

همسانه سازی و ساخت وکتور بیانی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم

بنت الهدی عربپور^۱، ابوالقاسم اسماعیلی^{۲*}، محمد ربانی^۲ (PhD)

۱- گروه زیست فناوری، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، دانشگاه اصفهان

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

دریافت: ۹۴/۸/۲۲، اصلاح: ۹۴/۱۰/۱۶، پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

خلاصه

سابقه و هدف: گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) یک اسید آمینه چهار کربنه غیر پروتئینی است که در درمان فشارخون، دیابت، التهاب و افسردگی می تواند بکار رود. گابا توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز در بسیاری از موجودات شامل باکتری‌ها سنتز می شود. از اینرو همسانه سازی این آنزیم جهت بهینه‌سازی تولید گابا اهمیت دارد. هدف از این پژوهش همسانه سازی و ساخت وکتور بیانی حاوی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم PTC1058 است.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی خصوصیات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، ژنتیکی و توالی یابی 16s rDNA سویه لاکتوباسیلوس پلانتروم ۱۰۵۸ بررسی شد. سپس DNA ژنومیک این باکتری جدا و با استفاده از PCR ژن گلوتامات دکربوکسیلاز تکثیر شد. سپس این ژن در حامل کلونینگ pJET1.2/Blunt وارد و در حامل pET32a ساب کلون گردید. حامل پلاسمید بیانی pET32a-gad در *شریشیا کالی* سویه BL21 ترانسفورم گردید و بیان پروتئین با استفاده از SDS-PAGE بررسی شد. **یافته‌ها:** بررسی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و ژنتیکی توالی یابی 16srDNA نشان داد که زیر سویه مورد بررسی مربوط به سویه لاکتوباسیلوس پلانتروم است. نتیجه توالی یابی قطعه تکثیر شده با استفاده از PCR وجود ژن گلوتامات دکربوکسیلاز را نشان داد. در پایان نتیجه کلنی PCR و آنالیز SDS-PAGE، صحت همسانه‌سازی و بیان آنزیم در سویه نو ترکیب BL21 را تأیید کرد.

نتیجه گیری: این مطالعه همسانه سازی موفق ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پلانتروم ۱۰۵۸ را نشان داد. ژن همسانه سازی شده می تواند در سیستم‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی سریع رشد و استفاده از محیط کشت‌های ارزان تر و حتی پسماندهای غیر قابل بازیافت به کار رود. **واژه‌های کلیدی:** همسانه سازی، گاما آمینو بوتیریک اسید، گلوتامات دکربوکسیلاز، لاکتوباسیلوس.

مقدمه

اسید دکربوکسیلاز وابسته به پیروودوکسال فسفات است (۱). گلوتامات دکربوکسیلاز در باکتری‌های اسیدلاکتیک یک آنزیم درون سلولی (۲۴ و ۲۳) است که در پاسخ به استرس اسیدی القا می‌شود (۲۵). اختلاف در ساختار اولیه این آنزیم می‌تواند در توانایی آن در تولید گابا تأثیر بگذارد (۲۳). از جمله اهداف همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز (*gad*)، تهیه و یا دستیابی به باکتری‌های نو ترکیبی است که علاوه بر قابلیت استفاده از محیط کشت ارزانتر، توانایی تولید گابای بیشتر داشته باشند. تاکنون طول کامل ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پاراکازی NFRI 7415 (۲۳)، لاکتوباسیلوس برویس OPK-3 (۲۶)، لاکتوباسیلوس برویس IFO12005 (۹) و لاکتوکوکوس لاکتیس 01-7 (۲۷) و قطعات اصلی از ژن گلوتامات دکربوکسیلاز B از لاکتوباسیلوس پاراکازی PF6 لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس PR1، لاکتوباسیلوس لاکتیس PU1 و لاکتوباسیلوس پلانتروم C48 همسانه‌سازی و تعیین توالی شده‌اند (۱۱). علاوه بر این ژن

گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) یک اسید آمینه چهار کربنه است که در ساختار پروتئینها یافت نمی‌شود (۱). گابا به عنوان یک انتقال دهنده عصبی مهاری در دستگاه اعصاب مرکزی و همچنین در بافت‌های محیطی تعداد زیادی از موجودات پذیرفته شد (۸-۲). گابا عملکردهای مهمی شامل کاهش فشارخون (۱۰-۸)، ادرار آور (۱۱-۱)، آرام بخش، درمان بی‌خوابی و افسردگی (۱۲)، بیماری‌های خود ایمنی (۱۳)، درمان بیماری‌های مزمن مربوط به مصرف الکل (۱۴)، کاهش التهاب (۱۶ و ۱۵)، محرک سلول‌های ایمنی (۱۷)، مهار دیابت (۱۸)، خواص ضد توموری (۱۹)، انتشار اسیدهای آمینه آزاد، بهبود سلامت اعصاب و روان انسان (۲۰) درمان ناهنجاری‌های نورولوژیکی مانند صرع، پارکینسون، شیزوفرنی، اسپاسم و آلزایمر (۲۱) دارد. بنابراین در پزشکی و حتی در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است (۲۲). گابا به طور گسترده‌ای در طبیعت در میان ریزسازواره‌ها (مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها)، گیاهان و حیوانات وجود دارد. آنزیم کاتالیز کننده واکنش غیر قابل برگشت دکربوکسیلاسیون L-گلوتامات برای تولید گابا، گلوتامیک

این مقاله حاصل پایان نامه بنت الهدی عربپور دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی و طرح تحقیقاتی به شماره طرح ۹۰/۹۷۸۸۶ دانشگاه اصفهان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر ابوالقاسم اسماعیلی

آدرس: اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی. تلفن: ۳۷۹۳۳۴۹۰-۳۱

E-mail: aesmaeili@sci.ui.ac.ir

قبلا توضیح داده شد، انجام شد. جهت آشکارسازی نتایج PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و سپس مشاهده با دستگاه ژل داک صورت گرفت. در نهایت پس از خالص سازی محصول PCR، قطعه خالص شده جهت توالی یابی به صورت دو بار خوانش به شرکت تکاپوزیست تهران ارسال شد. قطعه استخراج و خالص شده با استفاده از کیت کلونینگ (CloneJET™ PCR Cloning Kit) به وکتور pJET1.2/Blunt (فرمتناز) یا T/A وکتور، دارای انتهای صاف متصل شد. و مطابق پروتوکل های رایج تکثیر قطعه موجود در وکتور انجام گرفت. برای ترانسفورماسیون ناقل pJET1.2 نوترکیب، باکتری اشرشیاکلی سویه TOP10 بعنوان میزبان همسانه سازی مورد استفاده قرار گرفت.

ساب کلونینگ ژن گلوتامات دکربوسیلز در پلاسمید بیانی: استخراج پلاسمید از باکتری های دارای پلاسمید pET-32a(+) و pJET1.2 EcoRI و BamHI (فرمتناز) gad(+) انجام شد. آنزیم های محدودالایر BamHI و EcoRI (فرمتناز) جداگانه جهت هضم دو آنزیمی استفاده شدند. ناقل بیانی نوترکیب pET-32a(gad⁺) در سویه بیانی باکتری BL21 از قبل مستعد شده، با روش شوک حرارتی وارد شد و پس از رشد در محیط آنتی بیوتیک دار، از چند کلونی به طور تصادفی کلنی PCR انجام شد.

بررسی بیان ژن گلوتامات دکربوسیلز با استفاده از آنالیز SDS-PAGE: بیان ژن گلوتامات دکربوسیلز با افزودن IPTG ۰/۵ میلی مولار در یک کلنی از سویه BL21 نوترکیب در کشت داده شده در محیط LB آنتی-بیوتیک دار انجام و از آنالیز SDS-PAGE استفاده شد.

