

جدا نمودن ژن تنظیمی استرپتومایسین فاقد پروموتور [StrR2] از استرپتومایسین گریزئوس

زهره حجتی، مجید متولی باشی، غلامرضا بید خوری

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از PCR برای شناسایی و جدا نمودن ژن‌ها یک روش نسبتاً سریع و دقیق می‌باشد. نکته قابل‌تأمل در این تکنیک هدفمند طراحی نمودن پرایمرهای مورد استفاده می‌باشد. پرایمرها طوری طراحی می‌شوند که نه تنها ویژگی‌های ژنوم در نظر گرفته شود، بلکه کلونینگ ژن نیز منظور و یا به عبارت دیگر تسهیل گردد. آنتی بیوتیک استرپتومایسین توسط استرپتومایسین گریزئوس با به کار بردن دسته ژنی Str با بیش از ۲۵ ژن تولید می‌شود. این دسته ژنی دارای ژن StrR است که پروتئین تنظیم کننده اختصاصی این دسته ژنی را کد می‌نماید. هدف از این تحقیق جدا نمودن ژن StrR2 بدون پروموتور آن و سپس کلونینگ آن بود.

مواد و روش‌ها: جهت جدا نمودن ژن StrR بدون پروموتور ذاتی خود، StrR2 فاقد پروموتور آغازگرهای مختلفی طراحی گردید. یک جفت از این آغازگرها (St Nes)، ژن StrR را در ژنوم شناسایی کرد و همچنین Nested-PCR برای شناسایی ژن StrR2 تکثیر شده نیز به کار رفت. در سایر آغازگرها (Str nP1 و Str nP2) جایگاه‌های BamHI و XbaI طراحی شد، این آغازگرها نه تنها ژن StrR2 را تکثیر کردند، بلکه جایگاه‌های برش آنزیمی در قطعات تکثیر شده را نیز ایجاد کردند.

یافته‌ها: ژن StrR2 فاقد پروموتور با استفاده از PCR تکثیر گردید و ساختار آن مورد تایید قرار گرفت. کلونینگ این ژن به طور موفقیت آمیز صورت گرفت. سپس ساختار پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از روش‌های مختلف چون الکتروفورز، PCR و هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت.

استنتاج: با استفاده از این وکتور می‌توان ژن StrR2 فاقد پروموتور را در وکتورهای ویژه استرپتومایسین که واجد پروموتورهای القایی هستند ساب کلون نمود.

واژه‌های کلیدی: استرپتومایسین، ژن StrR2 فاقد پروموتور، استرپتومایسین گریزئوس

مقدمه

استفاده می‌باشد. پرایمرها طوری طراحی می‌شوند که نه تنها ویژگی‌های ژنوم در نظر گرفته شود، بلکه کلونینگ ژن نیز منظور و یا به عبارت دیگر تسهیل گردد.

استفاده از PCR برای شناسایی و جدا نمودن ژن‌ها یک روش نسبتاً سریع و دقیق می‌باشد. نکته قابل‌تأمل در این تکنیک هدفمند طراحی نمودن پرایمرهای مورد

مواد و روش ها

استرپتومایسز جنسی از باکتری های رشته ای گرم مثبت است که ژنوم آن دارای GC بالا در حدود ۶۹ تا ۷۳ مول درصد می باشد (۱). استرپتومایسز یک جنس بسیار بزرگ با ۵۰۰ گونه متعلق به خانواده استرپتومایستاسه است (۲). حدود دو سوم کل آنتی بیوتیک های طبیعی توسط استرپتومایسزها تولید می شود (۳). همچنین تولید آنتی بیوتیک های نو ترکیب توسط این گونه ها نیز رو به افزایش می باشد (۴).

استرپتومایسز گریزئوس (*Streptomyces griseus*) یکی از گونه های جنس استرپتومایسز است که به علت تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین (۱۱)، تشکیل اسپور در محیط مایع با محدودیت غذایی و فقر فسفاتی (۵) و تولید یک هورمون میکروبی به نام فاکتور A، گونه منحصر به فرد این جنس است (۶، ۷). کندیسیدین، نوبیوسین، سیکلو هگزامید و کرومومایسین A از جمله سایر آنتی بیوتیک های هستند که توسط استرپتومایسز گریزئوس تولید می شود (۸) و خانواده ۱۹ کتینازها نیز ابتدا در این گونه کشف شد (۹).

