مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد سوم، شماره دوم، ۱۳۹٤
٥٥-٦٤
www.jcri.ir

همسانه‌سازی ژن آنزیم کلسترول‌اکسیداز سویه بومی ایرانی *Rhodococcus sp.* 502 در راستای تولید آفت‌کش بیولوژیکی پنبه

***صبا بهرامی[۱]، مسعود توحیدفر[۲]، محمدعلی ابراهیمی[۳] حامداسمعیل لشگریان [۴]**
[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۲]دانشیار، دانشکده مهندسی انرژی و فنآوری‌های نوین دانشگاه شهید بهشتی، گروه بیوتکنولوژی
[۳]دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۴]استادیار، گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی لرستان و عضو علمی مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۷

چکیده

آنزیم کلسترول‌اکسیداز به‌عنوان نسل جدیدی از آفت‌کش‌های بیولوژیک اثر آفت‌کشی قوی بر روی آفت غوزه پنبه (*Heliothis armigera*) دارد. مکانیسم اثر کشندگی کلسترول‌اکسیداز مربوط به اکسیداسیون کلسترول در غشای اپیتیلیوم روده میانی حشرات می‌باشد که منجر به تخریب فیزیکی و ساختاری غشاء و در نتیجه ایجاد اختلالاتی در عملکرد غشاء و در نهایت سبب مرگ آفت می‌شود. تولید گیاهان مهندسی ژنتیک شده با ژن کدکننده آنزیم کلسترول اکسیداز در جهت مقاوم‌سازی آن‌ها به آفات، مستلزم انتخاب مناسب‌ترین سوش از نظر میزان بیان و فعالیت زیاد این آنزیم است. لذا این تحقیق با هدف همسانه سازی ژن آنزیم کلسترول‌اکسیداز در یک سیستم بیانی pET مناسب، جهت امکان هدایت پروتئین نوترکیب تولیدشده به فضای پری‌پلاسمی باکتری طراحی و اجرا شد. بدین منظور از سویه باکتری (*Rhodococcus sp.* 502) بومی ایران، که دارای فعالیت کلسترول‌اکسیدازی بالا بود، جهت جداسازی ژن با PCR استفاده شد. محصول PCR ابتدا در پلاسمید خطی pJET و در نهایت در پلاسمید pET23a کلون و داخل میزبان (*E.coli* DH5α) ترانسفورم شد. پس از همسانه‌سازی و استخراج پلاسمید نوترکیب pET23a+cho و به‌منظور تأیید حضور ژن از آنزیم‌های *Hind*III و *Xho*I و تعیین توالی استفاده شده است. حضور باند ۱۶۰۰ جفت بازی در هضم آنزیمی حضور ژن را تایید کرد. نتایج حاصل از آنالیز تعیین توالی حاکی از آن است که توالی به‌دست آمده شباهت زیادی با کلسترول‌اکسیداز سویه‌های دیگر باکتری *Rhodococcus* موجود در NCBI دارد، که از آن می‌توان در راستای تولید آفت‌کش بیولوژیکی در پنبه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کلسترول‌اکسیداز، pET23a، همسانه سازی، آفت‌کش بیولوژیکی پنبه

