چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

بررسی امکان ترانسفورماسیون ژن تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین دراشریشیا کلی

زهره حجتي، ناصر گلبانگ، فرشاد درويشي هرزويلی***

آدرس: دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده :

استرپتومایسس گریزئوس یکي از گونه هاي جنس استرپتومایسس است که به علت تولید آنتي بیوتیك استرپتومایسین و تولید یك هورمون میکروبي به نام فاکتورA گونه منحصر به فرد این جنس است. استرپتومایسین جزء دسته آنتي بیوتیکهاي آمینوگلیکوزیدی است که بر روی تعدادی ازباکتریهای گرم منفی و مثبت اثر باکتریوسایدی دارد. ژنهاي بیوسنتزکننده استرپتومایسین در دسته ژني *str* با بیش از30 ژن قرار دارند. *str*R ژن تنظیم کننده بیان این دسته ژني است که با دستکاری آن مي توان بیان و تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین را افزایش داد. چون هدف اصلي این تحقیق در راستاي افزایش بیان ژن *str*R و در نتیجه افزایش میزان تولید آنتي بیوتیک استرپتومایسین است، به همین دلیل ابتدا پرایمرهاي اختصاصی برایstrR طراحي گردید (توسط نرم افزار OLIGO 5). وجود ژن *str*R توسط PCR با استفاده از این پرایمرهاي اختصاصی تایید شد.به این صورت که در ابتدا کل DNA باکتری استرپتومایسس گریزئوس جداسازی و خالص شد. در مرحله بعد با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهاي اختصاصی و همچنین آنزیم *Pfu* پلیمراز، ژن *str*R در کل DNA باکتری مورد نظر شناسایي شد. به دنبال تایید وجود ژن *str*R ، پرایمرهاي اختصاصی (دو ست) دیگري برایstrR طراحي گردید. سپس جایگاههای برش برای دو آنزیم محدودالاثردر انها قرار داده شد . در مرحله بعد با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهاي تغییر یافته و همچنین آنزیم *Pfu* پلیمراز، ژن *str*R از کل DNA باکتری مورد نظر جدا گردید. سپس انتقال و استخراج پلاسمید pBluescript در *Escherichia coli* DH5α صورت گرفت. با نتایج به دست آمده، درآینده نزدیک قادریم ژن *strR* را به پلاسمید متصل کرده و انرا به اشریشیا کلی ترانسفورم نماییم تا بعدا از آن برای دستکاری ژنتیکی استرپتومایسس گریزئوس استفاده شود.

کلمات کلیدی: استرپتومایسس گریزئوس ، استرپتومایسین ، ژن *strR* ، ترانسفورماسیون ، pfu ، PCR .

مقدمه : استرپتومایسس جنسي از باکتریهاي گرم مثبت ساکن خاک در راسته اکتینومیستال است. کروموزوم خطي بزرگ آنها با اندازه8-9Mb و دارای درصد GC بالا است. دو سوم از آنتي بیوتیکهاي طبیعي توسط استرپتومایسس ها تولید مي شود. استرپتومایسس گریزئوس یکي از گونه هاي جنس استرپتومایسس است که به