دسته ژنی سنتز کننده استرپتومایسین بیش از ۲۵ ژن برای اعمال بیوسنتز، تنظیم، مقاومت و انتقال در *Streptomyces griseus* N2-3-11 دارد (۱۰-۱۲). ژن StrR با اندازه ۱۰۵۲ bp یکی از ژن های دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. محصول این ژن پروتئین تنظیمی StrR است که اکثر اپرون های مسئول بیوسنتز آنتی بیوتیک استرپتومایسین را تنظیم و کنترل می نماید (۱۳، ۱۶-۱۴).

افزایش در میزان تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین با استفاده از استرپتومایسز ترانس ژنیک هدف نهایی این تحقیق بود. در این استرپتومایسزهای ترانس ژنیک StrR را می توان در کنترل یک پروموتور قابل تنظیم قرار داد. بدین منظور می بایست این ژن بدون پروموتور جدا و کلون گردد.

سویه های باکتری، نگهداری آن ها و حامل کلون کردن: از سویه های باکتریایی استاندارد استرپتومایسز گریزئوس از UMIST انگلستان و استرپتومایسز گریزئوس PTCC 1127 استفاده شد که از مرکز پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شده بود. از دو سوش *Escherichia coli* XL1Blue و *Escherichia coli* DH5 α در این تحقیق استفاده شد که از شرکت سیناژن ایران تهیه گردیدند. محیط های کشت (Yeast Extract-Malt Extract) YEME و (Manitol - Soya Agar) MSA برای کشت استرپتومایسز به کار رفت، که عصاره مخمر از شرکت Difco آلمان، باکتریوتون از شرکت Difco آلمان و عصاره مالت از شرکت Oxoid آلمان تهیه گردید (۱۷). محیط های کشت (Luria-Bertani) LB و (Luria-Bertani) LBA و (Luria-Bertani Agar) برای کشت باکتری *E. coli* و همچنین آماده سازی آن برای ترانسفورماسیون استفاده شد (۵). جهت تهیه اسپورهای منجمد، ابتدا استرپتومایسز بر روی محیط MSA کشت داده شد و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ تا ۷ روز انکوباسیون صورت گرفت. سپس اسپورها با استفاده از لوپ استریل و در مجاورت آب جمع آوری و پس از عبور از لوله مخصوص طراحی شده جهت صاف نمودن اسپورها از بقایای مایسلیم ها، سانتریفیوژ شده و در ۲۰ درصد گلیسرول در درجه حرارت ۲۰- به صورت دائمی نگه داری شدند (۱۸).

به منظور ترانسفورماسیون ژن مورد نظر در باکتری *E. coli* به یک حامل نیاز بود، در این تحقیق از حامل فاژمیدی استاندارد به نام pBluescript استفاده شد که از سیناژن در ایران تهیه گردید.

استخراج DNA/استرپتومایسز گریزئوس:

برای استخراج DNA از روش CTAB با تغییراتی

Forward و جایگاه برش XbaI در آغازگر Reverse Fermentas طراحی گردید، این دو آنزیم از شرکت انگلستان خریداری شدند. این ست آغازگر، ژن StrR بدون پروموتور را از ژنوم جدا می‌نماید. یک جفت آغازگر اختصاصی برای تایید صحیح بودن توالی تکثیر شده توسط آغازگرهای اصلی در درون آن طراحی گردید که این جفت آغازگر، آغازگر نستند (Nested-Primer) نام گذاری شد. مشخصات آغازگرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. این پرایمرها توسط شرکت TIB-MOLBIOL آلمان ساخته شدند.

PCR:

تکثیر DNA با استفاده از آنزیم Pfu پلیمرز (تهیه شده از سیناژن در ایران) و آغازگرهای اختصاصی اصلی و نمونه DNA استخراج شده بر اساس جدول شماره ۲ با برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر (دستگاه PCR از شرکت Eppendorf آلمان تهیه شد)، طبق برنامه زیر که پس از بهینه‌سازی‌های متعدد به دست آمد صورت گرفت: دمای دناتوره اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۲۵ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای چسبیدن ۶۲ درجه سانتیگراد برای هر دو جفت آغازگرهای اصلی یعنی Str nP1 و Str nP2 به مدت ۳۰ ثانیه و برای آغازگر نستند یعنی Str Nes دمای چسبیدن ۶۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی شدند.