*نویسنده مسئول: hamedesmaiili@gmail.com

مقدمه

میکروارگانیزم‌ها دارای پتانسیل عظیمی برای تولید گروه بسیار زیادی از آنزیم‌ها هستند که سال‌هاست به‌صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Dayanand and Patil, 2003) میکروارگانیسم‌ها به عنوان منبع آنزیم‌ها نسبت به گیاهان و حیوانات ارجحیت دارند (Patil *et al.,* 2006). چرا که عموماً تولید به‌وسیله آن‌ها ارزان‌تر است و با تکثیر و زاد و ولد سریع مقادیر بسیار زیادی آنزیم می‌توان از آن‌ها به دست آورد. هم‌چنین مدت زمان به‌دست آوردن آنزیم کوتاه‌تر و مناسب است و منابع قابل اعتمادی از مواد خام با ترکیبات پایدار به راحتی فراهم می‌شود. کلسترول‌اکسیداز (CHO) آنزیمی با ارزشی است که دارای دامنه گسترده‌ای از کاربردها در کشاورزی، پزشکی و صنعت است (Sharma *et al.,* 2001). آنزیم کلسترول‌اکسیداز به‌عنوان مونومر دو عملکردی کوفاکتور فلاوین‌آدنین‌دی‌نوکلئونید هستند که یه خانواده آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز خصوصاً آن‌هایی که بر روی گروه CH-OH دهنده اکسیژن به‌عنوان گیرنده عمل می‌کنند تعلق دارد. کوفاکتورهای آنزیم کلسترول‌اکسیداز به دو صورت، کووالانسی و غیرکووالانسی به آنزیم متصل می‌شوند (Badenes *et al.,* 2006). آنزیم کلسترول‌اکسیداز، واکنش کلسترول را در حضور مولکول اکسیژن کاتالیز می‌کند و ۴-کلستن-۳-ان و پراکسیدهیدروژن ایجاد می‌شود (Patil *et al.,* 2006). در سال ۱۹۴۴ Turfitt برای اولین بار آنزیم کلسترول‌اکسیداز را از باکتری *Nocardia erythropolis* جداسازی نمود و آن را به عنوان یک اکسیدکننده کلسترول معرفی کرد. به دنبال Turfitt آنزیم کلسترول‌اکسیداز از منابع محیطی خاک با کشت در محیط‌های غربالگری توسط محققین بسیاری شناسایی و جداسازی شد (Kumari *et al.,* 2012; Volontè *et al.,* 2010; Yang *et al.,* 2011; Doukyu *et al.,* 2009). از مهم‌ترین کاربردهای آنزیم کلسترول‌اکسیداز اثر آفت‌کشی آن است. آفت‌کش‌های بیولوژیکی غیرنوترکیب، مشابه *Bacillus thuringiensis* در مقابل آفات خاصی بسیار سمی عمل می‌کنند، اما برای انسان‌ها، گیاهان، حیات‌وحش و حشرات مفید زیانی ندارند و مدت اثر آن‌ها در محیط موقتی می‌باشد (Omidbegi *et al.,* 2010). مکانیسم اثر کشندگی متفاوت آنزیم کلسترول‌اکسیداز به عنوان یک آفت‌کش بیولوژیک بر روی آفاتی چون کرم غوزه پنبه، سرخرطومی پنبه، آن را نسبت به آفت کش‌های بیولوژیک موجود مانند Bt متمایز ساخته است به‌طوری‌که این آنزیم با اکسیداسیون کلسترول از غشای روده آفت باعث اختلال در عملکرد غشاء و مرگ حشره می‌شود (Corbin *et al.,* 1994; Somkuti *et al.,* 1992; Purcell *et al.,* 1993). در ایران ۴۰۰ تن سموم شیمیایی که عمدتاً از طریق واردات تأمین می‌شود، برای مبارزه با آفت کرم غوزه پنبه در مساحتی حدود ۱۵۰ هزار هکتار از مزارع این گیاه مهم به کار گرفته می‌شود. که بدین منظور در حدود شش میلیون دلار هزینه در سال برای واردات سموم پرداخت می‌شود که از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نمی‌باشد. از طرف دیگر

مشکلات استفاده نادرست و بی‌رویه از سموم شیمیایی علاوه بر مقاوم شدن آفات نسبت به سموم شیمیایی سبب آثار منفی بسیاری بوده که به طور مستقیم و غیرمستقیم بر عملکرد گیاه، کیفیت محصول، سلامت انسان و اکوسیستم کشاورزی تأثیر دارد و مشکلات زیست محیطی فراوان را ایجاد می‌کند (Etebari *et al.,* 2008; Rashno *et al.,* 2014; Omidbegi et al., 2010). از این رو اهمیت استفاده از آفت‌کش‌های بیولوژیکی برای کنترل آفات ضروری به نظر می‌رسد، به طوری که امروزه تولید گیاهان تراریخت که در برابر آفات، مقاوم باشند یکی از مهم‌ترین راهبردهای کنترل آفات به شمار می‌آید. در حال حاضر کشورهای پیشرفته به این مهم توجه خاص داشته و در این حیطه سرمایه‌گذاری‌های کلانی را انجام می‌دهند (Sharma *et al*., 2001). همچنین با کاربرد روز افزون آنزیم‌ها در صنایع، تولید این آنزیم‌ها با درجه خلوص و کیفیت بهتر از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا با توجه به اثر آفت‌کشی قوی کلسترول‌اکسیداز به عنوان یک آفت‌کش بیولوژیک، پژوهش حاضر با هدف همسانه‌سازی ژن کلسترول‌اکسیداز در ناقل بیانی pET23a انجام شد تا تولید آن در سطح زیاد فراهم شود.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت باکتری: باکتری (*Rhodococcus* sp. 502) که در این پژوهش جهت جداسازی ژن آنزیم کلسترول اکسیداز مورد استفاده قرار گرفت یک سویه بومی است که توسط دکتر لشگریان در آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان در اختیار ما قرار گرفت. باکتری مذکور در محیط LB کشت داده شد. نمونه‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری شد.

