مقاله پژوهشی

ساخت ناقل های نوترکیب حاوی ژن کدکننده پروتئین تنظیمی تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین، جدا شده از یک سویه استرپتومایسس گریزئوس ایرانی

سمیه پناهی مقدم، زهره حجتی*، مجید متولی باشی

چکیده

StrR یک تنظیم‌کننده کلیدی در رونویسی خوشه ژنی بیوسنتز آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. این پروتئین توسط ژن strR استرپتومایسس گریزئوس با طول ۱۰۵۳ جفت باز کد می شود. هدف این تحقیق، کلونینگ ژن strR از سویه استرپتومایسس گریزئوس ایرانی PTCC1127 و همچنین ATCC1952 درناقل pMA::hyg بود. برای این منظور پرایمرهای اختصاصی ژن strR با نرم افزار Oligo طراحی شدند، قطعه با طول ۱۱۳۴جفت باز به روش PCR تکثیر شد. سپس با روش Semi nested PCR و PCR-RFLP محصول PCR تأیید و درناقل تداخلی pMA::hyg مخصوص استرپتومایسس الحاق گردید. در واکنش الحاق، به دلیل به کارگیری دو جایگاه برش متفاوت BamHIو XbaI در دو انتهای ژن strR و استفاده از همین دو جایگاه برش درناقل pMA::hyg احتمال خودالحاقی (Self ligation) ناقل pMA::hyg وجود نداشت. در مرحله بعد، ناقل های نوترکیب ساخته شده به نام pSPstrR (حاوی ژن strR مشتق از سویه PTCC1127) و pSMstrR (حاوی ژن strR مشتق از سویه ATCC1952) به سلول‌های مستعد باکتری E. coli XL1-Blue ترانسفورم شدند. ساختار سازه های جدید توسط روش های مختلف مولکولی تایید گردید. از طرف دیگر ژن strR جدا شده در وکتور مولتی کپی و بیانی pBluescriptنیز ساب کلون گردید. در آینده می‌توان از این ناقل های نوترکیب ساخته شده به عنوان ابزارهای مناسبی برای جهش زایی جهت دار شده در جایگاه (site directed mutagenesis) و استراتژی های جایگزینی ژن (gene replacement) در استرپتومایسس گریزئوس استفاده کرد. از طرف دیگر از پروتئین تولید شده در E. coli میتوان جهت القا و افزایش تولید آنتی بیوتیک در محیط کشت استرپتومایسس استفاده نمود. علاوه بر این می توان ژن strR را با واسطه یک ناقل بیانی مثل pMT3206 در میزبان استرپتومایسس گریزئوس کلون و اثر افزایش بیان این ژن تنظیمی را در افزایش میزان تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بررسی کرد.

کلید واژه ها: استرپتومایسس گریزئوس؛ pMAH؛ strR؛ جهش زایی جهت دار شده

مقدمه

استرپتومایسس‌ها[1] باکتری‌های هوازی گرم مثبت و خاکزی هستند. بسیاری از متابولیت‌های ثانویه مفید از قبیل عوامل ضد تومور، سرکوبگرهای سیستم ایمنی و بیش از ۷۰٪ آنتی بیوتیک‌های طبیعی توسط اعضای این خانواده تولید می شوند(۱). استرپتومایسس گریزئوس[2] اولین و مهمترین منبع باکتریایی تولیدکننده آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین است. این آنتی‌بیوتیک اولین آمینوگلیکوزید شناخته شده و همچنین اولین آنتی‌بیوتیک شناخته شده بر ضد مای‌کوباکتریوم توبرکلوزیس[3] می‌باشد (۲، ۳).

* زهره حجتی، PhD
استادیار ژنتیک مولکولی
بخش ژنتیک، دپارتمان بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
تلفن: ۰۳۱۱۷۹۳۲۴۷۸
Email: z.hojati@sci.ui.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۱۵