استفاده شد (۱۸). پس از رشد استرپتومایسز باکتری در محیط کشت (ساکاروز ۳۴ درصد + YEME)، به علت بالا بودن ترکیبات قندی محیط کشت YEME، ابتدا چند بار توده سلولی مایسمیومی با آب مقطر استریل شستشوداده شد و سپس مایسلیمومها توسط سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جمع‌آوری گردید و سایر مراحل طبق روش ذکر شده صورت گرفت (۱۸). در انتها از RNase استفاده شد تا DNA استخراج شده عاری از هر گونه RNA گردد.

آغازگرها (Primers):

هدف اصلی در این تحقیق جدا نمودن ژن از پروموتور خود است، بنابراین محصول می‌بایست فاقد پروموتور باشد. از آنجائی که استرپتومایسز یک میکروارگانیزم با درصد GC بالا می‌باشد بنابراین این محتوای GC ناحیه پروموتور با درون ژن و همچنین ناحیه قرار گرفته بین ژن‌ها بسیار متفاوت است، لذا حتی طراحی یک ست مناسب آغازگر با در نظر گرفتن دمای چسبیدن و سایر ویژگی‌های آغازگرها به سختی صورت گرفت. به همین دلیل برای افزایش ضریب اطمینان از عملکرد آغازگرها، دو ست مختلف طراحی شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار OLIGO (Version 5, W. Rychlik) صورت گرفت. در این تحقیق با توجه به این که هدف کلون کردن ژن StrR بدون حضور پروموتور خودش در یک حامل بود، با در نظر گرفتن خصوصیات ژن StrR و ویژگی‌های حامل، دو جفت آغازگر اختصاصی با جایگاه‌های برش برای دو آنزیم محدودالایر BamHI و XbaI در دو انتهای قطعه ژن مورد نظر طراحی شد که به عنوان آغازگرهای اصلی در نظر گرفته شدند. جایگاه برش BamHI در آغازگر

جدول شماره ۱: آغازگرها و مشخصات آن‌ها

نام آغازگر	توالی آغازگر	کاربرد و اندازه قطعه
Str Nes	F 5' CCC CGA GCA AGT CCG TGA GA3' R 5' CGA TGC CGG CCT GGT CCA GTT3'	StrR برای شناسایی قطعه ژن (نستد آغازگر) ۹۹۲bp
Str nP1 Main	F 5' GCC CGG ATC CCC GGG TGC TAC TAT TC 3' R 5' GGT CTA GAG CCG ACG CTC CTC AAC T 3'	برای تکثیر قطعه ژن StrR فاقد پروموتور با جایگاه‌های برش آنزیمی XbaI و BamHI ۱۱۱۸bp
Str nP2 Main	F 5' GAT CTA GAG GTG CTA CTA TCC GCG3' R 5' GGC GGA TCC TCC TCA ACT CCG TCG3'	برای همانندسازی قطعه ژن StrR با جایگاه‌های برش آنزیمی ۱۱۲۱bp

جدول شماره ۲: مواد و مقدار مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۵۰

میکرولیتری		غلظت	حجم	نوع ترکیب
Template DNA	Chromosomal DNA	۵۰ ng	۱ μl	
	Plasmid	۲ ng	۱ μl	
Upstream primer		۲۰ ng	۱ μl	
Downstream primer		۲۰ ng	۱ μl	
dNTP Mix		۱۰ ng	۲ μl	
DMSO		-	۴ μl	
10 x PCR buffer with MgSO ₄	۰.۲۰۰mM Tris-HCl, ۰.۱۰۰mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , ۰.۱۰۰mM KCl		۲ μl	
	۱٪ Triton X-۱۰۰, ۱mg/ml BSA, ۰.۲۰mM MgSO ₄			
Pfu polymerase		۲/۵ u/μl	۰.۳ μl	
deionised dH ₂ O		-	۵۰ μl	تا

هضم آنزیمی با آنزیم محدود الاثر:

هضم آنزیمی با آنزیم های محدود الاثر بدین صورت انجام شد که به یک میکروتیوپ ۵ میکروگرم از نمونه DNA (محصول PCR یا پلاسمید) به همراه ۵ تا ۱۰ واحد از آنزیم ها (از هر آنزیم ۰/۵ میکرولیتر) اضافه گردید و حجم کلی با بافر 1X به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. میکروتیوپ حاوی مخلوط واکنش به مدت ۱ تا ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد بن ماری قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل گردد. محصولات هضم آنزیمی توسط الکتروفورز بررسی گردید (۱۹).