یافته ها

نتایج بررسی های مورفولوژیک، بیوشیمیایی پس از مقایسه با جدول استاندارد برگ (http://www.bergeys.org/outlines.html). داده ها نشان داده نشده است) و آزمایش ژنتیکی توالی یابی 16sRNA (شکل ۱A باند ۳۷۰ bp)، پس از بلاست و بررسی آن نشان داد سویه مورد بررسی باسیل گرم مثبت و کاتالاز منفی لاکتواسیلوس پلانتاروم است. کیفیت و کمیت DNA ژنومی استخراج شده از باکتری لاکتواسیلوس پلانتاروم با کیت استخراج DNA سیناژن با استفاده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد که غلظت ۱۶۹۳/۱ میکروگرم بر میلی لیتر و نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ برابر ۸۲/۱ برای نمونه استخراج شده به دست آمد و نتیجه الکتروفورز نیز کیفیت بالای آن را مشخص کرد. نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بر روی ژنوم استخراجی با آغازگرهای طراحی شده نشان دهنده یک باند ۱۴۱۰ bp است (شکل ۱B) که نشان دهنده وجود ژن gad با طول کامل است. همانگونه که در شکل ۱C و ۱D مشاهده می شود الحاق ژن gad در T/A و کتور کلونینگ و همسانه سازی در سویه کلونینگ TOP10 موفقیت انجام شده است. استخراج پلاسمید، خالص سازی و بررسی نتایج توالی یابی قطعه، تأیید کرد که قطعه خالص شده مربوط به یکی از زیر سویه های لاکتواسیلوس پلانتاروم است. نتایج کلنی PCR پلاسمید هم از سویه نوترکیب TOP10 و هم از سویه بیانی BL21 وجود ژن gad را تأیید کرد (شکل ۲A و ۲B). بررسی های SDS-Page، صحت همسانه سازی و بیان آنزیم را در سویه بیانی نوترکیب نشان داد (شکل ۲D و ۲C) هرچند برای تأیید نهائی آزمایش وسترن بلات و یا سایر آزمایش ها لازم است.

گلوتامات دکربوسیلز از لاکتواسیلوس برویس OPK-3 (۲۷) به طور موفقیت آمیزی در باکتری اشرشیاکلی بیان شدند و همچنین ژن گلوتامات دکربوسیلز از باکتری لاکتواسیلوس برویس OPK-3 به طور موفقیت آمیزی در باسیلوس ساتیلیس بیان شد (۲۸). مطالعه منابع داخلی نشان می دهد که گابا در ایران تولید نمی شود و عمدتاً وارداتی است.

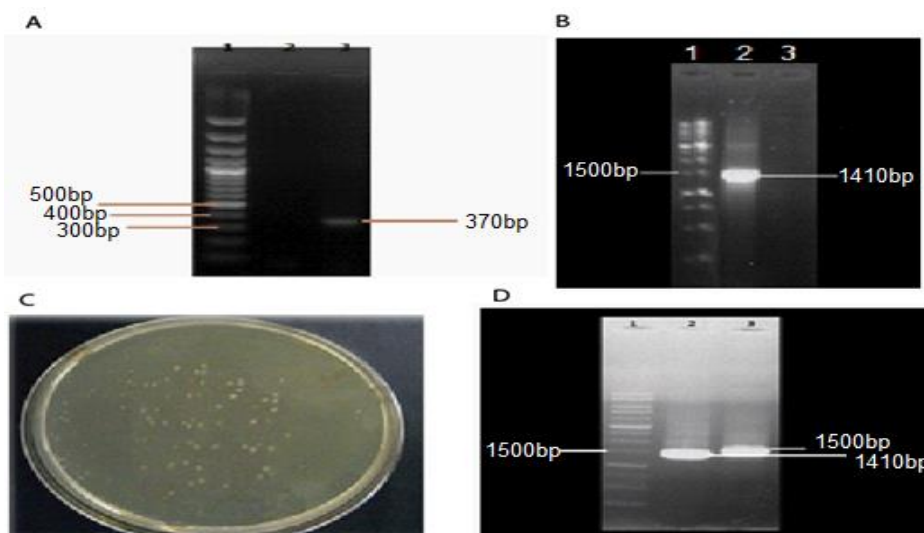
گاباپنتین، یک ماده درمانی آنالوگ گابا است. این ماده در ابتدا برای درمان صرع و همچنین تسکین دردهای نوروپاتی استفاده می شد و در سال ۱۹۹۴ توسط FDA به منظور کنترل صرع تأیید شد (۲۹). گاباپنتین دارای عوارض جانبی متعددی مشتمل بر سرگیجه، خستگی، افزایش وزن، خواب آلودگی می باشد که این عوارض در دوزهای بالاتر در افراد مسن مشاهده شده است. بنابراین نباید به مدت طولانی مصرف شود (۳۰). با توجه به اهمیتی که گابا در پزشکی، بهداشت و نیز صنایع غذایی دارد هدف از این پژوهش همسانه سازی و ساخت وکتور بیانی حاوی ژن گلوتامات دکربوسیلز از باکتری لاکتواسیلوس پلانتاروم PTCC1058 است.

