مجله طب دامپزشکی جایگزین | تابستان ۱۴۰۲ |دوره ۶ | شماره ۱۷

JOAVM
Journal of
Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

مقاله پژوهشی

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

بررسی ژنومی و کلونینگ ژن *فیبرینولیتیک (bsfA)* باسیل ترموفیل خاک در باکتری *اشریشیا کلی* اوراگامی با روش Real time PCR و تکنیک SDS

زهرا حاج محمدی[۱]، نوشین خندان دزفولی[۲*]، کیومرث امینی[۳]

[۱]کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

[۲*] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

[۳] دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۴ اصلاح نهایی: ۱۴۰۲/۰۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: آنزیمها نقش بسیار مهمی در صنایع مختلف و در پزشکی دارند. ناحیه ژنومی *bsfA* نیز یکی از اپرانهای بسیار مهم در زیست فناوری و زیست مهندسی به شمار می رود و در تهیه داروهای شکننده فیبرین (فیبرینولیتیک) یا داروهای شکننده لخته برای از بین بردن لخته خون در عروق (درمان ترومبوزیس و سکته قلبی) به‌کار می‌روند و می توان ازاین آنزیم در مواردرمانی استفاده کرد. باسیلوس ترموفیل حامل ژن های آنزیمی مختلفی بوده و هدف بررسی ژنومی و کلونینگ ژن *فیبرینولیتیک (bsfA)* از باسیل های ترموفیل خاک در باکتری *اشریشیاکلی* اوراگامی با روش Real time PCR و SDS PAGE است.

مواد و روش‌ها: سویه باسیلوس از مجموع ۷۰ نمونه خاک مناطق اطراف تهران جداسازی و تعیین هویت شدند. سپس با روش PCR ژن *bsfA* از باسیلوس ها استخراج شد. قطعه تکثیر یافته توسط روش TA کلونینگ (Transfer activity) به داخل وکتور بیانی pTG19 وارد شد. در مرحله بعد وکتور نوترکیب به باکتری *اشریشیا کلی* اوراگامی ترانسفورم شد و با استفاده از روش های رایج تایید کلونینگ انجام گردید. واکنش *PCR* برای ژن *bsfA* با پرایمر ذکر شده انجام شد.

یافته‌ها: در نتیجه از ۱۲ سویه *باسیلوس* جدا شده همگی (۱۰۰٪) واجد ژن *bsfA* بودند. نتایج کلونینگ RNA کلنی‌های مشکوک استخراج شده cDNA ساخته شده و توسط آزمون Real time PCR میزان بیان ژن *bsfA* بررسی شدند. تعیین هویت مولکولی جنس *باسیلوس* حامل ژن *bsfA* از پرایمرخانگی استفاده گردید. در نهایت با سکانس محصول PCR بیان ژن *bsfA* در باکتری *اشریشیاکلی* اوراگامی تایید شد.

نتیجه‌گیری: در نتیجه این پژوهش موفق به یافتن *باسیلوس های* بومی مولد *bsfA* شدندکه در نهایت، باموفقیت ژن این آنزیم از باکتری *باسیلوس* به باکتری *E.coli* منتقل شد تا بتوان با تولید بیشتر و صرفه اقتصادی این آنزیم را در *E.coli* تولیدکرد. برای ایجاد باکتری با قابلیت نوترکیب و بیان بالا، می‌تواند گام بزرگ در مسیر افزایش تولید این آنزیم در درمان بیماران دچار ترمبوزیس محسوب شده که مانع از ایجاد آمبولی و مرگ می گردد.

واژه‌های کلیدی : ژن *bsfA*، *باسیلوس*، *کلونینگ*، *فیبرینولیتیک*، *روش Real time PCR*، تکنیک *SDS-PAGE*

زهرا حاج محمدی، نوشین خندان دزفولی، کیومرث امینی. بررسی ژنومی وکلونینگ ژن *فیبرینولیتیک (bsfA)* باسیل ترموفیل خاک در باکتری اشریشیا کلی اوراگامی با روش مولکولی Real time PCR و تکنیک SDS PAGE. مجله طب دامپزشکی جایگزین. ۱۴۰۲؛ ۶(۱۷): ۹۷۹-۹۹۳.

* نویسنده مسئول: *[۲*] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران*

Orcid: https://orcid.org/ 0000-0002-2582-1468 ،Email: nooshinkhandan22@gmail.com

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

مقدمه

گونه *باسیلوس* شناخته شده در میان باکتریهای خاکزی مهمتر از سایرین بوده و همچنین از بین باکتریها گونه *باسیلوس سوبتیلیس* مشهورتر می‌باشد. از اعضای شناخته شده که به گروه پاتوژن معروف هستند، گروه *باسیلوس سرئومی* (یعنی *باسیلوس آنتراسیس*، *باسیلوس سرئومی* و *باسیلوس تورنجیزیس*) می باشند. غالب گونه های هوازی تولید کننده اسپور توانایی بیماریزایی کمی دارند یا آنکه بیماریزا نیستند. تنها استثناهای اصلی در این دسته از باکتری ها *باسیلوس آنتراسیس* عامل سیاه زخم، و *باسیلوس سرئوس* عامل مسمومیت غذایی می باشند (Nagata *et al.*, 2017).

آنزیم های که از لحاظ زیستی فعال هستند، ممکن است از هر موجود زنده‌ای استخراج شوند. از بین صدها آنزیمی که در صنعت کاربرد دارند بیش از نیمی از آن ها از قارچ ها و مخمرها، یک سوم از باکتری ها و بقیه از منابع گیاهی (۴٪) و منابع جانوری (۸٪) استخراج شده است (Omura *et al.*, 2005).

آنزیم فیبرینولیتیک توسط بسیاری از باکتری های گرم مثبت و بویژه گونه های باسیلوس تولید می‌شود. در گونه های باسیلوس واریانت های متنوع درون سلولی و خارج سلولی از این آنزیم شناسایی شده است، فیبرینولیتیک‌ها آنزیم های صنعتی ارزشمندی بوده و همچنین بطور گسترده برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی استفاده شده و به عنوان مدل های خوبی برای تحلیل ارتباط ساختار و فعالیت پروتئین مدنظر می باشند که باعث از بین رفتن لخته های خونی و در درمان بیماری های قلبی عروقی از جمله ترومبوزیس کاربرد زیاد دارند (Mei *et al.*, 2016).

