پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم شماره ۸۴ مهر سال ۱۳۹۰ (۳۱-۲۳)

جدا نمودن ژن تنظیمی استرپتومایسین فاقد پروموتر [StrR2] از استرپتو مایسز 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 می باشد. نکته قابل تامل 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 منظورو یا به عبارت دیگر تسهیل گردد. آنتی بیوتیک استرپتومایسین توسط استرپتومایسز 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 پروموتر آن و سپس کلونینگ آن بود.

مواد و روش ها : جهت جدا نمودن ژن StrR بدون پروموتر ذاتی خود، StrR2 فاقد پروموتر 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 nP2 و Str nP1) 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.

یافته ها : ژن StrR2 فاقد پروموتر با استفاده از PCR تکثیر گردید و ساختار آن مورد تایید قرار گرفت. کلونینگ این ژن به‌طور موفقیت‌آمیز صورت گرفت. سپس ساختار پلاسمیدهای نوترکیب 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 پروموتر را در وکتورهای ویژه استرپتومایسز که واجد پروموترهای القایی هستند ساب کلون نمود.

واژه‌های کلیدی: استرپتومایسین، ژن StrR2 فاقد پروموتر، استرپتومایسز گریزئوس

مقدمه

استفاده از PCR برای شناسایی و جدا نمودن ژن‌ها یک روش نسبتا سریع و دقیق می‌باشد. نکته قابل تامل 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.

مولف مسئول: زهره حجتی– اصفهان: دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
E-mail: z.hojati@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت : ۸۹/۷/۲۰ تاریخ تصویب : ۹۰/۴/۵

www.SID.ir

استرپتومایسز جنسی از باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت است که ژنوم آن دارای GC بالا در حدود ۶۹ تا ۷۳ مول درصد می‌باشد(۱). استرپتومایسز یک جنس بسیار بزرگ با ۵۰۰ گونه متعلق به خانواده استرپتومایستاسه است(۲). حدود دو سوم کل آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی توسط استرپتو مایسزها تولید می‌شود(۳). همچنین تولید آنتی‌بیوتیک‌های نوترکیب توسط این گونه‌ها نیز رو به افزایش می‌باشد(۴).

استرپتومایسز گریزئوس (Streptomyces griseus) یکی از گونه‌های جنس استرپتومایسز است که به علت تولید آنتی‌بیوتیک 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(۷،۶). کندیسیدین، نوبیوسین، سیکلوهگزامید و کروموماسین A از جمله سایر آنتی‌بیوتیک‌های هستند که توسط استرپتومایسز گریزئوس تولید می‌شود(۸) و خانواده ۱۹ کتینازها نیز ابتدا دراین 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 (۱۲-۱۰). ژن StrR با اندازه ۱۰۵۲ bp یکی از ژن‌های دسته ژنی بیوسنتزکننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. محصول این ژن پروتئین تنظیمی StrR است که اکثر اپرون‌های مسئول بیوسنتز آنتی بیوتیک استرپتومایسین را تنظیم و کنترل می‌نماید(۱۳،۱۶-۱۴).

افزایش در میزان تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین با استفاده از استرپتومایسز ترانس ژنیک هدف نهایی این تحقیق بود. در این استرپتو مایسزهای ترانس‌ژنیک StrR را می‌توان در کنترل یک پروموتر قابل تنظیم قرار داد. بدین منظور می‌بایست این ژن بدون پروموتر جدا و کلون گردد.

مواد و روش ها

سویه‌های باکتری، نگهداری آن‌ها و حامل کلون کردن:

