جایگاه برش آنزیمی *Bam*HI در بخش ابتدای ۵' آن قرار گیرد و آغازگر پایین دست شامل توالی CACCTTAAGTTATGAGCTGGCCGGTGG که جایگاه برشی *Afl*II در انتهای ۵' آن طراحی شد مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از آنزیم Phusion و آغازگرهای ذکر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]

شده از DNA الگو باکتری *E.coli* استرین Mach۱ در حجم نهایی۲۰ میکرولیتر انجام شد (Bryksin and Matsumura ۲۰۱۰). برنامه PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر به شرح زیر بود:

پنج دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل: ۳۰ ثانیه واسرشت سازی در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد و ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت پنج دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. پس از تکثیر قطعه ژنی مورد نظر، توالی ۲۲۹۳ جفت بازی به منظور تایید روی ژل الکتروفورز آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

تهیه سازه ژنی pJet_BisC

به منظور کلونینگ ژن *BisC*، محصول PCR با استفاده از کیت (Wizard SV Gel and PCR clean-up system) از ژل آگارز تخلیص شده و به ناقل pJet ـ۲,۱ توسط واکنش اتصال در دمای چهار درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت متصل شده و این ناقل به همراه ژن *BisC* توسط شوک حرارتی به باکتری *E.coli* استرین Mach۱ منتقل شد. ۱ میلی لیتر محیط کشت مایع LB به این واکنش اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۱٤۰rpm قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون بر روی محیط LB جامد با آنتی بیوتیک آمپیسیلین کشت شد و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه آنکوبه شد. سپس واکنش PCR روی آنها صورت گرفت. سپس کلون‌های حاوی ژن *BisC* به محیط کشت مایع حاوی آمپیسیلین 200 µg/ml به مدت یک شبانه روز منتقل شدند و سپس استخراج پلاسمید نوتوکیب با استفاده از کیت Wizard plus SV miniprep (purification system) انجام شد. کلون حاوی ژن به روش سنگر توالی یابی شد (Microsynth AG).

تهیه سازه ژنی بیان pETDuet_BisC

به منظور بررسی بیان پروتئین BisC، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Afl*II در سازه ژنی pJet_BisC صورت گرفت و قطعه ژنی مورد نظر توسط کیت Wizard SV Gel and PCR clean-up system از ژل الکتروفورز جدا و تخلیص شد. این قطعه ژنی به ناقل بیانی pETDuet متصل شد. این ناقل با شوک حرارتی به باکتری *E.coli* استرین Mach۱ منتقل شد. سپس برای تایید وجود ناقل حامل ژن، هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Bam*HI و *Afl*II در تعدادی کلون انجام شد. پس از تایید نهایی، کلون‌های حاوی ژن به باکتری میزبان Rossetta منتقل شد.

بررسی بیان پروتئین BisC

برای بررسی بیان پروتئین یکی از کلون‌های مثبت حاوی ژن مورد نظر به پنج میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی ٤۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین منتقل شد و به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک میلی‌لیتر از آن برداشته شده و با سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شد و رسوب بدست آمده فریز شد. برای تعیین زمان مناسب القا بیان ژن، رشد باکتری تا ۰/۷ـ ۰/۵ OD.. ردیابی و سپس ایزوپروپیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (IPTG) با غلظت نهایی یک میلی‌مولار به باقی محیط کشت مایع اضافه شد و به مدت سه ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به منظور جمع‌آوری رسوب باکتری‌ها صورت گرفت. رسوب‌های باکتریایی در بافر SDS به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد با ٦۰۰ دور در دقیقه حل شد و سپس سانتریفیوژ با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد و پروتئین از فاز رویی برداشت شد. نمونه‌های پروتئینی بدست آمده از قبل و بعد از القای ژن با IPTG روی ژل SDS_PAGE الکتروفورز و با کوماسی رنگ آمیزی شد.