مواد و روش ها

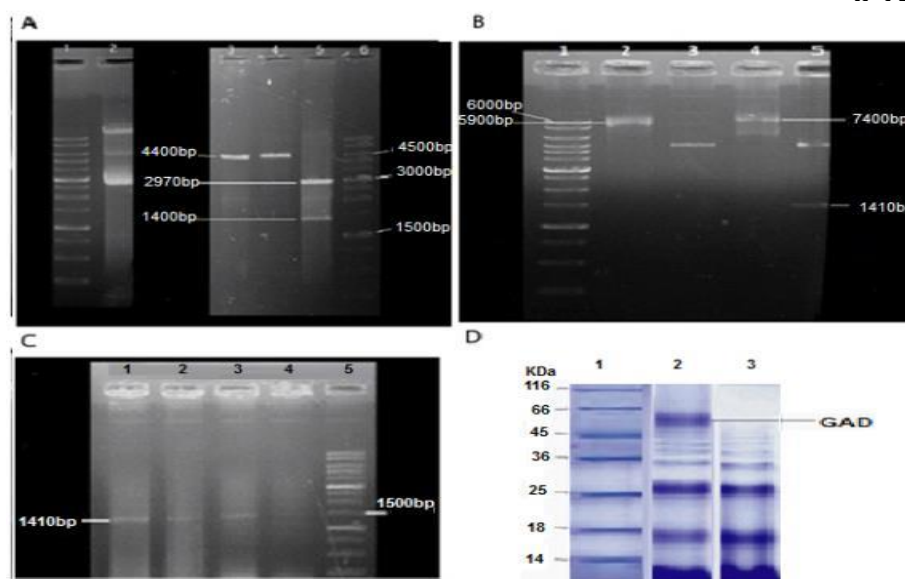
در این مطالعه تجربی سویه لاکتواسیلوس پلانتاروم PTCC1058 از گروه میکروبیولوژی دانشگاه اصفهان و سویه های BL21 و TOP10 از سازمان ملی پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهیه شدند.

کشت باکتری لاکتواسیلوس پلانتاروم PTCC1058 و تأیید آن: در این پژوهش به منظور جداسازی ژن gad سویه لاکتواسیلوس پلانتاروم PTCC1058 در محیط کشت MRS (Man, Rogosa and Sharpes) (شرکت مرک) کشت داده شد. جهت تأیید سویه علاوه بر آزمایش ها بیوشیمیایی و مورفولوژیکی از واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای ژن 16sDNA با توالی AGGAGGTGATCCACCCGCA و DG47F RW01RAACTGGAGGAAGGTGGGGAT (تکاپوزیست) استفاده شد. بطور خلاصه ابتدا DNA ژنومی باکتری استخراج شد (کیت شرکت سیناژن) و سپس واکنش PCR متشکل از ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR10x، ۰/۵ میکرو لیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱ میکرو لیتر dNTP، ۱ میکرو لیتر Mgcl2، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و در نهایت افزودن آب مقطر تزریقی تا حجم ۲۵ میکرو لیتر در ۳۰ سیکل (۴۵ S - ۹۴°C، ۴۵S - ۵۸°C، ۶۰S - ۷۲°C) و در پایان انکوباسیون نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد. محصول PCR خالص شده جهت توالی یابی به صورت یک بار خوانش به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. نتیجه توالی یابی 16srRNA، با برنامه BLASTn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST بررسی شد.