ژن *bsfA* رمز کننده آنزیم فیبرینولایتیک بوده و پیش ساز ضروری برای تولید یک آنزیم فیبرینولیزین جدید برای درمان ترومبوز است. اخیراً به دلیل تشکیل لخته های خونی از طریق رژیم نامتعادل، بیماری های قلبی عروقی در انسان عوارض بسیاری را بدنبال دارد. اگرچه روش های مستقیم (پلاسمین انسانی) و غیر مستقیم (فعال کننده های پلاسمینوژن) در دسترس بوده اما برای دست یابی به فیبرینولیتیک فعال، استخراج ژن آنزیم از باکتری مولد به دلیل تولید ارزان و انبوه مورد توجه قرار گرفته است (Fang *et al.*, 2013). تکثیر یک ژن در حوزه‌های تحقیقاتی مورد استفاده بوده و به علاوه دارای کاربردهای پزشکی از قبیل ژن درمانی و کاربردهای صنعتی نظیر تولید مقدار زیادی از یک پروتئین می‌باشد (Yang *et al.*, 2019).

برای بیان یک ژن یوکاریوتی در باکتری باید حتما سیگنال های لازم جهت رونویسی و بیان ژن مورد نظر که قابل تشخیص باکتری باشدو در وکتور تعبیه می گردد. این سیگنال ها شامل : پروموتور، ترمیناتور و جایگاه اتصال ریبوزوم است. ژن مورد نظر طوری در وکتور وارد می شود که تحت کنترل پروموتور وکتور باشد (Ji *et al.*, 2014). بنابراین مقدار پروتئین نوترکیب سنتز شده وابسته به طبیعت پروموتوری است که روی وکتور بیانی قرار دارد البته فقط وجود یک پروموتور قوی برای تولید مقادیر زیاد پروتئین نوترکیب کافی نیست بلکه بیان بالای مطلوب مورد نظر است و باید به نحوی اثرات احتمالی این بیان بالا روی سلول میزبان مورد توجه و بررسی قرار گیرد (Kurosawa *et al.*, 2015). بعضی پروتئینها برای سلول میزبان سمی بوده و روی رشد و تکثیر باکتری اثرات نامطلوبی دارند. بخش بسیار مهم در وکتور بیانی پروموتور است، زیرا در اولین مرحله بیان نقش کنترلی مهمی

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

داشته و از طرفی سرعت رونویسی را تعیین می‌کند. در نتیجه برای بیان بالای یک پروتئین نوترکیب عمدتا ژن کلون شده را تحت کنترل یک پروموتور تنظیم شده قابل القا قرار می دهند در این پژوهش از روش Real time PCR برای بررسی میزان بیان ژن آنزیم فیبرینولایتیک استفاده شد.

در روش Real time PCR که تکنیکی برای مشاهده بی وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می باشد. همچنین با این روش می توان مقادیر تولیدات DNA، cDNA و RNA را نیز اندازه گیری نمود. تکنیک SDS-PAGE یک روش جهت مطالعه پروتئین ها می باشد. در این پژوهش به استخراج و کلونینگ مذکور پرداخته شد که سرانجام ژن کلونینگ فراهم کردن نسخه‌های متعدد از یک ژن منفرد است. این روش به طور معمول برای بررسی محصول، خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین ها بکار می رود (Singh *et al.,* 2018).

ناتوکیناز (Nattokinase) شناخته شده ترین آنزیم فیبرینولیتیک (ناتوکیناز آنزیمی است که از ناتو، یک غذای ژاپنی تهیه شده از سویای تخمیر شده استخراج می شود) تولید شده توسط برخی از سویه های *B. subtili* است. محصولات مبتنی بر Nattokinase در حال حاضر به عنوان یک داروی جایگزین برای درمان یا پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی در بازار هستند، اگرچه اثربخشی آن مورد تردید است. فقط در ایران مطالعاتی بر روی آنزیم ناتوکیناز جداشده از باسیلهای خاک که در فرآیند تخمیر مواد غذایی ژاپنی مورد استفاده بوده و از باسیلوس سوبتیلیس حاصل می شود مشاهده گردید. در ایران تاکنون بر روی این موضوع تحقیقی صورت نگرفته است و خلای پژوهشی در این موضوعات باعث ترغیب به مطالعات در این موارد گردید بنابراین هدف از انجام این تحقیق، مطالعه ژنومی *bsfA* جدا شده از باسیلهای ترموفیل خاک و کلونینگ آن در باکتری *اشرشیاکلی اوراگامی* با روش Real time PCR و SDS PAGE می باشد.

مواد و روش ها

برای انجام این تحقیق نمونه برداری خاک از مناطق مختلف استان تهران و باغات اطراف آن انجام شد به این ترتیب که ۷۰ نمونه از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری خاک جمع آوری شده و بعد از بسته بندی در کیسه های پلاستیکی سلوفانی که از قبل استریل شده به آزمایشگاه ارسال شدند. سپس به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیسم های دارای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت Skim milk agar و آزمون های بیوشیمیایی استفاده شد (Farouk *et al.,* 2014).

کشت نمونه های خاک

در این پژوهش نمونه های خاک از باغات اطراف تهران جداسازی شد. در خصوص کشت نمونه های خاک به منظور کاهش تعداد فرم های رویشی با هدف جداسازی سویه های باسیلوس از دو تیمار مختلف شامل تیمار حرارتی، خشک کرده خاک استفاده شد و سپس رقت سازی اعشاری از نمونه های خاک درآب مقطر انجام شد (Xu *et al.,* 2011).

کلنی های رشد کرده در سطح محیط تریپتیک سوی آگار (شرکت مرک، آلمان) که با کلنی های *باسیلوس* تهیه شده از بانک میکروبی شباهت ظاهری داشته اند توسط سوزن کشت برداشته و در سطح جدید تریپتیک سوی آگار که قبلا در پتری دیش ریخته و سطح آنها خشک شده کشت خطی Streak culture داده شدند و دردمای ۳۰ درجه سلسیوس درشرایط هوازی به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند وسپس از لحاظ خلوص بررسی شدند. باکتری *باسیلوس* از

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

طریق تست های بیوشیمیایی و بر اساس مورفولوژی ماکرو و میکروسکوپی و رشد در محیط کشت اختصاصی باسیل به دست آمد (Duan *et al.*, 2010).

تعیین هویت جدایه های باکتریایی مشکوک به *باسیلوس*

در خصوص تعیین هویت جدایه های باکتریایی از خصوصیات ظاهری کلنی (ماکروسکوپی)، خصوصیات میکروسکوپی و تستهای بیوشیمیایی استفاده شد. در نهایت پس از تایید باکتری *باسیلوس* بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، خصوصیات میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی (در قسمت نتایج) جهت تایید نهایی شناسایی مولکولی نیز انجام گردید (Kamiya *et al.*, 2010).