وسترن بلاتینگ و ایمونودیتکشن به منظور تایید پروتئین بیان شده

نمونه پروتئینی قبل و بعد از القای IPTG روی ژل SDS_PAGE الکتروفورز و به کاغذ نیتروسلولزی مطابق با ابعاد ژل منتقل شد. پس از بلاتینگ، کاغذ نیتروسلولز دو بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در بافر TBS به قرار گرفت و سپس به مدت یک ساعت به محلول بلاکینگ منتقل شد. در ادامه دو بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در محلول TBST و سپس در محلول TBS به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و بعد به مدت یک ساعت در محلول آنتی بادی His قرار گرفت و سپس چهار بار (هر بار ۱۰ دقیقه) در محلول TBST و ۱۰ دقیقه در محلول TBS شستشو داده شد. کاغذ نیتروسلولزی با مارکر فلوئورسنت نشانه‌گذاری شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول رنگی HRP با غلظت ۱:۱ به آن اضافه گردید و در زیر میکروسکوپ فلوئورسنتی مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

بررسی فعالیت پروتئین روی ژل Native

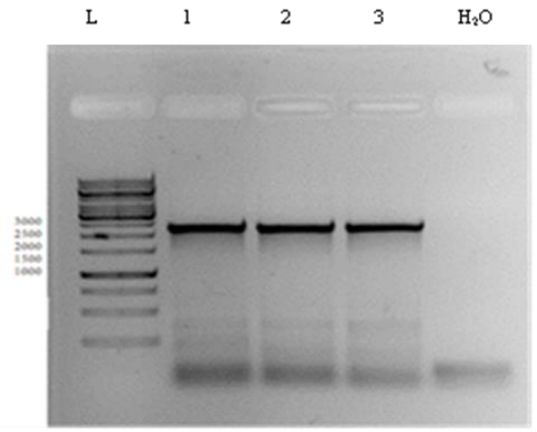
۵۰۰ میکرولیتر محلول Tris- HCl به رسوب‌های باکتری فریز شده اضافه گردید و روی یخ قرار گرفت تا ذوب شدند. سپس وارد دستگاه supersonic و به صورت شش انفجار (burst) ۱۰ ثانیه‌ای تیمار شدند. سپس سانتریفیوژ با ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]

دمای چهار درجه سانتیگراد انجام شد. بخشی از سوپرناتانت برای تعیین غلظت پروتئین استفاده شد و بقیه با ٤٠ میکرولیتر محلول رنگی native ترکیب و روی ژل native الکتروفورز شد. ژل پلی‌اکریلامید native به ظرف پتری اشباع شده از نیتروژن منتقل و اطراف آن بسته شد و قبل از اضافه کردن محلول رنگی در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت. محلول رنگی (Tris-HCl pH ۷/٤، Methyl viologen, Dithionite, Potassium bicarbonate, TMANO) به صورت تازه و اشباع شده با نیتروژن با سرنگ به ژل پلی‌اکریلامید Native اضافه شد و دوباره بسته شد و توسط اسکنر آنالیز شد. در صورت فعال بودن آنزیم BisC، متیل وایولوژن موجود در محلول رنگ آمیزی که به عنوان دهنده الکترون عمل کرد و از رنگ آبی به بی‌رنگ تغییر می‌نمود (Takagi et al 1981; Mortimer 2011).