تکثیر ژن گلوتامات دکربوسیلز: آغازگرهای مربوط به ژن گلوتامات دکربوسیلز با استفاده از نرم افزار Oligo ۷ دارای جایگاه برش آنزیمی طراحی و ساخته شد (CGCGGATCCATGGCAATGTTATACGGTAAA) و PLANre-F و CCGGAATTCCTCAGTGTGTGAATCCGTATTTCTT). جهت تکثیر ژن گلوتامات دکربوسیلز، واکنش PCR همانند آنچه



شکل ۱. (A): ستون ۱: DNA Ladder 1kb، ستون ۲: باندی در حدود ۳۷۰bp نتیجه PCR ژنوم باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1058 با آغازگرهای DG47F و RW01R. (B): نتایج حاصل از ژل آگارز برای DNA استخراجی باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1058 با آغازگرهای PLANreF و PLANreR. ستون ۱: DNA Ladder 1kb، ستون ۲: ژنوم استخراج شده ۳: کنترل منفی. (C): باکتری های top10 نو ترکیب حاوی T/A(gad+) وکتور رشد کرده بر روی پلیت LB حاوی آمپی سیلین. (D): نتایج کلنی PCR حاصل از کلنی تصادفی با استفاده از پرایمر های اختصاصی ژن GAD و وکتور pJET1.2. ستون ۱: DNA Leader 1kb، ستون ۲: کلنی PCR با استفاده از پرایمر های GAD. ستون ۳: کلنی PCR با استفاده از پرایمر های وکتور.



شکل ۲. (A): ستون ۱: DNA leader 1kb، ستون ۲: ناقل T وکتور حاوی ژن گلوتامات دیکربوکسیلاز. ستون ۳ و ۴: به ترتیب هضم تک آنزیمی ناقل T وکتور حاوی ژن گلوتامات دیکربوکسیلاز با EcoRI و BamHI. ستون ۵: هضم ۲ آنزیمی ناقل T وکتور حاوی ژن. (B): ستون ۱: DNA Leader 1kb، ستون ۲: ناقل بیانی pET-32a(+). ستون ۳: هضم ۲ آنزیمی ناقل بیانی pET-32a(+) با آنزیم های EcoRI و BamHI. ستون ۴: ناقل بیانی pET-32a(+) حاوی ژن گلوتامات دیکربوکسیلاز. ستون ۵: هضم ۲ آنزیمی، pET-32a(gad+) با آنزیم های EcoRI و BamHI. (C): تأیید حضور قطعه در ناقل بیانی، نتایج کلنی PCR از کلنی های pet32a(gad+) رشد کرده بر روی پلیت LB حاوی آمپی سیلین. ستون ۱، ۲، ۳: نتایج کلنی PCR از ۳ کلنی متفاوت BL21 ترانسفورم شده با ناقل pET32-(a) نو ترکیب حاوی ژن گلوتامات دیکربوکسیلاز. ستون ۴: کنترل منفی. ستون ۵: DNA Ladder 1kb. (D): نتیجه آنالیز SDS-Page. ستون ۱، نشانگر پروتئین. ستون ۲، آنزیم بیان شده در سویه نو ترکیب BL21. ستون ۳، عدم بیان آنزیم در سویه غیر نو ترکیب BL21.