از سویه‌های باکتریایی استاندارد استرپتومایسز گریزئوس از UMIST انگلستان و استرپتومایسز گریزئوس PTCC 1127 استفاده شد که از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شده بود. از دو سوش Escherichia coli XL1Blue و Escherichia coli DH5α در این تحقیق استفاده شد که از شرکت سیناژن ایران تهیه گردیدند. محیط‌های کشت YEME (Yeast Extract-Malt Extract) و MSA (Manitol - Soya Agar) برای کشت استرپتومایسز به کار رفت، که عصاره مخمر از شرکت Difco آلمان، باکتوپپتون از شرکت Difco آلمان و عصاره مالت از شرکت Oxoid آلمان تهیه گردید(۱۷). محیط‌های کشت LB (Luria-Bertani) و LBA (Luria-Bertani Agar) برای کشت باکتری E.coli و همچنین آماده سازی آن برای ترانسفورماسیون استفاده شد(۵). جهت تهیه اسپورهای منجمد، ابتدا استرپتو مایسز بر روی محیط MSA کشت داده شد و در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ تا ۷ روز انکوباسیون صورت گرفت. سپس اسپورها با استفاده از لوپ استریل و در مجاورت آب جمع‌آوری و پس از عبور از لوله مخصوص طراحی شده جهت صاف نمودن اسپورها از بقایای مایسلیوم‌ها، سانتریفیوژ شده و در ۲۰ درصد گلیسرول در درجه حرارت ۲۰- به صورت دائمی نگه‌داری شدند(۱۸).

به منظور ترا نسفورماسیون 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 ازسیناژن در ایران تهیه گردید.

استخراج DNA استرپتومایسز گریزئوس:

برای استخراج DNA از روش CTAB با تغییراتی

Archive of SID

www.SID.ir

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 مایسلیوم‌ها توسط سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) جمع‌آوری گردید وسایر 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 دراین تحقیق جدا نمودن ژن از پروموتر خود است، بنابراین محصول می‌بایست فاقد پروموتر باشد. از آن‌جائی که استرپتو مایسز یک میکروارگانیسم با درصد GC بالا می‌باشد بنابر این محتوای GC ناحیه پروموتر با درون ژن و همچنین ناحیه قرار گرفته بین ژن‌ها بسیار متفاوت است، لذا حتی طراحی یک ست مناسب آغازگر با درنظرگرفتن 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 این‌که هدف کلون کردن ژن StrR بدون حضور پروموتر 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 محدودالاثر 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 Forward و جایگاه برش XbaI در آغازگر Reverse طراحی گردید، این دو آنزیم از شرکت Fermentas انگلستان خریداری شدند. این ست آغازگر، ژن StrR بدون پروموتر 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 نستد (Nested-Primer) نام‌گذاری 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 پلیمراز (تهیه شده از سیناژن در ایران) و آغازگرهای اختصاصی اصلی و نمونه DNA استخراج شده بر اساس جدول شماره ۲ با برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر (دستگاه PCR از شرکت Ependorf 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 آغازگرنستد یعنی Str Nes دمای چسبیدن ۶۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود و دمای تکثیر۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی شدند.

جدول شماره ۱ : آغازگرها و مشخصات آن‌ها

کاربرد و اندازه قطعه	توالی آغازگر	نام آغازگر
StrR برای شناسایی قطعه ژن (نستد آغازگر) bp۹۹۲	F 5′ CCC CGA GCA AGT CCG TGA GA3′ R 5′ CGA TGC CGG CCT GGT CCA GTT3′	Str Nes
برای تکثیر قطعه ژن StrR فاقد پروموتر با جایگاه‌های برش آنزیمی XbaI و BamHI bp ۱۱۱۸	F 5′ GCC CGG ATC CCC GGG TGC TAC TAT TC 3′ R 5′ GGT CTA GAG CCG ACG CTC CTC AAC T 3′	Str nP1 Main
برای همانندسازی قطعه ژن StrR با جایگاه‌های برش آنزیمی bp ۱۱۲۱	F 5′ GAT CTA GAG GTG CTA CTA TCC GCG3′ R 5′ GGC GGA TCC TCC TCA ACT CCG TCG3′	Str nP2 Main

Archive of SID

www.SID.ir

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

نوع ترکیب		حجم	غلظت
Template DNA	Chromosomal DNA	۱ µl	۵۰ ng
	Plasmid	۱ µl	۲ ng
Upstream primer		۱ µl	۲۰ ng
Downstream primer		۱ µl	۲۰ ng
dNTP Mix		۲ µl	۱۰ ng
DMSO		۴ µl	–
10 x PCR buffer with $MgSo_4$		۲ µl	۲۰۰mM Tris-HCl ،۱۰۰mM $(NH_4)_2SO_4$ ،۱۰۰mM KCl ،۱٪ Triton X-۱۰۰ ،1mg/ml BSA ،۲۰mM $MgSO_4$
Pfu polymerase		۰/۳ µl	۲/۵ u /µl
deionised dH_2O		تا ۵۰ µl	–