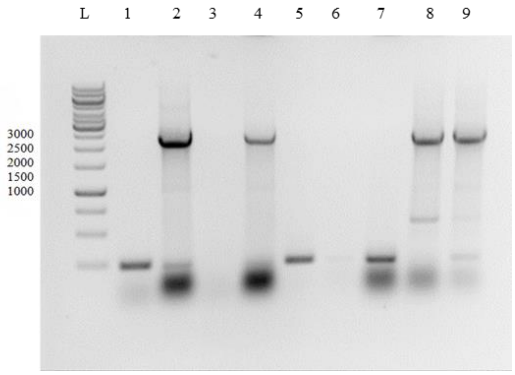
نتایج و بحث

تکثیر ژن *BisC* در PCR توسط آغازگرهای بالادست و پایین دست موجب تکثیر قطعه به طول ۲۲۹۳ جفت باز شد که در توالی خود دارای جایگاه شناسایی آنزیم *BamHI* و *AflII* نیز بودند. به منظور تایید تکثیر ژن مورد نظر، محصول واکنش PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و اندازه قطعه ژنی مورد نظر تایید شد (شکل۱). قطعه مورد نظر از روی ژل آگارز جدا و برای الحاق به ناقل کلونینگ pJet-۲،۱ آماده شد. پس از آن انتقال، واکنش تراریختی با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد Mach۱ انجام گرفت. پس از تخلیص پلاسمید از کلون-های رشد یافته در محیط کشت LB مایع حاوی آمپیسیلین، واکنش PCR (شکل ۲) و هضم آنزیمی به منظور تایید قطعه ژنی مورد نظر صورت گرفت و فرایند انتقال ناقل کلونینگ pJet-۲،۱ به سلول‌های مستعد Mach۱ را تایید نمود. نتیجه توالی یابی وجود ژن *BisC* در ناقل pJet را نیز تایید نمود و این ژن به ناقل بیانی pETDuet منتقل شد. سپس این ناقل توسط شوک حرارتی به سلول‌های مستعد Mach۱ انتقال یافت. پس از تخلیص ناقل بیانی pETDuet از کلون‌های رشد یافته در محیط کشت LB مایع حاوی آمپیسیلین، واکنش هضم آنزیمی (شکل ۳) به منظور تایید ژن مورد نظر انجام شد.



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز ژن *BisC* حاصل از واکنش PCR. (شماره‌ها غلظت‌های مختلف از DNA الگو به ترتیب ۱، ۲ و ۳ میکرولیتر را نشان می-دهد).

Figure 1. Agarose gel electrophoresis of *BisC* gene as a PCR product reaction. (the numbers show different concentration (1, 2 and 3 microliter) of template DNA)

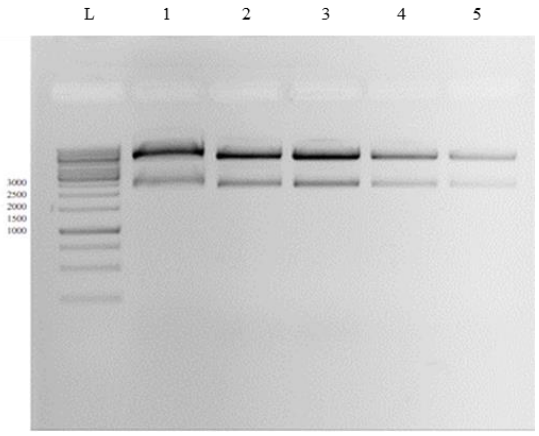


شکل۲- کلونی PCR ناقل pJet حاوی ژن *BisC*. ستون L : نشانگر 1 Kb DNA ladder- Thermo fischer scientific، ستون‌های ۱ تا ۵ و ستون‌های ۷ تا ۹: کلون‌های انتخابی، ستون‌های۲، ٤، ۸ :حاوی ژن مورد نظر ، ستون ۹: پلاسمید (کنترل مثبت) ، ستون ٦: آب (کنترل منفی).

Figure 2. Colony PCR of *BisC* gene in pJet vector. L: 1Kb DNA ladder- Thermo fischer scientific, from 1 to 5 and 7 to 9: selected colons, 2, 4, 8: contained gene of interest. 9: Plasmid (positive control), 6: H_2O (negative control).