طراحی پرایمر و تکثیر ژن کلسترول اکسیداز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی: پس از استخراج و تلخیص ژنوم باکتری (*Rhodococcus* sp. 502) با استفاده از کیت استخراج سیناژن این ژنوم به‌عنوان الگو جهت تکثیر ژن تولید کننده کلسترول اکسیداز با استفاده از PCR مورد استفاده قرار گرفت. براساس توالی ژن مورد نظر یک جفت پرایمر با استفاده از نرم‌افزار Oligo 5 و Vector NTi طراحی شد.

Forward: 5´- TATA<u>CTCGAG</u>ACCGATAGCCGGGCGAACAG -3´
Reverse: 5´- TACC<u>AAGCTT</u>CTGGATGTCGGACGAGATGA -3´

ژن کلسترول‌اکسیداز با پرایمرهای ذکرشده در بالا، پرایمر رفت حاوی جایگاه برشی *Xho*I و پرایمر برگشت حاوی جایگاه برشی *Hind*III ابتدا با آنزیم *Taq* DNA polymerase و سپس با آنزیم *PFU* DNA polymerase تکثیر شد.

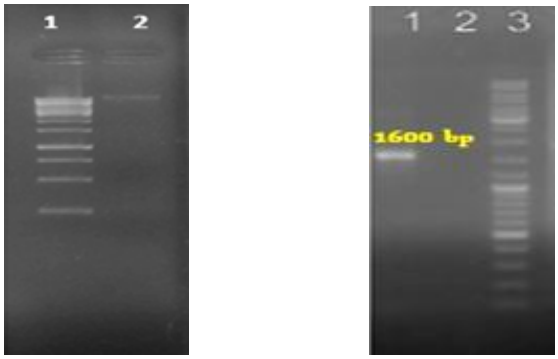
واکنش PCR به‌منظور تکثیر ژن آنزیم کلسترول اکسیداز: برنامه‌ی PCR (واسرشت‌سازی آغازین در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سی چرخه، تکثیر هر کدام شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۶۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه، پلی‌مریزه شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و پلی‌مریزه شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه) تکثیر شد. آنزیم *PFU* DNA polymerase دارای خاصیت proofreading بوده و در طی فرآیند PCR از اشتباه کمتری برخوردار است.

تهیه سلول پذیرا و انجام کلونینگ: قطعه‌ی تکثیر شده در وکتور pJET وارد و تحت عنوان pJET+cho نامیده شد و سپس با روش شوک حرارتی به باکتری (*E.coli* DH5α) انتقال داده شد. به‌منظور غربال‌گری کلون‌های سفید رنگ، از روش Colony PCR استفاده شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر اختصاصی CHO انجام گرفت.

استخراج پلاسمید و هضم آنزیمی: به منظور تأیید نتایج حاصل از Colony-PCR، از کلون‌های غربال‌شده پلاسمید استخراج شد و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی حاوی جایگاه برشی با پلاسمیدهای استخراج شده انجام گرفت. برای تائید نهایی حضور ژن *cho* در وکتور pJET، هضم دوگانه‌ی آنزیمی سازه ژنی pJET+cho با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Xho*I مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور کلون کردن ژن *cho* در وکتور بیانی pET23a، ابتدا پلاسمید pET23a با آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Xho*I برش داده شد. هضم دوگانه‌ی آنزیمی سازه‌ی ژنی pJET+cho با استفاده از آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Xho*I در حجم زیاد صورت گرفت. پس از خالص‌سازی ژن *cho* از ژل آگارز، این قطعه در وکتور بیانی pET23a وارد گردید و به باکتری (*E.coli* DH5α) انتقال داده شد. پس از همسانه‌سازی و استخراج پلاسمید نوترکیب pET23a+CHO، به‌منظورتأیید حضور نسخه ژنی *cho* در سازه ژنی فوق از روش برش آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *Hind*III و *Xho*I و توالی‌یابی قطعه مورد نظر انجام شد. نمونه‌های کلون شده جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد.