علت توليد آنتي بيوتيك استرپتومايسين وتوليد يك هورمون ميكروبي به نام فاكتورA گونه منحصر به فرد اين جنس است. استرپتومايسين آنتي بيوتيك آمينوگليكوزيدی است كه بر روی تعدادی از باكتريهای گرم منفی و مثبت اثر باكتريوسايدی دارد . اهميت فوق العاده استرپتومايسين در درمان بيماری سل است. استرپتومايسين و تركيبات وابسته آن، ساختاري سه حلقه اي دارند كه از گلوكز6- فسفات مشتق مي شوند. دسته ژني*str* با بيش از30 ژن، اعمال مختلف تنظيمي، بيوسنتزي و ترشح آنتي بيوتيک استرپتومايسين را انجام مي دهد. *str*R ژن تنظيم كننده بيان اين دسته ژني است كه با دستكاری آن مي توان بيان و توليد آنتی بيوتيک استرپتومايسين را افزايش داد. يكی از روشهای دستكاری ژنتيكی و واردكردن ژن به درون استرپتومايسس، انتقال ژن به واسطه پلاسميدهای *Escherichia coli* و انتقال پروتوپلاسمی است. با اطلاعات حاصل از تعين توالي جديد و به كار بردن ابزارهاي ژنتيكي قوي براي دستكاري ژن هاي متابوليت ثانويه مي توان با برنامه ريزي دوباره بيو سنتز محصولات طبيعي در امر افزايش وتوليد مولكول هاي جديد و اصلاح شده و احتمالاً با فعاليت بيولوژيكي بهبود يافته دخالت كرد. اهميت و نتايج درک كنترل ژنتيكي توليد آنتي بيوتيک و ايجاد سويه هاي ترانس ژنيک استرپتومايسس گامي مؤثر در جهت افزايش توليد آنتي بيوتيک وايجاد آنتي بيوتيک های جديد است تا بتوان از آنها براي توليد صنعتي و خودكفايي كشور استفاده نمود.

مواد و روش ها : ابتدا كل DNA باكتری استرپتومايسس گريزئوس را با استفاده از كيت شركت Roche آلمان جداسازی و خالص نموديم. **پرايمرهاي اختصاصی برای*str*R طراحي گرديد (توسط نرم افزار OLIGO 5). وجود ژن *str*R توسط PCR با استفاده از اين پرايمرهاي اختصاصی تاييد شد. بدينترتيب كه با استفاده از تكنيک PCR و پرايمرهاي اختصاصی و همچنين آنزيم *Pfu* پليمراز، ژن *str*R در كل DNA باكتری مورد نظر شناسايي شد. به دنبال تاييد وجود ژن *str*R ، پرايمرهاي اختصاصی (دو ست) ديگري برای*str*R طراحي گرديد. سپس جايگاههای برش برای دو آنزيم** *Bam*HI & *Xba*I در انتهاهای′ 5**انها قرار داده شد . در مرحله بعد با استفاده از تكنيک PCR و پرايمرهاي تغيير يافته و همچنين آنزيم *Pfu* پليمراز، ژن *str*R از كل DNA باكتری مورد نظر جدا گرديد. *بنابر اين ژن str*R *جدا شده واجد دو جايگاه برش برای دو آنزيم* *Bam*HI & *Xba*I *می باشد.*** در مرحله بعد سلولهای مستعد از *Escherichia coli* DH5α با كلريد كلسيم و كلريدمنيزيم تهيه شدو ترانسفورماسيون توسط 50ng پلاسميد pBluescript صورت گرفت . **استخراج پلاسميد از نمونه های ترانسفورم شده** به روش جوشاندن(با تغ**ييراتی در روش** هلمس _ كويجلي) **انجام شد.**

نـتـایـج وبحث: رشد باکتري های ترانسفورم شده در محیطLB حاوی آنتي بیوتیک و همچنین استخراج پلاسمید, انتقال پلاسمید pBluescript به *E. coli* DH5α را تایید کرد(شکل1) . از طرف **دیگر** طی دو مرحله PCR متفاوت و با استفاده از سه ست پرا**یمر طراحی شده** ژن *str*R از کل DNA باکتری مورد نظر شناسا**یی و** جداسازی شد(شکل2). ***بخاطر قرار دان دو جا***یگاه برش متفاوت در پرا**یمر**ها, **ژن *str*R *جدا شده واجد دو* جایگاه برش برای دو آنزیم** *Bam*HI & *Xba*I ***می باشد***با نتایج به دست آمده، درآینده نزدیک قادریم ژن *strR* را با استفاده از آنزیم های محدود الاثر به پلاسمید pBs (که دارای **جایگاه برش برای دو آنزیم** *Bam*HI & *Xba*I ***می باشد***) منتقل **کرده و انرا به اشریشیا کلی ترانسفورم نماییم و** بعدا از آن برای دستکاری ژنتیکی استرپتومایسس گریزئوس استفاده کنیم.