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج DNA (کیت مرکز ذخایر ژنتیک ایران) استفاده گردید. با این کیت استخراج به روش ستونی (Mini column) انجام شد. برای ارزیابی کمی وکیفی DNA غلظت DNA در نمونه های استخراج شده را با استفاده از روش فلورومتر بررسی شد. زمان اندازه گیری سریع درکمتر از ۵ ثانیه، قابلیت اندازه گیری مقادیر بسیار کم DNA و تعیین غلظت های بالاتر بدون نیاز به رقیق سازی صورت گرفت (Sumi *et al.*, 2011).

آماده سازی پرایمرها

پس از مراجعه به سایت و مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمرهای مناسب برای ژن آنزیم *فیبرینولایتیک* انتخاب شدند. پرایمر ها درسایت (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مقایسه و بلاست شدند و به شرکت ماکروژن سفارش داده شد. پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسانده شدند. درجدول ۱ توالی پرایمر و طول قطعه تکثیری آورده شده است (Sumi *et al.*, 2012).

نام ژن	توالی پرایمر
bsfA Forward	**GGCATTTCTCAAATTAAAG**
bsfA Reverse	**GGATGAGAAGAGTCAATTCCG**

جدول ۱. پرایمر مورد استفاده در این مطالعه (Ali *et al.*, 2020)

واکنش PCR

مقادیر مواد *PCR* برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon)، ۱ میکرولیتر از هرکدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سلسیوس *bsfA* به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت (جدول ۲ و ۳) (Park *et al.*, 2012).

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

مواد مورد نیاز	مقدار ترکیبات به میکرولیتر (µl)
آب مقطر دوبار تقطیر	۴
پرایمر چپ	۰/۸
پرایمر راست	۰/۸
DNA	۴
Master mix	۱۰
حجم نهایی	۲۵

جدول ۲. مقادیر مواد مورد استفاده برای انجام مراحل PCR

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	۱
واسرشت	۹۵	۳۰	–
اتصال	۵۶	۳۰	–
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۹۰	۳۴
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	–

جدول ۳. برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR

الکتروفورز محصولات *PCR* با ژل آگارز

برای الکتروفورز DNA از ژل آگاروز ۱/۵درصد استفاده شد. قطعات DNA حاصل از استخراج یکسان نبوده و دارای طول های متفاوتی می باشند که اندازه قطعات ماده ژنتیکی اهمیت دارد و جهت جداسازی آن ها از دستگاه الکتروفورز استفاده می شود.

تعیین گونه *باسیلوس*

برای تعیین هویت نهایی جنس باسلوس همچنین با استفاده از فراوان سازی ژنهای *16srRNA* برای تایید نهایی سویه *باسیلوس* از پرایمر های عمومی زیر (جدول ۴ و ۵) استفاده گردید سپس محصول PCR به منظور سکانس برای شرکت Bioneer ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس NCBI، BLAST شد (Suzuki *et al.*, 2003).

پرایمر	توالی پرایمر (5’ to 3’)	اندازه باند(bp)
16s-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۱۰۱
16s-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	۱۰۱

جدول ٤. پرایمرهای *16SrRNA* مورد استفاده در این پژوهش (Suzuki *et al.*, 2003).

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	زمان(ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	–
واسرشت	۹۴	۳۰	–
اتصال	۵۵	۴۵	–
بازآرایی(گسترش)	۷۲	۶۰	۳۰
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	–

جدول ۵. شرایط لازم برای *PCR* ژن *16srRNA* باکتری

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

کلون کردن ژن آنزیم فیبرینولایتیک (*bsfA*) در باکتری *اشریشیا کلی اوراگامی*

به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning (Transfer activity) استفاده شد که کیت PCR TA-Cloning از شرکت سیناژن تهیه شد. همانطور که در پروتوکل کیت ذکر کرده در این روش از یک وکتور خطی بنام PTG19-T که در انتهای ´۳ آن باز تیمین قراردارد استفاده شد. از وکتورخطی PTG19-T که در انتهای ´۳ خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می گردد، سپس آنزیم T4 DNA ligase با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم می کند، در نتیجه مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر بوده تشکیل شده که توانایی تکثیر خود بخود را در میزبان مناسب مانند *E.coli* دارا می‌باشد.

نحوه ورود وکتور به باکتری های پذیرنده وکتور (ترانسفرمیشن)

مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ساخته شده را داخل ویال ریخته، مواد Transfer شده را که در یخ قرار دارند به آن اضافه کرده و پس از مخلوط کردن بمدت ۶۰-۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس گذاشته شد. حتما باید به محیط کشت آنتی بیوتیک آمپی سیلین اضافه کرده تا باکتری بتواند در محیط رشد کند و وکتوری که دریافت کرده را نگه دارد. محتویات را بمدت ۱ دقیقه در دور ۶۵۰ سانتریفوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری روی پلیت LB کشت داده شده و بمدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه و در نهایت انجام کلونینگ تایید گردید (Laksmi *et al.*, 2018).

غربالگری سفید/آبی به منظور تایید صحت کلونینگ

وکتور کلونینگ بکار رفته در این روش PTG19-T دارای ژن *Lac z* می باشد، چون MCS وسط *Lac z* قرار گرفته و اگر قطعه ای وارد وکتور شود ژن *Lac z* تخریب می‌شود. در محیط کشت X-gal که آنالوگ لاکتوز و IPT که القاگر پروموتور *Lac z* وجود دارد، در نتیجه آنزیم پروتئاز باکتری فعال بوده و از X-gal استفاده کرده و کلنی آبی تشکیل می شود. اگر ژن مورد نظر ما وارد وکتور شده ژن *Lac z* تخریب شده و آنزیم *فیبرینولایتیک* غیرفعال شده است در نتیجه باکتری نتوانسته از X-gal استفاده کند و کلنی های سفید در محیط کشت شکل می‌گیرد. در نتیجه تشکیل کلنی های سفید نشان دهنده اینست که ژن مورد نظر ما با موفقیت کلون شده است. چون محیط دارای آمپی سیلین است، کلنی هایی که در محیط رشد کنند در حقیقت نشان دهنده دریافت پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است (Laksmi *et al.*, 2018).