نتایج

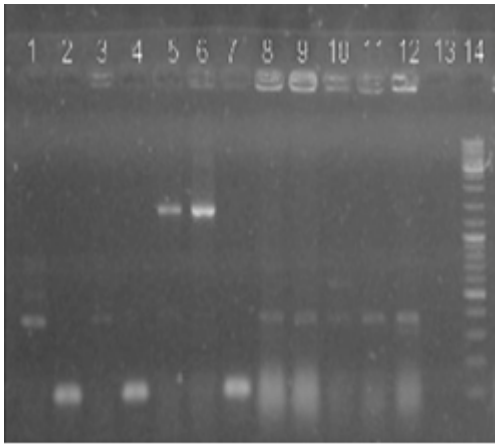
الف) بررسی نتایج PCR: نتایج واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ژن CHO حضور باند ۱۶۰۰جفت بازی را نشان داد، عدم تشکیل باند در کنترل منفی نشان دهنده عدم آلودگی در واکنش است (شکل ۱).



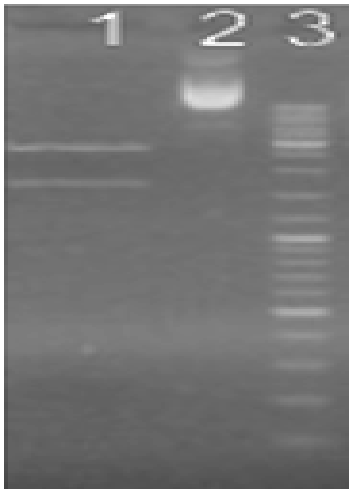
الف ب

شکل ۱- الکتروفورز نمونه DNA کل بر روی ژل آگارز (الف)، محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد (ب) چاهک ۱: محصول PCR ژن، چاهک ۲: کنترل منفی، چاهک ۳: مارکر اندازه 1kb شرکت فرمانتاز.

نتایج کلونینگ محصول PCR در وکتور pJET به روش Colony PCR و هضم آنزیمی در شکل ۲ آورده شده است.

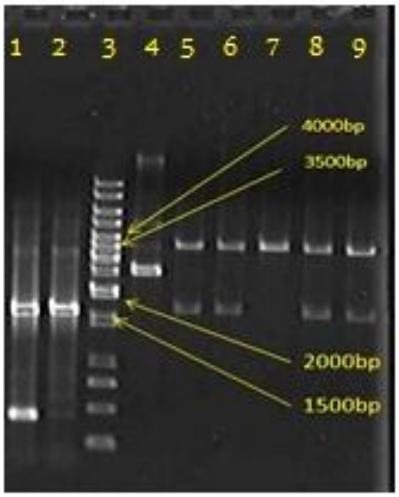


شکل ۲- بررسی نتایج کلونی PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ با پرایمرهای pJET بر روی pJET-CHO، چاهک‌های شماره ۱ الی ۱۲ کلونی باکتری، چاهک شماره ۱۳: کنترل منفی، چاهک شماره ۱۴: مارکر اندازه 1 Kb شرکت فرمانتاز

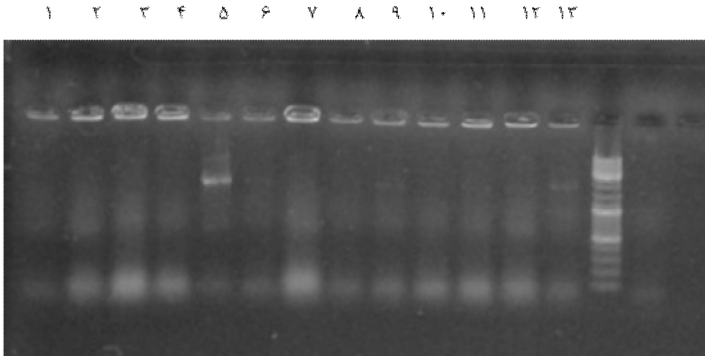


شکل ۳ - هضم آنزیمی با آنزیم‌های *HindIII* و *XhoI* بر روی pJET- CHO چاهک شماره ۱: pJET- *cho* (*Hind*III, *Xho*I)، چاهک شماره ۲ : pJET- *cho*، چاهک شماره ۳ : ladder