هضم آنزیمی با آنزیم محدود الاثر:

هضم آنزیمی با آنزیم های محدودالاثر بدین صورت انجام شد که به یک میکروتیوپ ۵ میکرگرم از نمونه DNA (محصول PCR یا پلاسمید) به همراه ۵ تا ۱۰ واحد از آنزیم‌ها (از هر آنزیم ۰/۵ میکرولیتر) اضافه گردید وحجم 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 آنزیم‌های محدود الاثر به همراه ۱ تا ۵ واحد از آنزیم T4 DNA Ligase (یک میکرولیتر آنزیم) و ۲ میکرولیتر از بافر ۱۰X اضافه گردید و حجم نهایی با آب دو بار تقطیراستریل 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 سلول‌های مستعد به روش کلرید کلسیم با محلول 20mM $CaCl_2$-80mM $MgCl_2$ تهیه شد و سپس مراحل انجام ترانسفورماسیون پلاسمید به صورت زیر صورت گرفت : ابتدا ۵۰ نانوگرم پلاسمید pBluescript به ۳۰۰ میکرولیتر از سلول‌های 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 آمپی‌سیلین کشت شد ودر دمای ۳۷ سانتیگراد به مدت۲۴ ساعت انکوبه گردید(۱۹).

استخراج پلاسمید:

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

یافته ها

با توجه به غنی بودن ژنوم استرپتومایسز گریزئوس از لحاظ GC بهینه‌سازی 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 می‌شود. اندازه ژن StrR2 تکثیر شده ۱۱۱۸ جفت باز می‌باشد.

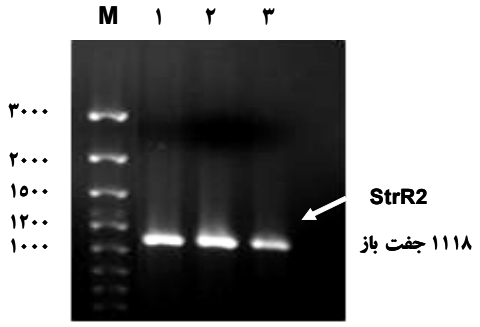
برای اینکه ثابت شود ژن فاقد پروموتر به درستی با PCR شناسایی و جداسازی شده است، دو روش مختلف به کار گرفته شد. اولین روش این بود که محصولات حاصل از PCR ژن StrR2 با آغازگرهای اختصاصی (Str nP1) با استفاده از یک جفت آغازگر داخلی (StNes) دوباره PCR گردند(Nested-PCR).