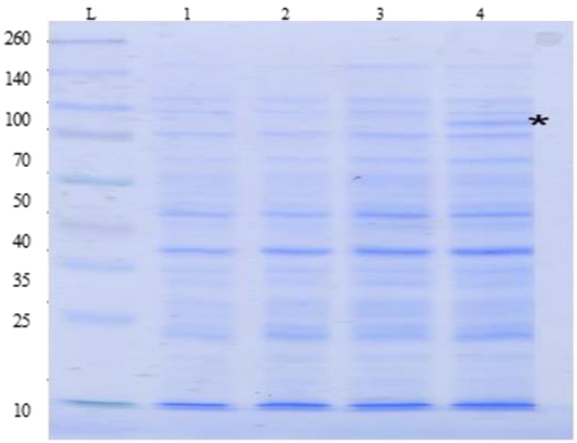
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]



شکل ۳- الکتروفورز قطعات حاصل از هضم آنزیمی ناقل بیانی pETDuet حاوی ژن *BisC*. ستون L، نشانگر ۱۰۰۰ DNA جفت باز ، ستون‌های یک تا پنج هضم آنزیمی پلاسمیدها.

Figure 3. Electrophoresis of the enzyme digestion fragments of the transformed pETDuet expression vector. L: 1Kb DNA ladder- Thermo fischer scientific, from 1 to 5: enzyme digestion of plasmids.

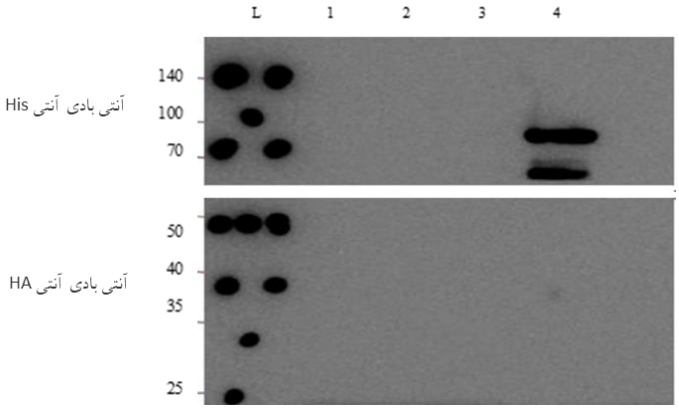


شکل ٤- الکتروفورز ژل SDS-PAGE پروتئین BisC در میزبان بیانی Rossetta. ستون L: مارکر پروتئینی Spectra Multicolor Broad Range protein ladder- Thermo fischer scientific، ستون ۱: ناقل pETDuet خالی قبل از القای IPTG، ستون ۲: ناقل pETDuet خالی بعد از القای IPTG، ستون۳ : ناقل pETDuet حاوی ژن *BisC* قبل از القای IPTG، ستون ٤: ناقل pETDuet حاوی ژن *BisC* بعد از القای IPTG.

Figure 4. SDS-PAGE gel electrophoresis of BisC protein in Rossetta expression vector. L: Spectr Multicolor Broad Range protein ladder- Thermo fischer scientific. ۱: empty pETDuet vector before IPTG induction, ۲: empty pETDuet vector after IPTG induction,۳: pETDuet vector with *BisC* before IPTG induction, ٤: pETDuet vector with *BisC* fter IPTG induction.

انتقال مجدد ناقل pETDuet حاوی ژن *BisC* به باکتری میزبان بیانی Rossetta و بررسی نتیجه القای بیان ژن با تیمار IPTG، توسط الکتروفوروز پروتیین‌های استخراج شده از کلون‌های حاوی ژن مورد نظر روی ژل پلی‌اکریلامید SDS-PAGE بررسی و تایید شد (شکل ٤).