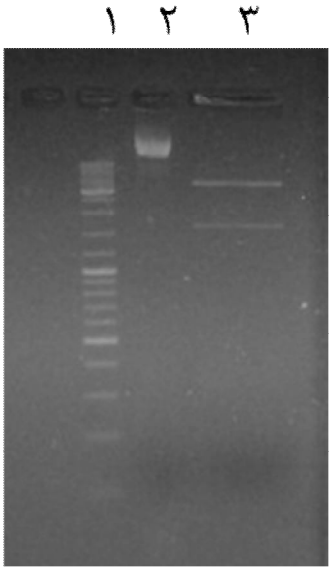
نتایج مربوط به تأیید کلونی‌های نوترکیب pET23a با استفاده از PCR و آنزیم‌های برشی در شکل‌های ۴ و ۵ آورده شده است.



شکل ۴- بررسی هضم آنزیمی وکتور pET23a بر روی ژل آگاروز ۱ درصد. چاهک شماره ۱ و ۲ محصول PCR ژن کلسترول‌اکسیداز، چاهک شماره ۳: ladder، چاهک شماره ۴: pET23a ،چاهک شماره ۵، ۶، ۸، ۹: هضم آنزیمی pET23a-CHO، چاهک شماره ۷: هضم آنزیمی pET23a



شکل ۵- بررسی نتایج کلونی PCR با پرایمرهای T7 promoter و T7 terminator بر روی پلاسمید pET23a-CHO با ژل آگاروز ۱ درصد (سمت راست) چاهک شماره ۱ الی ۱۳ کلونی باکتری، چاهک شماره ۱۴: مارکر اندازه 1 Kb فرمانتاز، چاهک شماره ۱۵: کنترل منفی



شکل ۶- بررسی هضم آنزیمی pET23a-CHO بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، چاهک شماره ۱ : مارکر اندازه 1Kb فرمانتاز ، چاهک شماره ۲: پلاسمید pET23a- CHO، چاهک شماره ۳: پلاسمید pET23a- CHO برش خورده با *Hind*III و *Xho*I

طبق شکل ۵ نتایج مربوط به PCR نشان داد که ژن مورد نظر در وکتور pET23a جای‌گذاری شده است به‌منظور تأیید کامل این فرایند از برش آنزیمی استفاده شد که نتایج آن در شکل ۵ آورده شده است. بدین‌منظور با استفاده از آنزیم *Xho*I، پلاسمید حاصل از کلونی‌های مذکور مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در صورتی که در حامل نوترکیب pET23a-CHO کاست ژن کلسترول‌اکسیداز به صورت همسو با کاست ژن *cho* قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *Xho*I، منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۶۰۰ جفت باز شد. به همین ترتیب در صورتی که در حامل نوترکیب pET23a-CHO، کاست ژن کلسترول‌اکسیداز به‌صورت همسو با کاست ژن *cho* قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *HindIII* و *Xho*I، منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۶۰۰ جفت باز می‌شود و جهت‌گیری عکس کاست ژن کلسترول‌اکسیداز نسبت به کاست ژن *cho* ظهور باندهایی با طول ۱۶۰۰ را سبب می‌شود (شکل ۵).

ب) نتایج تعیین توالی: برای اطمینان از عدم موتاسیون در ژن، پلاسمید نوترکیب پس از استخراج و تخلیص برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران فرستاده شد. توالی به‌دست‌آمده از ژن کلسترول‌اکسیداز با سایر ژن‌های کلسترول‌اکسیداز از سویه‌های دیگر باکتری با استفاده سایت NCBI و برنامه BLAST مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که توالی به‌دست‌آمده با سویه (*Rhodococcus equi*) به میزان ۹۷ درصد شباهت دارد. دلیل اصلی تفاوت در چند نوکلئوتید، احتمالاً به دلیل بروز جهش حذف در طی تکامل در طبیعت یا نوع سویه باشد (Akhtar *et al.,* 2013; Matsuba *et al.,* 2013; Chen *et al.,* 2011). به‌طورکلی توالی به‌دست آمده شباهت زیادی با ژن کلسترول‌اکسیداز سویه‌های دیگر باکتری موجود در NCBI داشت، که نتایج توالی‌یابی این پژوهش را مورد تایید قرار می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