Archive of SID

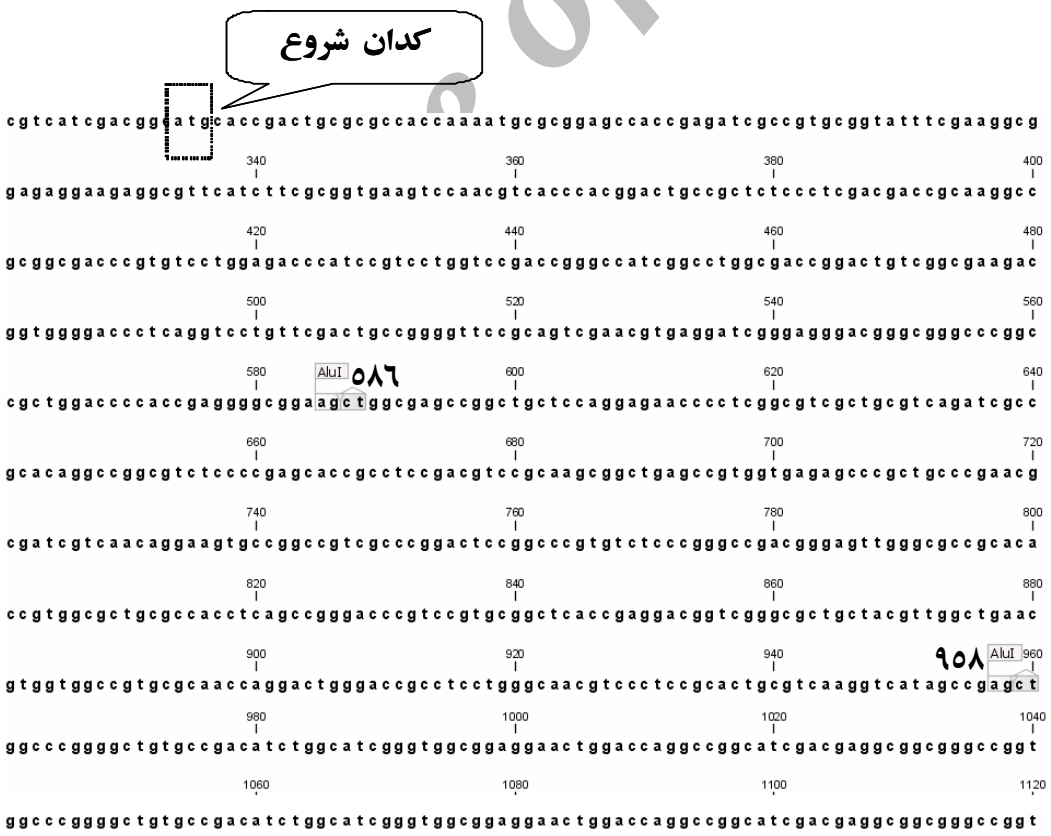
www.SID.ir

نتایج نستد PCR تکثیر ژن strR را تایید نمود. دومین روش، هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن StrR2 فاقد پروموتر با آغازگرهای اختصاصی (Str nP1) با یک آنزیم محدود الاثر بود. برای هضم آنزیمی ژن StrR2 فاقد پروموتر 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 می‌دهد و سه قطعه در اندازه‌های ۳۷۲، ۵۹۷ و ۱۴۷ جفت باز ایجاد می‌کند. آنزیم دیگری به نام BglII نیز برای هضم آنزیمی محصولات حاصل از PCR ژن StrR2 به کار گرفته شد که این آنزیم، ژن را برش نمی‌دهد (تصویر شماره ۲). نتایج حاصل از هضم آنزیمی ژن StrR2 فاقد پروموتر با آنزیم‌های محدود الاثر AluI و BglII پس از الکتروفورز با ژل ۲ درصد آگاروز در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود.

محصول PCR و حامل pBluescript به‌طور 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



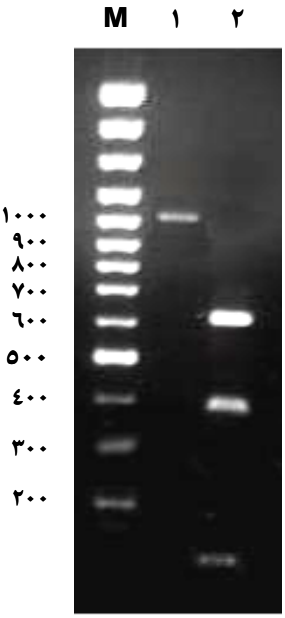
شکل شماره ۲: ترادف نوکلئوتایدی ژن StrR2 فاقد پروموتر و ترسیم restriction map آن موقعیت کدان شروع در اینجا مشخص شده است. محل برش آنزیم AluI بر روی ترادف به‌صورت مستطیل متصل به اسم آنزیم نشان داده شده است. این آنزیم ژن StrR2 فاقد پروموتر را در دو ناحیه، ۵۶۸ و ۹۵۸ برش می‌دهد.