بحث و نتیجه گیری

بیان آن بررسی شد. سویه نو ترکیب به دست آمده توانایی رشد و تولید خوبی داشت و برای استفاده در صنعت غذا و داروسازی بسیار کارآمد می باشد. در سال ۱۹۹۱، GAD انسانی از کروموزوم ۱۰ جداسازی شد (۳۱). در سال ۱۹۹۷، ژن گلوتامات دیکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس برویس جداسازی و ویژگی های آن

مهمترین یافته این تحقیق همساز سازی ژن گلوتامات دیکربوکسیلاز از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTC1058 است. در این پروژه برای نخستین بار ژن کدکننده آنزیم گلوتامات دیکربوکسیلاز از سوش لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 شناسایی، توالی یابی، همساز سازی شد و وکتور بیانی آن ساخته و

لاکتوباسیلوس ساکنی B2-16، بیان و مشاهده شد که لاکتوباسیلوس ساکنی B2-16 نو ترکیب ۳۵/۱-۴۲/۱ برابر افزایش تولید گابا را نشان داد (۳۶). این آنزیم می تواند در اختیار محققین جهت استخراج و خالص سازی آنزیم و تعیین خصوصیات آن و بهینه سازی بیان آنزیم و استفاده از تکنیک آنزیم تثبیت شده برای تبدیل مستقیم گلوتامات به گابا برای تولید آن در مقیاس بالا در صنعت قرار گیرد، زیرا استفاده از آنزیم نسبت به سلول کامل دارای مزیت هایی است که عبارت اند از: ۱- اختصاصی بودن واکنش های آنزیمی که مانع از تولید محصولات جانبی ناخواسته می گردد. ۲- آنزیم ها قابل تجزیه بوده و بنابراین آلودگی های محیطی کمتری را ایجاد می کنند. ۳- آنزیم ها می توانند در شرایطی از قبیل pH خنثی، دمای پایین و فشار اتمسفری نرمال فعالیت کنند و بنابراین باعث ذخیره انرژی می گردند، که این قابلیت ها در مقیاس صنعتی بسیار حائز اهمیت است. در مطالعه حاضر همسانه سازی ژن گلوتامات دکربوکسیلاز از لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱۰۵۸ برای اولین بار انجام شد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه اصفهان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

بررسی شد (۲۴). در سال ۱۹۹۹ این ژن از لاکتوکوکوس لاکتیس جداسازی، همسانه سازی و توالی یابی شد (۲۷). در سال ۲۰۰۶ ژن *gad* مربوط به باکتری لاکتوباسیلوس برویس OPK-3 در شاتل وکتور بنام pLip، همسانه سازی شد که فعالیت آنزیم بیان شده در سویه نو ترکیب به مراتب بالاتر از فعالیت آن در باسیلوس سوبتیلیس بود (۲۸). در سال ۲۰۰۷ بعد از جداسازی تعدادی باکتری های اسیدلاکتیک از پنیر ایتالیایی ناحیه مرکزی ژن *gad* از این سویه ها جداسازی شد (۱۱). ژن *gad* از لاکتوباسیلوس برویس BH2 جداسازی، همسانه سازی شده و ویژگی های آن بررسی شد (۳۲). در سال ۲۰۰۷، ژن *gad* از لاکتوباسیلوس برویس OPK3 جداسازی شده و ویژگی های آن بررسی شد (۲۶).

در سال ۲۰۰۸ همسانه سازی ژن *gad* و تعیین خصوصیات آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز باکتری لاکتوباسیلوس پاراکازئی NFRI7415 انجام شد (۳۳). در سال ۲۰۰۸ همسانه سازی و بررسی توالی ژن *gad* باکتری لاکتوباسیلوس برویس IFO12005 انجام شد (۹). در سال ۲۰۰۹، GAD از استرپتوکوکوس ترموفیلوس Y2 همسانه سازی شده و بیان آن بررسی شد (۱۰). ژن *gad* همچنین از باکتری های لاکتوباسیلوس دلبروکی و روتری (۹) کازئی (۳۴ و ۳۵) نیز همسانه سازی شده است. در یک مورد نیز این ژن از لاکتوباسیلوس پلانتاروم (*ATCC1497*) جدا شده و در شاتل وکتور بیانی (اکلای- لاکتوباسیلوس) (*PTRKH2*)، همسانه سازی و محصول (*PTRKH2GAD*)، در