تعیین میزان بیان ژن *فیبرینولایتیک* با روش Real time PCR

قبل از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز باکتری نوترکیب انکوبه گذاری می شود.پس از ۱۵ ساعت انکوبه گذاری (Late log phase) بهترین مرحله برای استخراج RNA است. پس از گذشت ۱۵ ساعت استخراج RNA انجام شد (Li *et al.*, 2007).

استخراج RNA

برای این منظور از RNA کلی برای واکنش های تکثیر پرایمر استفاده شد. برای استخراج RNA از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی (باکتریهای واجد ژن مقاومت به ژن آنزیم فیبرینولایتیک) که

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند مورد استفاده قرار گرفت (Mei *et al.*, 2017).

انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز Real Time-PCR

پس از سنتز cDNA واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت (Genet bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه های مورد نظر در دستگاه Corbet با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی *16sr RNA* بعنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. برای محاسبه میزان بیان ژنی آنزیم *فیبرینولایتیک* و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد (Wang *et al.*, 2005).

یافته ها

نتایج نمونه های خاک به منظور جداسازی *باسیلوس*

در نتیجه غربال گری ۷۰ نمونه خاک ارسالی به آزمایشگاه در مجموع ۱۲ کلنی مشکوک به باسیل گرم مثبت جداسازی شده که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی تحت عنوان *باسیلوس* تعیین هویت شدند.

تعیین هویت بر اساس تست های بیوشیمیایی

الگوی تست های بیوشیمیایی ذکر شده جهت تایید سویه بیوشیمیایی جنس *باسیلوس* انجام شد. نتایج بیوشیمیایی سویه *باسیلوس* جدا شده از خاک در جدول ۶ آورده شده است.

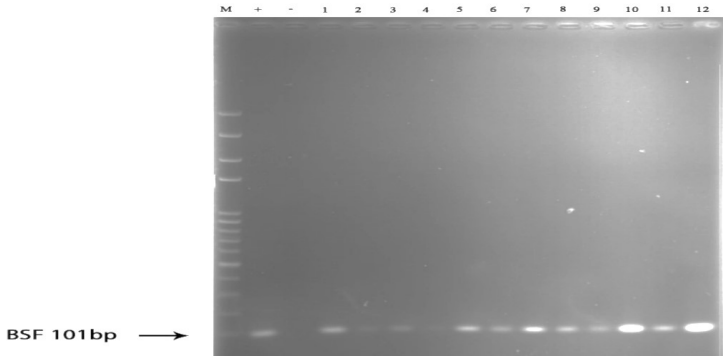
تست بیوشیمیایی	نتیجه
رنگ آمیزی	گرم مثبت- اسپوردار
متیل رد	+
سیمون سیتیرات	+
کاتالاز	+
وژپروسکائر	+
TSI	+
احیای نیترات	-
ایندول	-
اوره	-

جدول ٦. الگوی نتایج بیوشیمیایی سویه *باسیلوس* جدا شده از خاک

نتیجه آزمون *PCR* به منظور شناسایی و کلون ژن *bsfA*

واکنش PCR برای ژن های *bsfA* با پرایمرهای ذکر شده انجام شد. نتایج حاصل در شکل ۱ آورده شده است. از ۱۲ سویه *باسیلوس* جدا شده همگی (۱۰۰٪) واجد ژن *bsfA* بود.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]



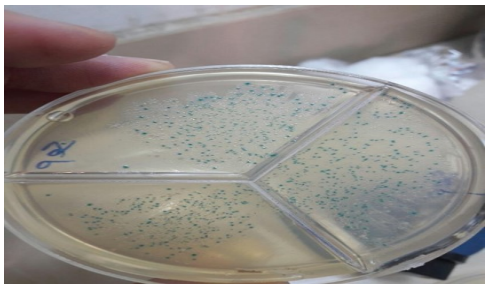
شکل ۱. نتیجه آزمون PCR برای بررسی فراوانی ژن (۱۰۱bp) *BsfA* نمونه های ۱ تا ۱۲

نتایج حاصل از کلونینگ ژن *bsfA*

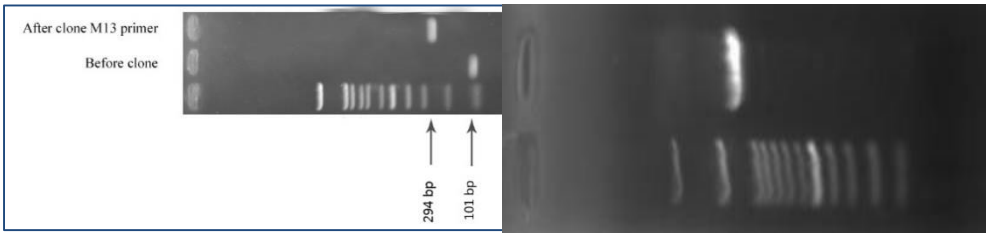
پس از کلون کردن سویه حامل ژن *bsfA* توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۲).

تعیین هویت مولکولی جنس *باسیلوس*

به منظور تعیین هویت مولکولی جنس *باسیلوس* حامل ژن *bsfA* از پرایمرهای عمومی *16sr RNA* استفاده گردید (شکل ۳).



شکل ۲. نتایج کلون ژن *bsfA*



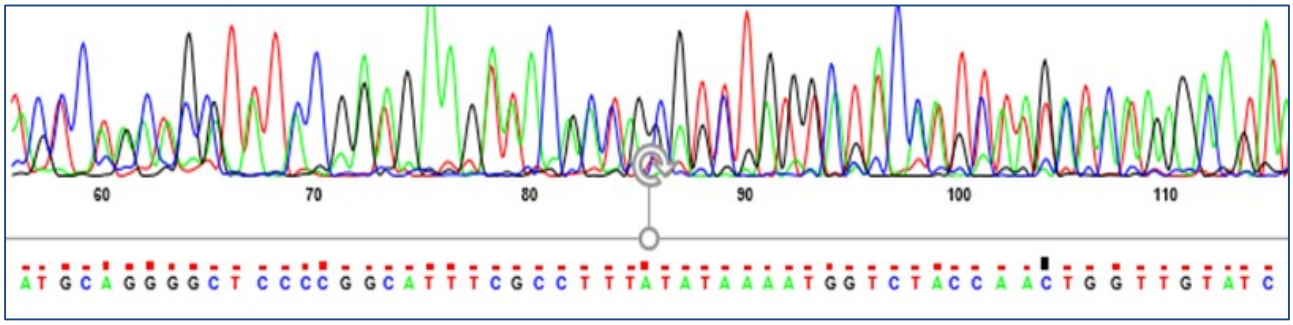
شکل ۳. نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی *16sr RNA* به منظور تعیین هویت مولکولی جنس باسیلوس

تایید نتایج کلون بوسیله *PCR* و سکانس

به منظور تایید نتایج کلون، DNA از کلنی‌های مشکوک استخراج شده و توسط آزمون PCR و در نهایت با سکانس محصول PCR، ورود ژن *bsfA* به باکتری *اشریشیاکلی* اوراگامی تایید شد. در نهایت محصول PCR برای سکانس به شرکت Bioneer ارسال گردید و BLAST شد (شکل ۴).