به منظور تایید پروتئین بیان شده از روش وسترن بلات استفاده شد. در این روش از آنتی‌بادی آنتی His استفاده شد. ایمونودیتکشن تخریب این پروتئین را پس از القای IPTG نشان داد. هیچ بیان پروتئینی در وکتور خالی pETDuet به عنوان کنترل منفی مشاهده نشد (شکل ۵). به منظور تایید اختصاصیت آنتی بادی مورد نظر از آنتی بادی آنتی HA نیز استفاده شد و همان طور که در شکل مشخص است، پروتئین مورد نظر فقط با آنتی‌بادی آنتی His قابل شناسایی می‌باشد.



شکل ۵- وسترن بلات پروتئین BisC در میزبان بیانی Rossetta. ستون L: مارکر پروتئینی Spectra Multicolor Broad Range protein ladder- Thermo fischer scientific، ستون ۱: ناقل pETDuet خالی قبل از القای IPTG، ستون ۲: ناقل pETDuet خالی بعد از القای IPTG، ستون۳ : ناقل pETDuet حاوی ژن *BisC* قبل از القای IPTG، ستون ٤: ناقل pETDuet حاوی ژن *BisC* بعد از القای IPTG.

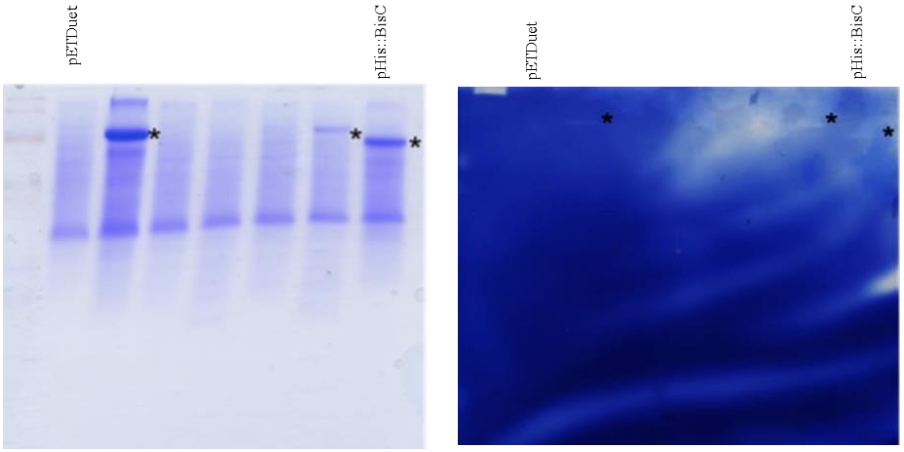
Figure 5. Western blotting of BisC protein in Rossetta expression vector. L: Spectr Multicolor Broad Range protein ladder- Thermo fischer scientific. ۱: empty pETDuet vector before IPTG induction, ۲: empty pETDuet vector after IPTG induction,۳: pETDuet vector with *BisC* before IPTG induction, pETDuet vector with *BisC* after IPTG induction :٤.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]

بررسی فعالیت آنزیم BisC در حضور کوفاکتور باکتریایی مولیبدئوم

به منظور بررسی فعال بودن آنزیم BisC از ژل Native استفاده شد. در این سیستم رنگ آمیزی از متیل وایولوژن به عنوان دهنده الکترون استفاده شد که این رنگ پس از انتقال الکترون اکسید شده و از رنگ آبی به بی‌رنگ تغییر می‌کند. بدین ترتیب باند بی‌رنگ نشاندهنده فعال بودن آنزیم در حضور کوفاکتور باکتریایی مولیبدئوم بود. پس از آن به منظور تایید ژل مورد نظر با کوماسی رنگ آمیزی شد. ستون انتهایی مربوط به پروتئین BisC و ستون ابتدایی مربوط به ناقل خالی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (شکل ٦).



شکل ٦- الکتروفورز پروتئین BisC در ژل Native رنگ آمیزی شده با محلول متیل وایولوژن (سمت چپ) و رنگ کوماسی (سمت راست). سایر چاهک‌ها مربوط به ژن‌های دیگر خارج از این مطالعه است.