آنزیم کلسترول‌اکسیداز به‌عنوان یک آنزیم پر کاربرد تجاری دارای کاربردهای وسیع در حوزه‌های پزشکی، صنعت و کشاورزی است.این آنزیم به‌عنوان نسل جدیدی از آفت‌کش‌های بیولوژیکی دارای مکانیسم عملی متفاوت نسبت به سایر آفت‌کش‌های بیولوژیکی است. از این‌رو ژن‌های کلسترول‌اکسیداز به عنوان آفت‌کش‌های قوی معرفی شده که می‌تواند در تولید گیاهان مقاوم در برابر آفات استفاده شود (Corbin *et al.,* 2001). با بررسی جامعی که به‌عمل آمده تاکنون گزارشی مبنی بر مقاومت آفات نسبت به پنبه تراریخت‌شده با ژن کلسترول‌اکسیداز ارائه نشده است که محققان آن را به دلیل وجود کلسترول در غشای سلول‌های دستگاه گوارش همه آفات و عمل اختصاصی کلسترول‌اکسیداز در اکسیداسیون کلسترول غشاء می‌دانند (Badense *et al*., 2006). هم‌ردیفی توالی کامل *cho* تکثیر شده از روی DNA باکتری توسط جفت آغازگرهای اختصاصی نشان داد که این توالی در باکتری‌های

تولید کننده کاملاً حفظ شده است. که خود دال بر اهمیت و کلیدی بودن این آنزیم می‌باشد. بنابراین در این پژوهش ژن *cho* با PCR جدا شد و در مکان برشی مشابه در ناقل بیانی pET23a که برای تولید آنزیم خالص کلسترول‌اکسیداز به کار می رود همسانه سازی شد. این قطعه الحاقی *cho* پائین دست پیشبر قوی ویروسیT7 و بالادست خاتمه دهنده قوی ویروسی در pET23a قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و هضم آنزیمی مشخص شد. پلاسمید نوترکیب برای بیان پروتئین نوترکیب آماده می‌باشد تا در طی مراحل تحقیقاتی آینده به‌عنوان یک کلون بیانی جهت استفاده در بخش کشاورزی به‌عنوان آفت‌کش بیولوژیک نقش آن‌ها ارزیابی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مسئولین و کارکنان دانشگاه علوم پزشکی لرستان و دانشگاه پیام نور به‌دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Akhtar T.A., Matsuba, Y., Schauvinhold, I., Yu, G., Lees, H.A., Klein, S.E. and Pichersky, E. 2013. The tomato *cis*-prenyltransferase gene family. Plant J. 73: 640-652.
2. Badense, M.L., Hurtado, M.A. and Liacer, G. 2006. Searching for molecular markers linked to male sterility and self-compatibility in apricot. Plant Breeding 119: 157-160.
3. Chen, F., Tholl, D., Bohlmann, J. and Pichersky, E. 2011. The family of terpene synthases in plants: A mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. Plant J. 66: 212-229.
4. Corbin, D., Greenplate, J., Wong, E. and Purcell, J. 1994. Cloning of aninsecticidal cholesterol oxidase gene and its expression inbacteria and in plant protoplasts. Appl. Environ Microbiol, 60:4239-4244.
5. Corbin, D.R., Grebenok, R.J. and Ohnmiess, T.E. 2001. Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in transgenic tobacco plants. Plant Physiol. 126(3): 1116-1128.
6. Dayanand, A. and Patil, S.R. 2003. In: Detection of potential fungal isolates for the production of pectinase from deseeded dried sunflower head.
7. Doukyu, N. 2009. Characteristics and Biotechnological Applications of Microbial Cholesterol Oxidase. Applied Microbiology and Biotechnology, 83(5): 825-837.
8. Etebari, K. and Matindost, E. 2008. Introduced a number of proteins insecticide as a fourth-generation pesticides Olive Special Edition (1). (In Persian)