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]

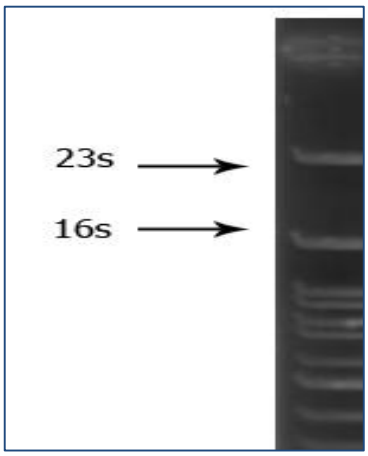
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]



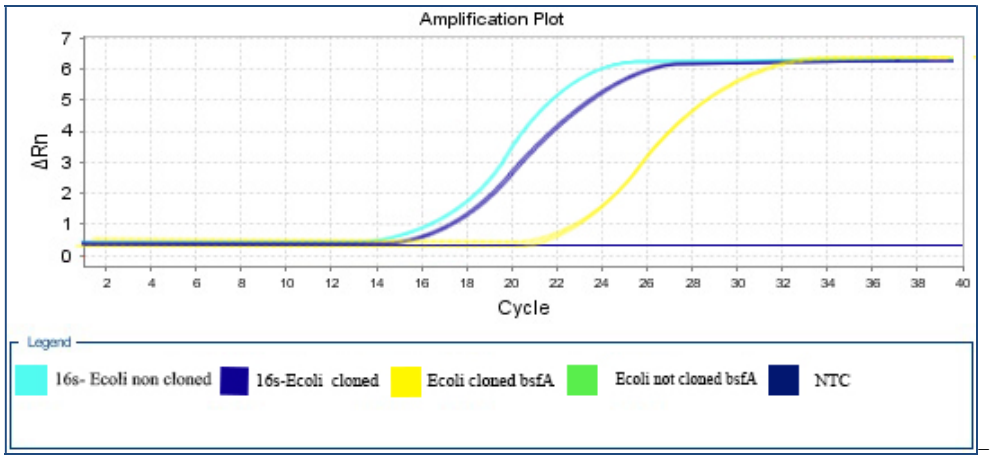
شکل ٤. تایید کلونینگ توسط *PCR* با پرایمر های *M13* وکتور و سکانس آن

تایید نتایج کلون بوسیله *Real time PCR* و سکانسینگ

به منظور تایید نتایج کلونینگ RNA کلنی های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد و توسط آزمون Real time PCR میزان بیان ژن *bsfA* بررسی شد. در نهایت با سکانس محصول PCR بیان ژن *bsfA* در باکتری *اشریشیاکلی* اوریگامی تایید شد (شکل ۵، ۶ و ۷).

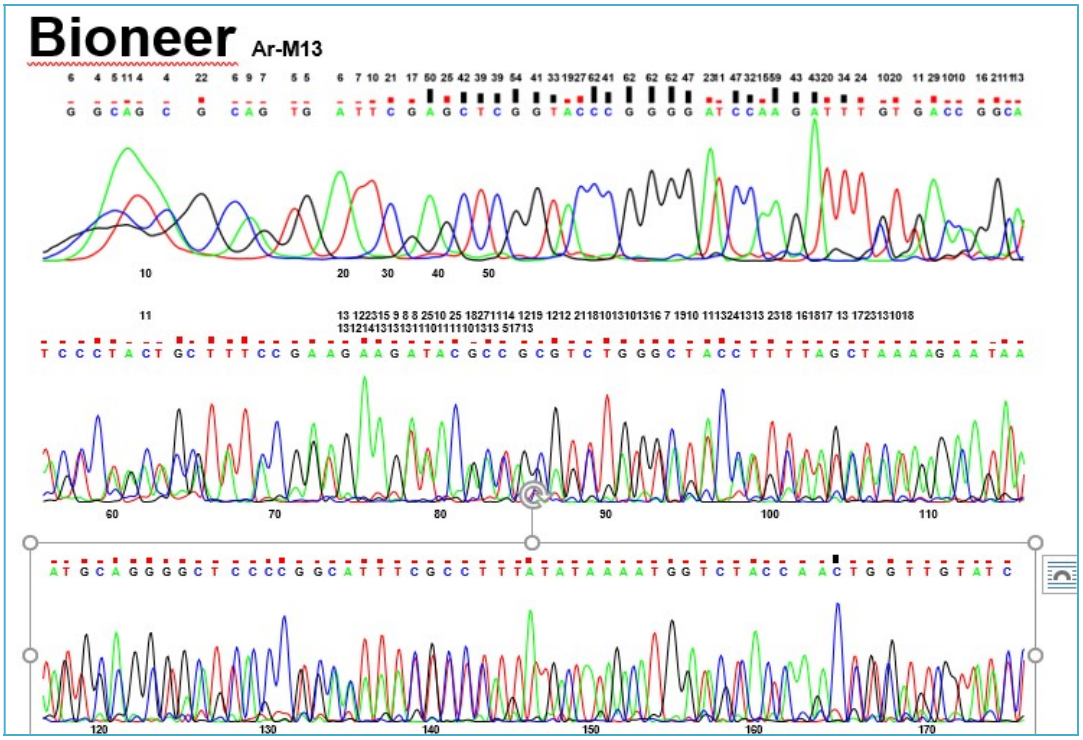


شکل ۵. نتیجه تست تایید استخراج *RNA*



شکل ٦ . نتایج Real time PCR

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]



شکل۷. نتایج حاصل از سکانسینگ ژن *bsfA*

بیان و تخلیص پروتئین نوترکیب *bsfA* در میزبان *اشریشیاکلی اوراگامی*

نتایج SDS-PAGE، بیان یک پروتئین دارای باند ۲۸ کیلو دالتونی نشانگر وزنی را نشان داد. آنالیز SDS-PAGE نمونه روی ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد در مقایسه با مارکر پروتئینی، یک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۸ کیلو دالتونی را نشان داد که با توجه به وزن مولکولی پروتئین به عنوان پورین در *باسیلوس ترموفیلوس* قرار دارد.