Figure 6. Native gel electrophoresis of BisC protein. Methyl viologen staining)left hand(, coomassie staining)right hand(. the others related to out of this study.

هدف از این پژوهش، ایجاد یک سیستم آزمایشی به منظور بررسی فعال بودن کوفاکتور باکتریایی مولیبدئوم (Bis-MGD) بود. از آنجایی که آنزیم بیوتین سولفوکساید BisC استخراج شده از باکتری اشریشیا کلای به منظور فعال بودن نیازمند کوفاکتور مولیبدئوم می‌باشد به همین دلیل از این آنزیم در این تحقیق استفاده شد (Rajagopalan and Johnson 1992) . ژن *BisC* دارای فعالیت بیوتین سولفوکساید ریداکتاز می‌باشد که توانایی احیای بیوتین سولفوکساید به بیوتین را داراست (Pierson and Campbell ۱۹۹۰). در بررسی کینتیک آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز باکتری *Rhodobacter sphaeroids* بیان شده در باکتری اشریشیا کلای، از متیل وایولوژن به عنوان دهنده الکترون استفاده شده که ۰/۹ میکرومول متیونین سولفوکساید در هر ثانیه احیا شده است. این بررسی نشان داده که این آنزیم توانایی احیای نیکوتین آمید ان اکساید و تریمتیل آمید ان اکساید را نیز دارا است (Pollock and Barber 1995). در این تحقیق نیز فعالیت پروتئین BisC در حضور تریمتیل آمید ان اکساید اثبات شد. در راستای بیان پروتئین، از باکتری اشریشیا کلای *E.coli* استفاده شد، چرا که این پلاسمیدها براحتی برای بیان پروتئین‌ها به این باکتری قابل انتقال است. پس از بیان پروتئین نشاندار شده با x٦ His توسط وسترن بلات شناسایی شد.

ایمونودیتکشن فرابیان ژن *BisC* تخریب پروتئین حاصل را نشان داد، چرا که این ژن به طور طبیعی در باکتری *E.coli* وجود دارد و بنابراین وجود آن نمی‌تواند برای سلول ضرر داشته باشد. به نظر می‌رسد فراوانی این پروتئین در باکتری *E.coli* به طور کامل تنظیم می‌شود و تخریب آن توسط مکانیسم‌های تخریبی خاص موجود در باکتری قابل پیش بینی بود. به هر حال تخریب پروتئین تاثیری

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]

در شناسایی فعالیت این ژن توسط سیستم رنگ آمیزی نداشته است.

نتایج حاصل از فرابیان آنزیم بیوتین سولفوکساید ریداکتاز روی ژل Native نشان داد که این آنزیم در حضور متیل وایولوژن به عنوان دهنده الکترون و تریمتیل آمین ان اکساید به عنوان سوبسترا با ایجاد باند بیرنگ، فعال بود و البته فعالیت این آنزیم وابسته به کوفاکتور باکتریایی مولیبدئوم (Bis-MGD) است. بدین ترتیب این سیستم آزمایشی به منظور ارزیابی کوفاکتور باکتریایی مولیبدئوم (Bis-MGD) با موفقیت ایجاد شد و از این ژن *BisC* به عنوان ژن گزارشگر می‌توان در مطالعات آینده وابسته به این کوفاکتور استفاده نمود.

سپاس‌گزاری: از حمایت‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای فراهم آوردن فرصت انجام این پژوهش تشکر می‌گردد.

منابع

Alcock LJ, Perkins MV, Chalker JM. 2018. Chemical methods for mapping cysteine oxidation. Chemical Society Reviews 47: 231–268.

Bittner F, Mendel RR. 2010. Cell biology of molybdenum. Plant Cell Monogr 17:119–146.

Bryksin A, Matsumura I. 2018. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. Bio techniques 48(6).

Ezraty B, Bos J, Barras F, Aussel L. 2005. Methionine sulfoxide reduction and assimilation in *Eschricia coli*: new role for biotin sulfoxide reductase BisC. Journal of Bacteriology 187: 231-237.