Cloning and Expression Vector Construction of Glutamate Decarboxylase Gene from *Lactobacillus Plantarum*

B. Arabpour (MSc)¹, A. Esmaili (PhD)^{*2}, M. Rabbani (PhD)²

1. Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(6); Jun 2016; PP: 66-72

Received: Mar 2th 2016, Revised: Nov 6th 2015, Accepted: Jan 6th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a four-carbon non-protein amino acid used in the treatment of hypertension, diabetes, inflammation, and depression. GABA is synthesized by glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme in many organisms, including bacteria. Therefore, cloning of this enzyme is essential to the optimization of GABA production. This study aimed to clone and construct the expression vector of GAD gene from *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 bacterium.

METHODS: In this experimental study, we investigated the morphological, biochemical, genetic and 16s rDNA sequencing of *L. plantarum* PTCC 1058 strain. Genomic DNA of the bacterium was isolated and amplified using the GAD gene via polymerase chain reaction (PCR). Afterwards, the gene was inserted into the pJET1.2/blunt cloning vector and subcloned in vector pET32a. Plasmid pET32a-gad expression vector was transformed in *Escherichia coli* BL21 strain, and protein expression was assessed using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

FINDINGS: Morphological, biochemical and genetic analyses of 16s rDNA sequencing indicated that the studied substrain was of the *L. plantarum* strain. In addition, results of nucleotide sequencing of the fragmented segment via PCR showed the presence of GAD gene. Results of colony PCR and SDS-PAGE analysis confirmed the accuracy of the cloning and gene expression of the recombinant *Escherichia coli* BL21 strain.

CONCLUSION: According to the results of this study, cloning of GAD gene from *L. plantarum* PTCC 1058 was successful. These cloned genes could grow rapidly in prokaryotic and eukaryotic systems and be used in cost-effective culture media and even non-recyclable waste.

KEY WORDS: Cloning, Gamma-aminobutyric acid, Glutamate acid decarboxylase, *Lactobacillus plantarum*.

Please cite this article as follows:

Arabpour B, Esmaili A, Rabbani M. Cloning and Expression Vector Construction of Glutamate Decarboxylase Gene from *Lactobacillus Plantarum*. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(6):66-72.

* Corresponding author: A. Esmaili (PhD)

Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R.Iran

Tel: +98 31 37932490

E-mail: aesmaeili@sci.ui.ac.ir

References

1. Esmaeili A, Rabbani M B, Kheiri A. Cloning of glutamate decarboxylase and production of γ -aminobutyric acid from *Lactobacillus brevis*. *Res Pharma Sci*. 2012;7(5): 421.
2. Esmaeili A. Receptor subunits in rat testis and sperm. *Int J Fertili and Steril*. 2008;2(3):121-4.
3. Zaker SR, Esmaeili A, Bouzari M, Shirani E. Quantitative analysis of GABAA Gamma receptor subunits in the developing embryonic chick forebrain. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15(5):1097-1101.
4. Huang J, Mei L, Sheng Q, Yao S, Lin D. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 Isolated from fresh milk. *Chin J Chem Engin*. 2007;15(2):157-61.
5. Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT. Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Intern J Food Microbiol*. 2009;130(1):12-6.
6. Li H, Cao Y. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids*. 2010;39(5):1107-16.
7. Lu X, Chen Z, Gu Z, Han Y. Isolation of γ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium. *Biochem Engin J*. 2008;41(1):48-52.
8. Mazur R, Kovalovská K, Hudec J. Changes in selectivity of gamma-aminobutyric acid formation effected by fermentation conditions and microorganisms resources. *J Microbiol, Biotechnol Food Sci*. 2011;1(2):164-71.
9. Hiraga K, Ueno Y, Oda K. Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: activation by ammonium sulfate. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72(5):1299-306.
10. Lin Q, Yang S, Lü F, Lu Z, Bie X, Jiao Y, et al. Cloning and expression of glutamate decarboxylase gene from *Streptococcus thermophilus* Y2. *J Gen App Microbiol*. 2009;55(4):305-10.
11. Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello C, Coda R, Gobbetti M. Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *App Environment microbiol*. 2007;73(22):7283-90.
12. Esmaeili A, Lynch JW, Sah P. GABAA receptors containing gamma1 subunits contribute to inhibitory transmission in the central amygdala. *J Neurophysiol*. 2009;101(1):341-9.
13. Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *J Japan Soc Food Sci Technol*. 2000;47(8):596-603.
14. Oh SH, Soh JR, Cha YS. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J Med Food*. 2003;6(2):115-21.
15. Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H, Yamori Y. Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Bri J Nutr*. 2004;92(03):411-7.
16. Kelley JM, Hughes LB, Bridges SL. Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis?. *J Neuroinflammation*. 2008;5:1.
17. Oh SH, Oh CH. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci Biotechnol*. 2003;12(3):248-52.
18. Taneera J, Jin Z, Jin Y, Muhammed S, Zhang E, Lang S, et al. γ -Aminobutyric acid (GABA) signalling in human pancreatic islets is altered in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(7):1985-94.
19. Wu TY, Tsai CC, Hwang YT, Chiu TH. Effect of antioxidant activity and functional properties of chingshey purple sweet potato fermented milk by *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, and *L. gasserii* Strains. *J Food Sci*. 2012;77(1):2-8.
20. Parvez S, Malik K, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J App Microbiol*. 2006;100(6):1171-85.
21. Esmaeili A, Ghaedi K. GABAA receptors as novel drug targets for treatment of mental disorders. *J Paramed Sci*. 2010;1(3):50-61.
22. Taherzadeh M, Esmaeli A, Rabbani M. Gamma Aminobutyric Acid (GABA) Production Using Acid Lactic Bacteria. *J Babol Univ Med Sci*. 2014;16(8):46-56. [In Persian]
23. Komatsuzaki N, Nakamura T, Kimura T, Shima J. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72(2):278-85.

24. Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, Oda K. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61(7):1168-71.
25. Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands JR, Venema G, Kok J. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecul Microbiol*. 1998;27(2):299-310.
26. Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour Technol*. 2007;98(2):312-9.
27. Nomura M, Nakajima I, Fujita Y, Kobayashi M, Kimoto H, Suzuki I, et al. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*. 1999;145(6):1375-80.
28. Park KB, Oh SH. Enhancement of γ -aminobutyric acid production in *Chungkukjang* by applying a *Bacillus subtilis* strain expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett*. 2006;28(18):1459-63.
29. Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, et al. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med*. 2005;11(9):973-81.
30. Vedula LS, Brannigan G, Economou NJ, Xi J, Hall MA, Liu R, et al. A unitary anesthetic binding site at high resolution. *J Biol Chem*. 2009;284(36):24176-84.
31. Karlsen AE, Hagopian WA, Grubin CE, Dube S, Disteché CM, Adler DA, et al. Cloning and primary structure of a human islet isoform of glutamic acid decarboxylase from chromosome 10. *Proc Nat Acad Sci*. 1991;88(19):8337-41.
32. Huang J, Mei LH, Wu H, Lin DQ. Biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2007;23(6):865-71.
33. Komatsuzaki N, Nakamura T, Kimura T, Shima J. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72(2):278-85.
34. Taherzadeh M, Esmaeili A, Rabbani M. Molecular gene cloning and sequencing of glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus reuteri*. *J Paramed Sci*. 2015;6(4):40-6.
35. Tavakoli Y, Esmaeili A, Rabbani M. Identification and molecular cloning of glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus casei*. *Molecul Biol Res Commun*. 2015;4(3):161-5.
36. Kook MC, Seo MJ, Cheigh CI, Lee SJ, Pyun YR, Park H. Enhancement of γ -amminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J Korean Soc App Bio Chem*. 2010;53(6):816-20.