www.SID.ir

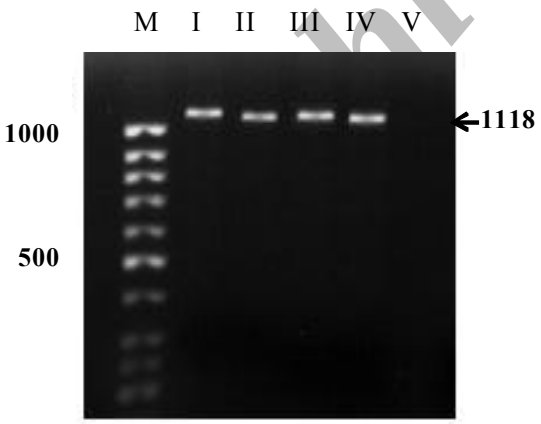
تحت هضم آنزیمی با دو آنزیم محدودالاثر BamHI و XbaI برای کلون کردن ژن مورد نظر قرار گرفتند پس از خالص‌سازی نمونه‌های حاصل از هضم آنزیمی پلاسمیدهای pBluescript و محصول PCR، عمل چسباندن قطعات DNA توسط آنزیم لیگاز در دمای ۱۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انجام شد و در نتیجه این عمل پلاسمید جدید با 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 پروموتر در آن ها تایید گردید (تصویر شماره ۴). استخراج پلاسمید pFDStrR از باکتری‌های *E.coli* ترانسفورم شده با روش جوشاندن هولمس- کویجلی صورت گرفت. پس از استخراج پلاسمید pFDStrR ، ساختار پلاسمیدهای pFDStrR مجددا با استفاده الکتروفورز و PCR و همچنین هضم آنزیمی با دو آنزیم محدودالاثر BamHI و XbaI تأیید شد.

بحث

بررسی‌های مختلف نشان داده است که افزایش بیان ژن‌های تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند بیان یا تولید آنتی‌بیوتیک 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 تنظیم‌کننده 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*



تصویر شماره ۳: تایید ژن StrR2 استخراج شده توسط RFLP-PCR و هضم با آنزیم محدود الاثر AluI .
M. مارکر (100 bp DNA ladder)، اندازه های مارکر بر اساس جفت باز آورده شده است.
۱. آنزیم BglII ژن StrR2 فاقد پروموتر را برش نمی دهد.
۲. آنزیم AluI ژن StrR2 فاقد پروموتر را در دو ناحیه ۵۸۶ و ۹۵۸ برش می‌دهد و سه قطعه به اندازه های ۱۴۸ ، ۳۷۲ و ۵۹۷ جفت باز را ایجاد می‌نماید.



تصویر شماره ٤. تایید کلونینگ ژن StrR فاقد پروموتر در *E. coli* با استفاده از روش Colony-PCR .
M. مارکر (50 bp DNA ladder)، اندازه‌های مارکر بر اساس جفت باز آورده شده است.
I. تکثیر ژن StrR از ژنوم استرپتومایسز گریزئوس PTCC 1127 به عنوان کنترل مثبت، IV-II . 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

در دسته ژنی بیوسنز کننده استرپتومایسین بیش از ۲۵ ژن برای اعمال بیوسنتز، تنظیم، مقاومت و انتقال در Streptomyces griseus N2-3-11 وجود دارد. برخی از ژن‌های مهم و مشخص از لحاظ عملکرد دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی‌بیوتیک 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 ژن‌های دسته ژنی بیوسنتزکننده آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین است. ژن StrR پروتئین StrR را کد می‌نماید که فعال‌کننده نسخه‌برداری ویژه مسیر برای تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین می‌گردد و در نتیجه بیان آن، دسته ژنی استرپتومایسین برای بیوسنتز استرپتومایسین از گلوکز فعال می‌شود(۱۶-۱۳).

به علت بزرگ بودن دسته ژنی بیوسنتزکننده استرپتومایسین و ناحیه شروع همانندسازی متفاوت، نمی‌توان آن را در میزبان دیگری به جز استرپتومایسز کلون کرد و در صورت کلون کردن ژن‌ها ناپایدار خواهند بود، در این تحقیق برای اولین بار ایده استفاده از ژن تنظیم‌کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین (StrR2) به منظور دستکاری ژنتیکی و بالا بردن تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در استرپتومایسزگریزئوس مطرح گردید.