9. Kumari, L. and Kanwar, S. 2012. Cholesterol Oxidase and Its Applications. Advances in Microbiol. 2: 49-65.
10. Matsuba, Y., Nguyen, T.T.H, Wiegert, K., Falara, V., Gonzales-Vigil, E., Leong, B., Schafer, P., Kudma, D., Wing, R.A., Bolger, A.M., Usadel, B., Tissier, A., Fernie, A.R., Barry, C.S. and Pichersky, E. 2013. Evolution of complex locus for Terpene biosynthesis in Solano, The Plant Cell. 25: 2022-2036.
11. Omidbegi, R. 2010. Approaches to production and processing of medicinal plants. Published by Tarahan Nashr. Designers Publications, pp. 173-161. (In Persian)
12. Patil, S.R. and Dayanand, A. 2006. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. Bioresource Technology. 97(18): 23-40.
13. Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Jennings, M.G., Ryerse, J.S., Pershing, J.C., Sims, S.R., Prinsen, M.J., Corbin, D.R., Tran, M., Sammons, R.D. and Stonard, R.J. 1993. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1406-1413.
14. Rashno, M. 2014. Identification, isolation and biochemical activities of the enzyme cholesterol oxidase compared Lorestan soil indigenous bacteria for use as biological pesticides cotton, M.Sc. Thesis. Payame Noor University, Tehran. (In Persian)
15. Sharma, A. and Gupta, M.N. 2001. Purification of pectinases by three-phase partitioning. Biotech. Letters. 23(19): 1625-1627.
16. Somkuti, G.A., Solaiman, D.K.Y. and Steinberg, D.H. 1992. Expression of *Streotomyces sp*. cholesterol oxidase in *Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:330-334.
17. Turfitt, G.E. 1994. The microbiological degradation of steroids: 2. Oxidation of cholesterol by Proactinomyces spp. Biochemical Journal. 38(5): 492-496.
18. Volontè, F., Pollegioni, L., Molla, G., Frattini, L., Marinelli, F. and Piubelli, L. 2010. Production of Recombinant Cholesterol Oxidase Containing Covalently Bound FAD in *Escherichia coli*, BMC Biotechnology, 10: 33-35.
19. Yang, J.Y., Li, Y., Chen, S.M. and Lin, K.C. 2011. Fabrication of a cholesterol biosensor based on cholesterol oxidase and multiwall carbon nanotube hybrid composites. International Journal of Electrochemical Science, 6: 2223-2234.

Iranian Journal of Cotton Researches
Vol. 3, No. 2, 2015
www.jcri.ir

Cloning of cholesterol oxidase gene from Iranian strain of Rhodococcus for production of cotton biological pesticide

S. Bahrami[1], M. Tohidfar[2], M.A. Ebrahimi[3] and [*]H. Esmaeil Lashkarian[4]
[1]M.Sc in Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran
[2]Department of Biotechnology, Faculty of Energy Engineering and New Technology, ShahidBeheshti University, Tehran, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
[4]Assistant Professor, Department of Genetic and Biochemistry and Razi Herbal Medicines Research Center,Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran.
Received: 2016/3/11 ; Accepted: 2016/7/17

Abstract

Cholesterol oxidase enzyme, as a new generation of biological pesticides, has pesticides strong effect on the pest to cotton *Heliothisarmigera*.The mechanism of action of cholesterol oxidase fatality related to the oxidation of cholesterol in the membranes of insect midgut epithelial which leads to physical destruction and the resulting disturbances in membrane structure and function and eventually death of the insect. In order to retrofitting genetically engineered plants against pests, production of them with the gene coding for cholesterol oxidase enzyme, require the best method for expression level and activity of this enzyme. Therefore, this study aimed to clone cholesterol oxidase enzyme in plasmid pET23a for possible guidance recombinant protein produced in bacterial periplasmic space. *Rhodococcus sp. strain 502 that produce high level of cholesterol oxidase, was used* for gene isolation by PCR. The PCR product was sub cloned in plasmid pJET, subsequently for expression was cloned in pET23a, eventually was transformed into the host *E.coli* DH5α. Recombinant plasmid pET23a CHO was confirmed by restriction enzyme digestion and sequencing. The results of sequencing showed high similarity between our isolated gene sequence and the other cholesterol oxidase gene sequences in NCBI that can be used for production of biological pesticide.

***Keywords*:** Cholesterol oxidase, Cloning, pET23a, Cotton biological pesticides

[*]Corresponding author;hamedesmaiili@gmail.com