بحث

باسیل ها پروتئازها را با فعالیت های فیبرینولیتیک ترشح می کنند که می تواند مستقیماً فیبرین را که یکی از علل اصلی بیماری های قلبی عروقی مانند انفارکتوس حاد میوکارد و انفارکتوس مغزی است، تخریب کند.

به طور کلی بهبود سویه‌ها به لحاظ صنعتی و استفاده از روش‌های کلونینگ فرآیندی است که در صورت موفقیت، قابلیت تولید را تا چندین برابر افزایش می‌دهد. سویه *باسیلوس* از مهم ترین میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم هستند و منبع مهمی برای آنزیم های خارج سلولی به شمار می روند. آنزیم فیبرینولیتیک به عنوان درمانی برای حل لخته های فیبرین برای درمان قلب شناخته می شوند. داروهای شکننده فیبرین (فیبرینولیتیک)، یا داروهای شکننده لخته برای از بین بردن لخته خون ایجاد شده درعروق (مثلاً درمان سکته قلبی) به‌کار می‌روند. داروهای شکننده فیبرین به شکل تزریقی برای حل کردن لخته به کار می‌رود. در انیسترپلاز، گروه های انیسویل به جایگاه کاتالیزی بر روی پلاسمینوژن متصل شده تا ترکیب را زمانیکه تجویز یا تزریق شود پایدار می‌کنند و می توان از این آنزیم در موارد درمانی استفاده کرد (Abdul Rahim & Rengaswamy, 2022).

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

در کلونینگ مولکولی با تکثیر یک قطعه DNA یا RNA تعداد زیادی از این قطعات به دست می آیدکه جهت بررسی یک ژن خاص یا بیان آن ژن از آنها استفاده می‌شود. زمانیکه DNA از یک ارگانیسم استخراج می‌شود، تمامی ژن‌های آن ارگانیسم خارج می‌شود. در تمامی مراحل زیر محدویتهای پژوهشی ایجاد می شود: وارد کردن ژن مورد نظر به داخل یک وکتور مناسب، انتخاب سلول‌های میزبان ترانسفورم شده و شناسایی کلون‌های حاوی ژن مورد نظر، جداسازی کپی‌های ژنی تکثیر یافته/پروتئین‌های بیان شده از ژن هدف، وکتورهای کلونینگ دارای محدودیت در سایز DNA انتقالی هستند. امروزه بیوتکنولوژی موجب بهبود تولید آنزیم در سویه های باسیلوس که به عنوان منابع قدرتمند در تولید فیبرینولیتیک در نظر گرفته می شوند. از آنجا که تولید آنزیم به صورت طبیعی از منابع تولید کننده آن، که بیشتر باکتری‌ها و قارچ ها هستند، نمی‌تواند به لحاظ کمیت و ویژگی‌های کیفی آن جواب‌گوی نیازهای تجاری باشد. تغییر ژنتیکی سویه‌های تولید کننده آنزیمی در ازای تولید بیشتر و یا تغییر کیفیت محصول تولیدی مد نظر است. به طور کلی بهبود سویه‌ها به لحاظ صنعتی و استفاده از روش‌های کلونینگ فرآیندی است که در صورت موفقیت، قابلیت تولید را تا چندین برابر افزایش می‌دهد (Jeong *et al.*, 2007). هدف از انجام تحقیق به دست آوردن توالی یک ژن خاص، آنالیز سکانس DNA، بررسی عملکرد یک آنزیم خاص، RNA یا پروتئین تولید شده است. Heo و همکاران در سال ۲۰۱۳ اعلام کردندکه پروتئازهای فیبرینولیتیک ترشح شده توسط باسیل ها می توانند به عنوان منابع مفیدی برای توسعه درمان هایی استفاده شوند که توسط آن فیبرین موجود در رگ های خونی به طور موثر حذف می شود. اگر سویه‌های باسیلوس با فعالیت فیبرینولیتیک بسیار قوی از محیط‌های طبیعی، از جمله غذاهای تخمیر شده جدا شوند، می‌توان از این سویه‌ها برای تولید غذاهای تخمیری استفاده کرد که پس از مصرف باعث فیبرینولیز می‌شوند. تلاش برای جستجوی چنین ارگانیسمهایی باید ادامه یابد، زیرا بسیاری از میکروارگانیسم‌های موجود در طبیعت هنوز کشف نشده‌اند .به نظر می رسد الگوهای تخریب فیبرینوژن در بین آنزیم های فیبرینولیتیک مشابه متفاوت است و بنابراین هر آنزیم باید به صورت جداگانه بررسی شود. مهندسی پروتئین برای آنزیم‌ها گام بعدی برای ساخت آنزیم‌های فیبرینولیتیک و پایدار خواهد بود، جایی که تلاش‌های تحقیقاتی گسترده‌ای نیز در آینده مورد نیاز است (Heo *et al.*, 2013).

Ahn و همکاران ۲۰۱۵، برای شناسایی آنزیم جدید باکتریایی فیبرینولیتیک، ۱۱۱ سویه باکتریایی با فعالیت فیبرینولیتیک از کیمچی انتخاب شدند. از بین آنها ۱۴ سویه به دلیل فعالیت قوی‌تر از ۰/۰۲ U پلاسمین انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل توالی 16 SrRNA آنها نشان دادکه آنها متعلق به *باسیلوس، لوسونوستوک، پروپیونیکباکتریوم، ویسلا، استافیلوکوکوس و بیفیدوباکتریوم* هستند. سویه *B. Subtilis ZA400*، با بیشترین فعالیت فیبرینولیتیک انتخاب شد و ژن رمزگذاری کننده آنزیم فیبرینولیتیک *(bsfA)* کلون شد و در باکتری *E. coli* میزبان بیان شدند نتیجه نشان داد که *bsfA* می‌تواند کاندیدای مناسبی برای توسعه یک آنزیم فیبرینولیتیک جدید برای درمان ترومبوز باشد (Ahn *et al.*, 2015).