تکنیک Ligation:

به یک میکروتیوپ ۵ تا ۱۰ میکرولیتر (۵۰ تا ۴۰۰ نانوگرم) از نمونه DNA برش یافته (قطعات DNA محصول PCR و پلاسمید) با آنزیم های محدود الاثر به همراه ۱ تا ۵ واحد از آنزیم T4 DNA Ligase (یک میکرولیتر آنزیم) و ۲ میکرولیتر از بافر 10X اضافه گردید و حجم نهایی با آب دو بار تقطیر استریل یا بافر TE به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. آنزیم لیگاز از شرکت MBI Fermentas در انگلستان خریداری شد. سپس میکروتیوپ در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت قرار داده شد تا عمل چسباندن قطعات DNA توسط آنزیم لیگاز کامل شود.

ترانسفورماسیون پلاسمید:

برای ترانسفورماسیون باکتری *E.coli* ابتدا سلول های مستعد به روش کلرید کلسیم با محلول 20mM CaCl₂-80mM MgCl₂ تهیه شد و سپس مراحل انجام ترانسفورماسیون پلاسمید به صورت زیر صورت گرفت: ابتدا ۵۰ نانوگرم پلاسمید pBluescript به ۳۰۰ میکرولیتر از سلول های مستعد *E.coli* اضافه شد، بلافاصله مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ گذاشته شد و سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به آن شوک گرمایی داده شد. مخلوط حاصل ابتدا به ۲ میلی لیتر محیط LB منتقل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. سپس در محیط جامد LBA حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت شد و در دمای ۳۷ سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (۱۹).

استخراج پلاسمید:

استخراج پلاسمید در این تحقیق با روش جوشاندن هولمس- کویجلی از باکتری های ترانسفورم شده صورت گرفت (۲۰).

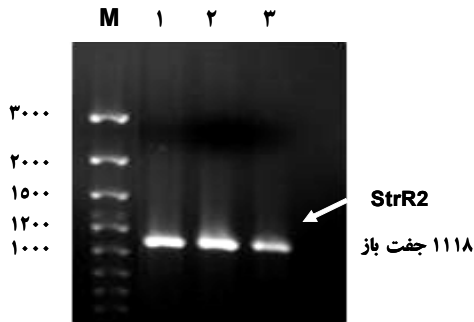
یافته ها

با توجه به غنی بودن ژنوم استرپتومایسسز گریزنوس از لحاظ GC بهینه سازی PCR با صرف زمان طولانی انجام شد (با استفاده از پرایمرهای Str nP1 و Str nP2). نتایج و محصولات حاصل از PCR بهینه شده پس از الکتروفورز با ژل ۰/۷ درصد آگاروز در تصویر شماره ۱ مشاهده می شود. اندازه ژن StrR2 تکثیر شده ۱۱۱۸ جفت باز می باشد.

برای اینکه ثابت شود ژن فاقد پروموتور به درستی با PCR شناسایی و جداسازی شده است، دو روش مختلف به کار گرفته شد. اولین روش این بود که محصولات حاصل از PCR ژن StrR2 با آغازگرهای اختصاصی (Str nP1) با استفاده از یک جفت آغازگر داخلی (StNes) دوباره PCR کردند (Nested-PCR).

الکتروفورز با ژل ۲ درصد آگاروز در تصویر شماره ۳ مشاهده می شود.

محصول PCR و حامل pBluescript به طور جداگانه



تصویر شماره ۱: تکثیر ژن strR2 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (RB2). I. محصول PCR ژن StrR با استفاده از آغازگرهای StrR2. II. محصول PCR ژن StrR با استفاده از آغازگرهای StrR3. III. کنترل منفی. M. مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA

نتایج نستد PCR تکثیر ژن strR را تایید نمود. دومین روش، هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن StrR2 فاقد پروموتور با آغازگرهای اختصاصی (Str nP1) با یک آنزیم محدود الاثر بود. برای هضم آنزیمی ژن StrR2 فاقد پروموتور از آنزیم محدود الاثر AluI استفاده شد. بر اساس Restriction map تهیه شده از این ژن، آنزیم AluI محصول PCR یا ژن StrR2 را در دو محل یعنی ۵۹۷ و ۹۶۹ برش می دهد و سه قطعه در اندازه های ۳۷۲، ۵۹۷ و ۱۴۷ جفت باز ایجاد می کند. آنزیم دیگری به نام BglIII نیز برای هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن StrR2 به کار گرفته شد که این آنزیم، ژن را برش نمی دهد (تصویر شماره ۲). نتایج حاصل از هضم آنزیمی ژن StrR2 فاقد پروموتور با آنزیم های محدود الاثر AluI و BglIII پس از