مـنـابـع :

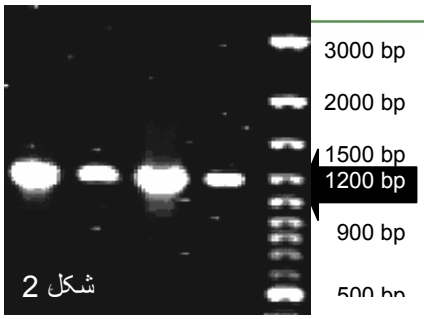
- Bltz, R. H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces.* Trends in microbiology 6(2),76-83.

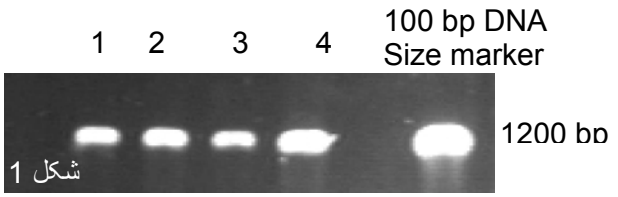
- Chater, K. F. 1998. Taking a genetic scalpel to *Streptomyces* colony. Microbiology 144, 1465-1478.

- Chater, K. F. and Horinouchi, S. 2003. Signalling early developmental events in two higly diverged *Streptomyces species.* Mol. Microbial. ,48(1): 9-15.

- Distler, J., Ebert, A., Mansouri, K., Pissowotzki, K. and Piepersberg, W. 1987. Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. Nucleic acid Res.,15(19): 8041-8056.

- Egan, Sh., Wiener, P., Kallifidas, D. and Wellington, E. M. H. 1998. Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within *Streptomycetes* isolated from soil. Appl. Environ. Microbial.,64(12): 5061-5063.





شکل شماره1- پلاسیدهایpBs استخراج شده بر روی ژل الکتروفورز (0.7%).
شماره ها, نمونه های مختلف می باشند.

شکل شماره2- ژن *str*R جدا شده توسط PCR بر روی ژل الکتروفورز (0.7%).
شماره ها به صورت زیر است.

1 : با استفاده از انزیم pfu و ست پرایمر 1 2: با استفاده از انزیم pfu و ست پرایمر 2

3: با استفاده از انزیم Taq و ست پرایمر 1 4: با استفاده از انزیم Taq و ست پرایمر 2

Investigation on the possibility of transformation of the Streptomycin production regulatory gene to *E. coli*

Zohreh Hojat i **, Naser Golbang ,Farshad Darvishi*

Isfahan University, Faculty of Sciences, Biology Department

z.hojati@sci.ui.ac.ir tel: 3117932479

Abstract:

Streptomycin is an aminoglycosidic antibiotics cluster which is active against gram positive and negative bacteria. Streptomycin is one of the best studied antibiotics at the biochemical and genetic level. The genetics of streptomycin production is well characterized in *Streptomyces griseus*, for which more than 30 clustered genes have been described that encode biosynthesis, regulatory and transport functions. Production of elevated levels of streptomycin, using transgenic *Streptomyces*, is the main goal in this project. Initially the existence of strR in S. griseus had to be identified. Therefore two primers were design (using OLIGO5) to identify the presence of strR in the genome. PCR results (using *S. griseus* total DNA and pfu polymerase) clearly confirmed it. More primers (two different sets) were designed and then subjected to modification at each 5' end, in order to have recognition sites for *Bam*HI and *Eco*RI sites. These primers then not only amplify the *strR* gene but also integrate one unique recognition sites in each end of the amplified fragments. *E. coli* DH5α, then was transformed with pBs plasmid and the transformed strains were confirmed using antibiotic selection. pBs was isolated from the transformed E. coli. Then the PCR amplified fragment can be ligated in pBs (shortly). Introducing this construct into *Streptomyces griseus* with a suitable *Streptomyces* expression vector, may lead to the overproduction of streptomycin antibiotic in this strain.

Key world: *Streptomyces griseus*, Streptomycin, *strR*, PCR, pfu, Transformation.