Gon S, Patte J, Mejean V, Iobbi-Nivol CH. 2000. The *torYZ* operon encodes a third respiratory Trimethylamine N-oxide reductase in *Eschrichia coli*. Journal of Bacteriology 182: 5779- 5786.

Iobbi-Nivol C, Leimkühler S. 2013. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta 1827: 1086–1101.

Mendel RR, Schwarz G. 2011. Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans. Coordination Chemistry Reviews 255:1145–1158.

Mortimer RJ. 2011. Electrochromic Materials. Annual Review of Materials Research 41: 241–268.

Neumann M, Seduk F, Iobbi-Nivol C, Leimkühler S. 2011. Molybdopterin dinucleotide biosynthesis in Escherichia coli: identification of amino acid residues of molybdopterin dinucleotide transferases that determine specificity for binding of guanine or cytosine nucleotides. The Journal of Biological Chemistry 286: 1400–1408.

Pierson D, Campbell A. 1990. Cloning and nucleotide sequence of bisC, the structural gene for biotin sulfoxide reductase in *Eschrichia coli*. Journal of Bacteriology 172: 2194- 2198.

Pollock VV, Barber MJ. 1995. Molecular Cloning and Expression of Biotin Sulfoxide Reductase from *Rhodobacter sphaeroides* Forma Sp. *Denitrificans.* Archives of Biochemistry and Biophysics 318: 322–332.

Rajagopalan KV, Johnson JL. 1992. The pterin molybdenum cofactors. Journal of Biological Chemistry 267:10199–10202.

Schwarz G, Mendel RR. 2006. Molybdenum cofactor biosynthesis and molybdenum enzymes. Annual Review of Plant Biology 57:623–647.

Takagi M, Tsuchiya T, Ishimoto M. 1981. Proton translocation coupled to trimethylamine N-oxide reduction in anaerobically grown *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 148: 762–768.

Temple CA, Rajagopalan KV. 2000. Mechanism of assembly of the Bis (Molybdopterin guanine dinucleotide) molybdenum cofactor in *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase. The Journal of Biological Chemistry 275: 40202–40210.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

Establishment of molybdeum cofactor detection system in *Escherichia coli*

Kiana Kabir[1], Khalil Zynali Nezhad[1*], Andreas Weber[2], Seyede Sanaz Ramezanpour[1], Marion Eisenhut[2]

1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, College of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Iran
2. Plant Biochemistry Group, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany

*Corresponding Author, Email: khalil1381@yahoo.com

Abstract

Biotin sulfoxide reductase enzyme is one of the enzymes involved in adaptation to different environmental conditions. BisC enzyme converts biotin sulfoxide to biotin and Methionine sulfoxide to Methionine under oxidative stress conditions. Both free Methionine and protein bound chains Methionine are essential in protein synthesis process and the function of proteins. The activity of the BisC enzyme is dependent to the Bis-MGD as a co-factor. In the current study, in order to verify the presence of bacterial Molybdeum cofactor, an indirect approach was made by showing the activity of BisC enzyme as a reporter gene. Therefore, in this regard *BisC* gene was cloned to pJet vector and was transferred to Mach1 strain of *E. coli* by heat shock transformation. The clones were selected on LB medium complemented with 200 µg/ml of Ampicillin antibiotic and the PCR reaction was done. After verifying of positive clones by sequencing, the *BisC* gene was digested and ligated to the pETDuet expression vector and transferred to Rossetta. Over-expression of BisC enzyme was analyzed on a SDS-PAGE gel and the activity of the enzyme could be showed as a colorless band on the Native gel by oxidation of methyl viologen. It proved the presence of active Bis-MGD as a cofactor.

Key words: *Escherichia coli*, Over expression, Bis-MGD, Biotin sulfoxide, Molybdeum

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.5.8]