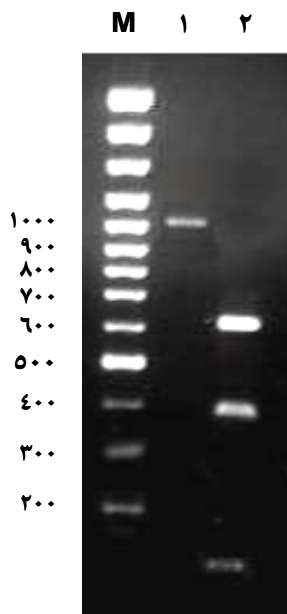
کدان شروع

```

cg t c a t c g a c g g a t g c a c c g a c t g c g c g c c a c c a a a t g c g c g g a g c c a c c g a g a t c g c c g t g c g g t a t t t c g a a g g c g
340 360 380 400
g a g a g g a a g a g g c g t t c a t c t t c g c g g t g a a g t c c a a c g t c a c c c a c g g a c t g c c g c t c t c c c t c g a c g a c c g c a a g g c c
420 440 460 480
g c g g c g a c c c g t g t c c t g g a g a c c c a t c c g t c c t g g t c c g a c c g g c c a t c g g c c t g g c g a c c g g a c t g t c g g c g a a g a c
500 520 540 560
g g t g g g g a c c c t c a g g t c c t g t t c g a c t g c c g g g t t c g c a g t c g a a c g t g a g g a t c g g g a g g g a c g g g c g g g c c g g c
580 600 620 640
c g c t g g a c c c a c c g a g g g c g g a a g c t g g c g a g c c g g c t g c t c c a g g a g a a c c c c t c g g c g t c g t g c g t c a g a t c g c c
660 680 700 720
g c a c a g g c c g g c g t c t c c c g a g c a c c g c t c c g a c g t c c g c a a g c g g t g a g c c g t g g t g a g a g c c c g t g c c g a a c g
740 760 780 800
c g a t c g t c a a c a g g a a g t g c c g g c c g t c g c c c g g a c t c c g g c c g t g t c t c c c g g g c c g a c g g g a g t t g g g c g c g c a c a
820 840 860 880
c c g t g g c g t g c g c c a c c t c a g c c g g g a c c c g t c c g t g c g g c t c a c c g a g g a c g g t c g g g c g t g c t a c g t t g g c t g a a c
900 920 940 960
g t g g t g g c g t g c g c a a c c a g g a c t g g g a c c g c t c c t g g g c a a c g t c c t c c g c a c t g c g t c a a g g t c a t a g c c g a g c t
980 1000 1020 1040
g g c c c g g g c t g t g c c g a c a t c t g g c a t c g g t g g c g g a g g a a c t g g a c c a g g c c g g c a t c g a c g a g g c g g c g g g c c g g t
1060 1080 1100 1120
g g c c c g g g c t g t g c c g a c a t c t g g c a t c g g t g g c g g a g g a a c t g g a c c a g g c c g g c a t c g a c g a g g c g g c g g g c c g g t

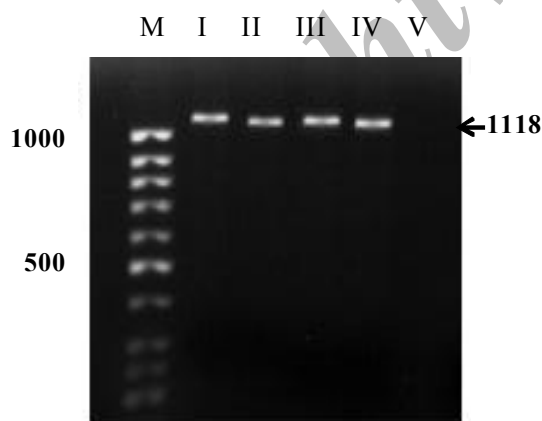
```

شکل شماره ۲: ترادف نوکلئوتیدی ژن StrR2 فاقد پروموتور و ترسیم restriction map آن موقعیت کدان شروع در اینجا مشخص شده است. محل برش آنزیم AluI بر روی ترادف به صورت مستطیل متصل به اسم آنزیم نشان داده شده است. این آنزیم ژن StrR2 فاقد پروموتور را در دو ناحیه، ۵۶۸ و ۹۵۸ برش می دهد.