Ali و همکاران در سال ۲۰۲۰، سویه باسیلوس از مهم ترین میکروارگانیسم های تولید کننده آنزیم هستند و منبع مهمی برای آنزیم های خارج سلولی به شمار می روند.از ۱۵ سویه بدست آمده سویه های باکتریایی جهش یافته از نظر کیفی و کمی آن برای تولید آنزیم های فیبرینولیتیک مورد سنجش قرار

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

گرفت، نتایج نشان دادکه فعالیت آنزیم توسط بیشتر جهش یافته ها نسبت به وحشی اصلی آنها افزایش یافته است.گونه ها پس از جهش اشعه ماوراء بنفش، تمامی سویه ها باعث افزایش فعالیت آنزیم و تولید آنزیمهای فیبرینولیتیک در مقایسه با گونه های وحشی شدند(Ali *et al.*, 2020).

Poernomo و همکاران در سال ۲۰۱۷، در مطالعه حاضر، *Bacillus subtilis* از منبع خاک جدا شد و برای تولید ناتوکیناز غربالگری شد. آنزیمهای فیبرینولیتیک از میکروارگانیسم های مواد غذایی مانند باسیل ها می توانند جایگزین های امیدوارکننده ای برای *t-PA* یا استرپتوکیناز باشند. درمان های اخیر گران هستند و از عوارض جانبی مانند خونریزی رنج می برند. خواص ضد انعقادی این آنزیم نیز مورد بررسی قرار گرفت که زمان لخته شدن را برای نمونه های مختلف خون مخصوصا برای خون انسان به تأخیر انداخت. در نتیجه آنکه فیبرین گوسفند افزایش تولید *ناتوکیناز* دارای خاصیت ضد انعقادی است (Poernomo, 2017). فعالیت آنزیمی فیبرینولایتیک تولید شده در این پژوهش با انواع دیگر این آنزیم مقایسه شد تا در صورت عملکرد بهتر نسبت به آنزیم های تولید شده توسط سایر سویه به عنوان منبعی مناسب برای تولید این آنزیم در ساخت داروهای ضد انعقاد و داروهای قلبی استفاده گردد.

نتیجه گیری

در حال حاضر، اطلاعات بالینی کافی در مورد اثربخشی فیبرینولیتیک در داخل بدن در دسترس نیست، بنابراین مطالعات بیشتری باید در داخل بدن در آینده انجام شود. ژن آنزیم فیبرینولیتیک *bsfA* از منابع محدودی از جمله باسیلوس ها قابل استخراج است، بنابراین نیاز به تکثیر ژن این *bsfA* آنزیم، از منابع باکتریایی تولید کننده آن حائز اهمیت ویژه است. در نتیجه این پژوهش موفق به پیدا کردن *باسیلوس های* بومی مولد *bsfA* شد و در نهایت با موفقیت ژن این آنزیم را از باکتری *باسیلوس* به باکتری *E.coli* وارد نمود تا بتوان با توان تولید بالاتر و صرفه اقتصادی بیشتر این آنزیم را در *E.coli* تولیدکرد. در نهایت نتایج به دست آمده در این مطالعه در راستای ایجاد باکتری با قابلیت نوترکیب و بیان بالا، می تواند گام بزرگ در مسیر افزایش تولید این آنزیم در درمان بیماران دچار ترمبوزیس محسوب شود که مانع از ایجاد آمبولی و مرگ می گردد. بررسی بیشتر برای پیدا کردن سویه های جدید تولید کننده ژن *bsfA* می تواند منجر به پیدا کردن داروهای جدید با اثر بخشی بیشتر گردد.

تشکر و قدرانی

این مقاله اقتباسی از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بوده و در نهایت محققین این مقاله بر خود می دانند تا از زحمات کارشناسان و متخصصین آزمایشگاه میکروب شناسی بویژه آقای مهندس مجید صادق پور با راهنمایی‌های ارزنده و گرانقدر خود در پیشبرد این پژوهش کمال تشکر و امتنان را داشته باشند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می دارند که در این مطالعه هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

References

Abdul Rahim P., and Rengaswamy D. Fibrinolytic enzyme-an overview. Curr Pharm Biotechnol, 2022; 23(11): 1336-1345.

Ahn MJ., Ku HJ., Lee SH., and Lee JH. Characterization of a novel fibrinolytic enzyme, BsfA, from Bacillus subtilis ZA400 in Kimchi reveals its pertinence to thrombosis treatment. J. Microbiol. Biotechnol, 2015; 25(12): 2090-2099.

Ali Z., Li J., Zhang Y., Naeem N., Younas S., and Javeed F. Dates (*Phoenix Dactylifera*) and date vinegar: preventive role against various diseases and related in vivo mechanisms. Food Rev Int, 2020; 38(4): 480-507.

Duan Z., Jiang X., Jiang H., Zhang S., Dong M., and Zhao X. Study on the antioxidative activity and effects on experimental hyperlipidemia of natto extract. Acta Nutrimenta Sinica, 2010.

Fang HY., Wang HM., Chang KF., Hu HT., Hwang LJ., Fu TF., et al. Feruloyl-L-arabinose attenuates migration, invasion and production of reactive oxygen species in H1299 lung cancer cells. Food Chem Toxicol, 2013; 58, 459-466 .

Farouk AE., Banaja A., Ahamed NT., AlZahrani O., and Bazaid S. Evaluation of antimicrobial activities of Rosa damascena cv. Taifi extract. Afr. J. Microbiol Res, 2014; 8(50): 3913-3917.

Heo K., Cho KM., Lee CK., Kim GM., Shin JH., Kim JS., et al. Characterization of a fibrinolytic enzyme secreted by Bacillus amyloliquefaciens CB1 and its gene cloning. J. Microbiol. Biotechnol., 2013; 23(7): 974-983.

Jeong SJ., Kwon GH., Chun JY., Kim JS., Park CS., Kwon DY., et al. Cloning of fibrinolytic enzyme gene from Bacillus subtilis isolated from Cheonggukjang and its expression in protease-deficient Bacillus subtilis strains. J. Microbiol Biotechnol, 2007; 17(6): 1018-1023 .

Ji H., Yu L., Liu K., Yu Z., Zhang Q., Zou F., and Liu B. Mechanisms of Nattokinase in protection of cerebral ischemia. Eur J Pharmacol, 2014; 745: 144-151.

Kamiya S., Hagimori M., Ogasawara M., and Arakawa M. In vivo evaluation method of the effect of nattokinase on carrageenan-induced tail thrombosis in a rat model. Acta Haematol, 2010; 124(4): 218-224 .

Kurosawa Y., Nirengi S., Homma T., Esaki K., Ohta M., Clark JF., et al. A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. Scientific reports, 2015; 5: 11601.