با توجه به اهداف مورد نظر، در گام اول می‌بایست ژن StrR را شناسایی و به میزان زیادی تکثیر و خالص نماییم. از طرف دیگر با توجه به این‌که وکتورهای بیان‌کننده، خود واجد پروموتر قابل تنظیم می‌باشند، بنابراین با کلون نمودن ژن StrR فاقد پروموتر ذاتی خودش، می‌توان بیان آن‌را به طور کامل تحت کنترل در آورد. در این مقاله ژن StrR بدون پروموتر به نام "StrR2 فاقد پروموتر" نامگذاری گردید. این ژن از استرپتومایسزگریزئوس جدا شد و ساختار صحیح آن توسط نستد PCR و هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر محصولات مورد تایید قرار گرفت. به دلیل محدودیت در جایگاه کلون کردن چندگانه یا MCS و آنزیم‌های محدودالاثر، حامل‌ها و پلاسمیدهای اختصاصی استرپتومایسس نمی‌توان ژن StrR2 را مستقیماً وارد این پلاسمیدها کرد و ابتدا می‌بایست این ژن را وارد یک پلاسمید چند منظوره با جایگاه کلون کردن چندگانه و آنزیم‌های محدودالاثر 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 نام‌گذاری شد.

در ضمن با توجه به مطالعات اندک در مورد ژن تنظیم‌کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین(StrR) می‌توان از ویژگی‌های خاص پلاسمید pSNStrR برای بررسی و مطالعه دقیق ژن StrR استفاده کرد. چنانچه Hong و همکارانش درسال ۲۰۰۷ نشان داده‌اند که مکانیسم‌های تنظیمی متعددی برای تولید استرپتومایسین در استرپتومایسز وجود دارد که بسیاری از آن‌ها شناخته نشده و باید تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد(۲۳). همچنین در دو طرف MCS پلاسمید pSNStrR توالی‌هایی از پروموتورهای RNA-پلی‌مرازهایی که از باکتریوفاژهای T3 و T7 مشتق شده‌اند وجود دارند که نسخه‌برداری از آن توسط RNA پلی مرازهای این ویروس‌ها، نسخه‌هایی از RNA سنس و RNA آنتی سنس ژن StrR به دست می‌آید. از RNA

Archive of SID

www.SID.ir

سنس می‌توان مستقیماً برای سنتز پروتئین ژن StrR و مطالعه این پروتئین استفاده کرد. از RNA آنتی سنس ژن StrR می‌توان به عنوان شناساگر نسخه‌های ژن StrR در واکنش‌های هیبریداسیون نورترن بلاتینگ 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 تولید کننده استرپتومایسین به خود استرپتومایسز گریزئوس منتقل کردند و افزایش بیان ژن‌های موجود در این دسته ژنی و همچنین افزایش تولید آنتی بیوتیک را مشاهده کردند(۲۴). در این تحقیق با استفاده از پلاسمید pSNStrR ژن StrR2 فاقد پروموتر وارد یک حامل القایی اختصاصی استرپتومایسز شد. با توجه به القایی بودن این‌گونه حاملین و قرار گرفتن پروموتر اختصاصی القا شونده در آن‌ها، استفاده از ژن فاقد پروموتر الزامی است. در انتها، با انتقال این حامل اختصاصی با روش انتقال پروتوپلاسمی به استرپتومایسس گریزئوس می‌توان افزایش میزان تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در شرایط کنترل شده را انتظار داشت. بنابراین در آینده می‌توان از آن برای دستکاری ژنتیکی استرپتومایسز گریزئوس 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

1. 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.
2. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 5th edition. Mc Graw-Hill Higher Education, 2002.
3. Baltz RH. Genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces. Trends Microbiol 1998; 6(2): 76-83.
4. 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. Chemis Biol 2002; 9(11): 1175-1187.
5. Kendrick KE, Ensign JC. Sporulation of Streptomyces griseus in submerged culture. J Bacteriol 1983; 155 (1): 357-366.
6. 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.
7. Horinouchi S, Beppu T. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. Annu Rev Microbiol 1992; 46: 377-398.
8. Ja G. Candicidin biosynthesis in Streptomyces griseus. Appl Environ Microbial 2003; 60(3): 633-642.
9. Kawase T, Saito A, Kanai R, Fuji T, Nikaidou N, Miyashita K, et al. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinasese in Actinobactria. Appl Environ Microbial 2004; 70(2): 1135-1144.
10. Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EMH. Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within Streptomycetes isolated from soil. Appl Environ Microbial 1998; 64(12):

Archive of SID

www.SID.ir

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 JF. 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 vlavulanic 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.

Archive of SID

www.SID.ir