تصویر شماره ۳: تایید ژن StrR2 استخراج شده توسط RFLP-PCR و هضم با آنزیم محدود الاثر AluI. M. مارکر (100 bp DNA ladder)، اندازه‌های مارکر بر اساس جفت باز آورده شده است.

۱. آنزیم BglIII ژن StrR2 فاقد پروموتور را برش نمی‌دهد.
 ۲. آنزیم AluI ژن StrR2 فاقد پروموتور را در دو ناحیه ۵۸۶ و ۹۵۸ برش می‌دهد و سه قطعه به اندازه‌های ۱۴۸، ۳۷۲ و ۵۹۷ جفت باز را ایجاد می‌نماید.



تصویر شماره ۴: تایید کلونینگ ژن StrR فاقد پروموتور در *E. coli* با استفاده از روش Colony-PCR. M. مارکر (50 bp DNA ladder)، اندازه‌های مارکر بر اساس جفت باز آورده شده است.

۱. تکثیر ژن StrR از ژنوم استرپتومایسز گریژئوس PTCC 1127 به عنوان کنترل مثبت، II-IV. تکثیر ژن StrR از کلونی‌های مختلف ترانسفورم شده *E. coli* واجد پلاسمید نوترکیب pSNstrR. V. عدم تکثیر ژن StrR از کلونی‌های *E. coli* ترانسفورم نشده.

تحت هضم آنزیمی با دو آنزیم محدود الاثر BamHI و XbaI برای کلون کردن ژن مورد نظر قرار گرفتند پس از خالص‌سازی نمونه‌های حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای pBluescript و محصول PCR، عمل چسباندن قطعات DNA توسط آنزیم لیگاز در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انجام شد و در نتیجه این عمل پلاسمید جدید با نام pGBstrR ساخته شد که انتظار می‌رود اندازه آن حدود ۴ کیلو باز باشد. سپس ترانسفورماسیون پلاسمید جدید pFDstrR به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* انجام شد و در محیط‌های جامد LBA حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی سیلین به منظور جداسازی انتخابی کلنی باکتری‌های ترانسفورم یافته کشت داده شد. روش Colony-PCR برای تعدادی از کلونی‌های ترانسفورم شده مورد استفاده قرار گرفت و وجود ژن StrR 2 فاقد پروموتور در آن‌ها تایید گردید (تصویر شماره ۴). استخراج پلاسمید pFDstrR از باکتری‌های *E. coli* ترانسفورم شده با روش جوشاندن هولمس-کوچلی صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید pFDstrR، ساختار پلاسمیدهای pFDstrR مجدداً با استفاده الکتروفورز و PCR و همچنین هضم آنزیمی با دو آنزیم محدود الاثر BamHI و XbaI تایید شد.

بحث

بررسی‌های مختلف نشان داده است که افزایش بیان ژن‌های تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند بیان یا تولید آنتی بیوتیک مربوط به آن را نیز افزایش دهد. برای مثال نشان داده شده است که وارد کردن ژن تنظیمی *cdaR* با استفاده از یک وکتور بیانی داخل *Streptomyces coelicolor* و همچنین *Streptomyces lividans* تولید آنتی بیوتیک CDA را در هر دو به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد. *cdaR* تنظیم کننده دسته ژنی تولید کننده آنتی بیوتیک CDA می‌باشد (۲۰). Perez-Llarena و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که تکثیر ژن *ccaR* در *S. clavuligerus*

ژن StrR را شناسایی و به میزان زیادی تکثیر و خالص نماییم. از طرف دیگر با توجه به این که وکتورهای بیان کننده، خود واجد پروموتور قابل تنظیم می باشند، بنابراین با کلون نمودن ژن StrR فاقد پروموتور ذاتی خودش، می توان بیان آن را به طور کامل تحت کنترل در آورد. در این مقاله ژن StrR بدون پروموتور به نام "StrR2 فاقد پروموتور" نامگذاری گردید. این ژن از استرپتومایسز گریزئوس جدا شد و ساختار صحیح آن توسط نستد PCR و هضم آنزیمی با آنزیم محدودالایتر محصولات مورد تایید قرار گرفت. به دلیل محدودیت در جایگاه کلون کردن چندگانه یا MCS و آنزیم های محدودالایتر، حامل ها و پلاسمیدهای اختصاصی استرپتومایسز نمی توان ژن StrR2 را مستقیماً وارد این پلاسمیدها کرد و ابتدا می بایست این ژن را وارد یک پلاسمید چند منظوره با جایگاه کلون کردن چندگانه و آنزیم های محدودالایتر بیشتر نظیر پلاسمید pBluescript وارد کرد. پس از ساختن پلاسمید نوترکیب جدید، ساختار آن با الکتروفورز، PCR و هضم آنزیمی بررسی و تأیید گردید، در نهایت این پلاسمید pSNStrR نام گذاری شد.