Laksmi FA., Arai S., Tsurumaru H., Nakamura Y., Saksono B., Tokunaga M., et al. Improved substrate specificity for D-galactose of L-arabinose isomerase for industrial application. Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics, 2018; 1866(11): 1084-1091.

Li X., Wang X., Xiong S., Zhang J., Cai L and Yang Y. Expression and purification of recombinant nattokinase in Spodoptera frugiperda cells. Biotechnol Lett, 2007; 29(10): 1459-1464.

Mei W., Wang L., Zang Y., Zheng Z., and Ouyang J. Characterization of an L-arabinose isomerase from Bacillus coagulans NL01 and its application for D-tagatose production. BMC Biotechnol, 2016; 16(1): 1-11.

Nagata C., Wada K., Tamura T., Konishi K., Goto Y., Koda, S., et al. Dietary soy and natto intake and cardiovascular disease mortality in Japanese adults: the Takayama study. Am J Clin Nutr, 2017; 105(2): 426-431.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

Omura K., Hitosugi M., Zhu X., Ikeda M., Maeda H., and Tokudome S. A newly derived protein from Bacillus subtilis natto with both antithrombotic and fibrinolytic effects. J Pharmacol Sci, 2005; 99(3): 247-251 .

Park KJ., Kang JI., Kim TS., and Yeo IH. The antithrombotic and fibrinolytic effect of natto in hypercholesterolemia rats. Prev. Nutr. Food Sci., 2012; 17(1): 78.

Poernomo AT. Thrombolytic activity of fibrinolytic enzyme from black soybean tempeh (Glycine sojaSieb. Et Zucc) fermented by Rhizopusoligosporus FNCC 6010. Res J Pharm Biol Chem Sci, 2017; 8(1): 1885-1896.

Singh P., Negi R., Sharma V., Rani A., Pallavi and Prasad R. Production of fibrinolytic enzyme (nattokinase) from bacillus sp. Indo Am J Pharm Sci, 2018; 5(1): 379-383.

Sumi H., Hamada H., Nakanishi K., and Hiratani H. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinases. Acta Haematol, 2012; 84(3): 139-143.

Sumi H., Hamada H., Tsushima H., Mihara H., and Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experientia, 2011; 243(10): 1110-1111.

Suzuki Y., Kondo K., Matsumoto Y., Zhao BQ., Otsuguro K., Maeda T., et al. Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. Life sciences, 2003; 73(10): 1289-1298.

Wang P., Chen J., and Chen H. Purification and its thrombolytic and hematolytic effect of nattokinase in vitro. chinese pharmaceutical journal-beijing, 2005; 40(21): 1669.

Xu Z., Qing Y., Li S., Feng X., Xu H., and Ouyang P. A novel L-arabinose isomerase from Lactobacillus fermentum CGMCC2921 for D-tagatose production: Gene cloning, purification and characterization. J Mol Catal B: Enzym, 2001; 70(1-2): 1-7.

Yang H., Yang L., Li X., Li H., Tu Z., and Wang X. Genome sequencing, purification, and biochemical characterization of a strongly fibrinolytic enzyme from Bacillus amyloliquefaciens Jxnuwx-1 isolated from Chinese traditional douchi. J Gen Appl Microbiol, 2020; 66(3):153-162.

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]

JOAVM
Journal of Alternative Veterinary Medicine
joavm.kazerun.iau.ir

Research Article

Islamic Azad University
Kazerun Branch
Fars, Iran

Genomic Investigation and Cloning of the *Fibrinolytic* Gene (*bsfA*) of Thermophilic Soil Bacillus in *Escherichia Coli* Origami by Molecular Method, Real Time PCR and SDS Technique

Zahra Haj Mohammadi[1], Nooshin Khandan Dezfully[2*], Kumarss Amini[3]

[1]Master of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Kerman, Iran
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
[3]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Received: 24/Mar/2023 Revised: 26/Apr/2023 Accepted: 04/May/2023

Abstract

Background and aim: Enzymes play a very important role in various industries and in medicine. The BSFA genomic region is also considered one of the most important operons in biotechnology and bioengineering and is used in the preparation of fibrin-breaking drugs (fibrinolytic) or clot-breaking drugs to destroy blood clots in vessels (thrombosis and heart attack treatment) and this enzyme can be used in therapeutic cases. The thermophilic bacillus carries various enzyme genes and the goal is to investigate the genomics and cloning of the fibrinolytic gene (*bsfA*) from soil thermophilic bacilli in *Escherichia coli* origami bacteria by Real time PCR and SDS PAGE methods.

Materials and Methods: *Bacillus* strains were isolated and identified from a total of 70 soil samples from the areas around Tehran. Then bsfA gene was extracted from bacilli by PCR method. The amplified fragment was inserted into the pTG19 expression vector by TA cloning (Transfer activity) method. In the next step, the recombinant vector was transformed into Escherichia coli origami bacteria and cloning was confirmed using common methods. PCR reaction was performed for the *bsfA* gene with the mentioned primers.

Results: As a result, all of the 12 Bacillus strains isolated (100%) had the *bsfA* gene. The results of RNA cloning of suspected colonies extracted cDNA was made and the expression level of bsfA gene was checked by real time PCR test. Determining the molecular identity of the Bacillus genus carrying the bsfA gene was done using primers. Finally, the expression of the *bsfA* gene in Escherichia coli origami bacteria was confirmed by the sequence of the PCR product.

Conclusion: As a result of this research, they managed to find native bacilli producing bsfA, and finally, successfully transferred the gene of this enzyme from Bacillus bacteria to E.coli bacteria so that this enzyme can be produced in E.coli with more production and economic efficiency. To create bacteria with high expression and recombination ability, it can be a big step in increasing the production of this enzyme in the treatment of patients suffering from thrombosis, which prevents embolism and death.

Keywords: *bsfA gene, Bacillus, cloning, Fibrinolytic, Real time PCR method, SDS-PAGE technique*

Cite this article as: Zahra Haj Mohammadi, Nooshin Khandan dezfully, Kumarss Amini. Genomic investigation and cloning of the *fibrinolytic* gene (*bsfA*) of thermophilic soil bacillus in *Escherichia Coli Origami* by molecular method, real time PCR and SDS PAGE technique. J Altrn Vet Med. 2023: 6(17): 979-993.

**** Corresponding Author***
Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences,
Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.
Orcid: https://orcid.org/ 0000-0002-2582-1468 ,Email: nooshinkhandan22@gmail.com

[Downloaded from joavm.kazerun.iau.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.2717378.2023.6.17.1.8]