در ضمن با توجه به مطالعات اندک در مورد ژن تنظیم کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین (StrR) می توان از ویژگی های خاص پلاسمید pSNStrR برای بررسی و مطالعه دقیق ژن StrR استفاده کرد. چنانچه Hong و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان داده اند که مکانیسم های تنظیمی متعددی برای تولید استرپتومایسین در استرپتومایسز وجود دارد که بسیاری از آن ها شناخته نشده و باید تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد (۲۳). همچنین در دو طرف MCS پلاسمید pSNStrR توالی هایی از پروموتورهای RNA- پلی مرزهایی که از باکتریوفاژهای T3 و T7 مشتق شده اند وجود دارند که نسخه برداری از آن توسط RNA پلی مرزهای این ویروس ها، نسخه هایی از RNA سنس و RNA آنتی سنس ژن StrR به دست می آید. از

منجر به افزایش دو تا سه برابر در تولید سفامایسین C و کلاولانیک اسید می شود (۲۱). این ژن در دسته ژنی بیوسنتزی سفامایسین C قرار گرفته و یک عضو از پروتئین های تنظیمی آنتی بیوتیک استرپتومایسز می باشد. ccaR در حقیقت یک ژن تنظیمی پولیوتروپیک می باشد و در ابتدای مسیر سیگنالینگ تنظیمی کلاولانیک اسید قرار گرفته است و از طریق فعال کردن یک فاکتور رونویسی ناشناخته، بیان claR را کنترل می کند. همچنین از طریق کنترل بیان ژن های درگیر در مراحل اولیه، حد واسط و نهایی بیوسنتز سفامایسین، بیان این آنتی بیوتیک را نیز کنترل می کند (۲۲).

در دسته ژنی بیوسنتز کننده استرپتومایسین بیش از ۲۵ ژن برای اعمال بیوسنتز، تنظیم، مقاومت و انتقال در *Streptomyces griseus* N2-3-11 وجود دارد. برخی از ژن های مهم و مشخص از لحاظ عملکرد دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین و از جمله ژن StrR در سال ۱۹۸۷ توسط دیستلر و همکارانش تعیین توالی شد (۱۰). ژن StrR با اندازه ۱۰۵۲ bp یکی از ژن های دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. ژن StrR پروتئین StrR را کد می نماید که فعال کننده نسخه برداری ویژه مسیر برای تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین می گردد و در نتیجه بیان آن، دسته ژنی استرپتومایسین برای بیوسنتز استرپتومایسین از گلوکز فعال می شود (۱۶-۱۳).

به علت بزرگ بودن دسته ژنی بیوسنتز کننده استرپتومایسین و ناحیه شروع همانندسازی متفاوت، نمی توان آن را در میزبان دیگری به جز استرپتومایسز کلون کرد و در صورت کلون کردن ژن ها ناپایدار خواهند بود، در این تحقیق برای اولین بار ایده استفاده از ژن تنظیم کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین (StrR2) به منظور دستکاری ژنتیکی و بالا بردن تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین در استرپتومایسز گریزئوس مطرح گردید.

با توجه به اهداف مورد نظر، در گام اول می بایست

پروموتور وارد یک حامل القایی اختصاصی استرپتومایسز شد. با توجه به القایی بودن این گونه حاملین و قرار گرفتن پروموتور اختصاصی القا شونده در آن‌ها، استفاده از ژن فاقد پروموتور الزامی است. در انتها، با انتقال این حامل اختصاصی با روش انتقال پروتوپلاسمی به استرپتومایسس گریزنوس می‌توان افزایش میزان تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در شرایط کنترل شده را انتظار داشت. بنابراین در آینده می‌توان از آن برای دستکاری ژنتیکی استرپتومایسس گریزنوس استفاده نمود.

سپاسگزاری

از حمایت‌های مالی معاونت محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان (طرح پژوهشی شماره ۸۳۱۰۲۱) سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

References

- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kiser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(4): 1541-1546.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology*. 5th edition. Mc Graw-Hill Higher Education, 2002.
- Baltz RH. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol* 1998; 6(2): 76-83.
- Hojati Z, Milne C, Harvey B, Gordon L, Borg M, Flett F, et al. Structure, Biosynthetic origin, and Engineered Biosynthesis of Calcium-Dependent Antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol* 2002; 9(11): 1175-1187.
- Kendrick KE, Ensign JC. Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged culture. *J Bacteriol* 1983; 155 (1): 357-366.
- Horinouchi S. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci* 2002; 7: d2045-d2057.
- Horinouchi S, Beppu T. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 377-398.
- Ja G. Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 60(3): 633-642.
- Kawase T, Saito A, Kanai R, Fuji T, Nikaidou N, Miyashita K, et al. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70(2): 1135-1144.
- Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EMH. Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within *Streptomyces* isolated from soil. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(12):

سنس می‌توان مستقیماً برای سنتز پروتئین ژن StrR مطالعه این پروتئین استفاده کرد. از RNA آنتی سنس ژن StrR می‌توان به عنوان شناساگر نسخه‌های ژن StrR در واکنش‌های هیبریداسیون نورترن بلائینگ استفاده نمود. اخیراً مشخص شده است که در داخل سلول جهت کنترل میزان تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، ابتدا تولید StrR افزایش می‌یابد (۱۵). از طرف دیگر مشخص شده است که StrR یک پروتئین فعال‌کننده‌ای است که به چندین جایگاه در DNA می‌تواند متصل شود (۱۳). در ژاپن، Ohnuki و همکاران ژن StrR را به همراه سایر ژن‌های موجود در دسته ژنی تولیدکننده استرپتومایسین به خود استرپتومایسس گریزنوس منتقل کردند و افزایش بیان ژن‌های موجود در این دسته ژنی و همچنین افزایش تولید آنتی‌بیوتیک را مشاهده کردند (۲۴). در این تحقیق با استفاده از پلاسמיד pSNStrR ژن StrR2 فاقد

- 5061-5063.
11. Lezhava A, Kameoka D, Horinouchi S, Kinashi H. Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove the *afsA* locus. *Mol Gen Gene* 1997; 253(4): 478-483.
 12. Ohnishi Y, Yamazaki H, Kato J, Tomono A, Horinouchi S. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69(3): 431-439.
 13. Retzlaff L, Distler J. The regulator of streptomycin gene expression, *strR*, of *Streptomyces griseus* is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol Microbiol* 1995; 18(1): 151-162.
 14. Setsu H, Kato JY, Ohnishi Y, Horinouchi S. Control of the *Streptomyces Subtilisin Inhibitor Gene* by AdpA in the A-Factor Regulatory Cascade in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 2006; 188(17): 6207-6216.
 15. Tomono A, Tsai Y, Yamazaki H, Ohnishi Y, Horinouchi S. Transcriptional Control by A-Factor of *strR*, the Pathway-Specific Transcriptional Activator for Streptomycin Biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 2005; 187(16): 5595-5604.
 16. Vujaklija D, Horinouchi S, Beppu T. Detection of an A-factor-responsive protein that binds to the upstream activation sequence of *strR*, a regulatory gene for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* 1993; 175(9): 2652-2661.
 17. Hopwood DA. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. John Innes Foundation. 1985.
 18. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chatter KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. 1st ed. Norwich: The John Innes Foundation Press, 2000.
 19. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: CSHL Press, 2001.
 20. Hojati Z. Genetic Manipulation of the Biosynthetic Pathway for Production of the Calcium-Dependent Antibiotic in *Streptomyces coelicolorA3* (2). Dissertation. Manchester, UK: UMIST, 2002.
 21. Perez-Llarena FJ, Liaris P, Rodry guez-Garcy A, Martyn JE. A regulatory gene (*ccaR*) required for cephamycin and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: amplification results in over production of both β -lactam compounds. *J Bacteriol* 1997; 179(6): 2053-20590.
 22. Santamarta I, Rodry guez-Garcy A, Prez-Redondo R, Martyn JF, Liras P. CcaR is an autoregulatory protein that binds to the cephamycin-C clavulanic acid cluster IV *Streptomyces clavuligerus*. *J Bacteriology* 2002; 184(11): 3106-3113.
 23. Hong B, Phornphisutthimas S, Tilley E, Baumberg S, McDowall KJ. Streptomycin production by *Streptomyces griseus* can be modulated by a mechanism not associated with change in the *adpA* component of the A-factor cascade. *Biotechnol Let* 2007; 29(1): 57-64.
 24. Ohnuki T, Imanaka T, Aiba S. Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. *J Bacteriol* 1985; 164(1): 85-94.