1. Streptomyces
2. Streptomyces griseus
3. Mycobacterium tuberculosis

Archive of SID
www.SID.ir

تنظیم فعال سازی مسیرهای بیوسنتز آنتی بیوتیک در چندین سطح انجام می شود. سطح اول از طریق ژن‌های کدکننده‌ی "تنظیم‌کننده‌های سراسری[۴]" صورت می‌گیرد که در تمایز مورفولوژیکی و تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارند (۴). به عنوان نمونه، فاکتور A دراسترپتومایسس گریزئوس، تنظیم‌کننده مسیرهای مختلفی از جمله اسپورزایی و تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین است (۵). سطح بعدی تنظیم، مربوط به "تنظیم‌کننده‌های چند اثری[۵]" می باشد. این نوع از تنظیم‌کننده‌ها مسیر بیوسنتز چندین آنتی‌بیوتیک را به صورت جداگانه کنترل می کنند. (مثل AfsR در S.coleicolor که تنظیم تولید آنتی‌بیوتیک‌های actinorhodin و undecylprodigiosin و آنتی‌بیوتیک‌های وابسته به کلسیم را بر عهده دارد). سطح نهایی تنظیم شامل "تنظیم‌کننده‌های اختصاصی مسیر[۶]" می‌باشد که تنها یک مسیر بیوسنتز را کنترل می کنند. خانواده ی LAL[۷] خانواده ی تنظیم کننده‌های شبه LysR و خانواده ی SARP[۸] از این جمله اند (۱، ۴).

StrRیک پروتئین تنظیم‌کننده اختصاصی مسیر با طول ۳۵۱ اسید آمینه است که در مراحل نهایی بیوسنتز استرپتومایسین فعال شده و تنظیم رونویسی سایر ژن‌های دسته ژنی بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک را بر عهده می‌گیرد (۶). از دیگر دسته‌های ژنی بیوسنتز آنتی‌بیوتیک در استرپتومایسس گریزئوس می‌توان به دسته ژنی بیوسنتز کانیدیسین (ضد قارچ کاندیدا) (۷)، فریگلوسایکلینون (ضد باکتری‌های گرم مثبت) (۸)، نانوکتین (۹) و سفامایسین- C(۱۰) اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی، پلاسمیدها و محیط‌های کشت مورد استفاده

استرپتومایسس گریزئوس (تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به شماره مشخصه)PTCC1127، استرپتومایسس گریزئوس(تهیه شده از دانشگاه Surrey انگلستان، ATCC1952) و E. coli XL1-Blue (شرکت سیناژن) سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق بودند. پلاسمید بکار گرفته شده، ناقل شاتل[۹] pMA::hyg حامل ژن مقاومت به آمپی سیلین وهایگرومایسین و جایگاه برش چندگانه[۱۰] بود که بطور اختصاصی برای جهش زایی جهت دار شده در جایگاه[۱۱] در استرپتومایسس بکار می رود و در باکتری E. coli به عنوان یک ناقل چند کپی[۱۲] عمل می کند. محیط جامد GYM (در هر لیتر شامل: گلوکز g ۴، عصاره مخمر[Difco] g ۴، عصاره مالت[Oxoid] g ۱۰، کربنات کلسیم g ۲، آگار g ۱۲ وpH ۷/۲) برای تولید اسپور از سویه‌های استرپتومایسس گریزئوس بکار رفت. سوسپانسیون اسپور استرپتومایسس در گلیسرول ۲۰٪ تهیه و در دمای $-20C^{o}$ نگهداری شد. برای استخراج DNA ژنومی، µl ۱۰۰ از سوسپانسیون اسپور چگال به داخل ml ۱۰۰ محیط کشت YEME تلقیح و در انکوباتور شیکردار به مدت ۴۰الی ۶۰ساعت در دمای $28C^{o}$ (rpm ۲۰۰) انکوبه شد. محیط مایع YEME در هر لیتر شامل: عصاره مخمر[Difco] g ۳، باکتو پپتون [Difco] g ۵، عصاره مالت g۳،گلوکز g۱۰، سوکرز g ۳۴۰ است (۱۱). محیط LB[۱۳]و LBA[۱۴] برای کشت باکتری E. coli در دمای $37C^{o}$ و همچنین آمادهسازی آن برای انجام ترانسفورماسیون استفاده شدند. آمپی سیلین با غلظت mg/ml ۱۰۰ برای محیط کشت LBA استفاده شد.

استخراج DNA کرومزومی از استرپتومایسس گریزئوس و شرایط انجام PCR

استخراج ژنوم از هر دو سویه استرپتومایسس گریزئوس با روش CTAB[۱۵] انجام شد (۱۲). پرایمرهای Forward و Reverse (به ترتیب SP_1F و SP_2R) با نرم افزار Oligo (نسخه ۵، Rychlik) برای تکثیر توالی کامل ژن strR از دو سویه مورد نظر طراحی و توسط شرکت TIB-MOLBIOL آلمان ساخته شدند. نکته مهمی که در طراحی پرایمرها در نظر گرفته شد، کلون کردن قطعه حاصل از تکثیر در ناقل pMA::hyg بود. به همین منظور در انتهای ′۵ پرایمرهای SP_1F و SP_2R به ترتیب توالی‌های هدف آنزیم محدودکننده BamHI و XbaI در نظر گرفته شدند. توالی الیگونوکلئوتیدی SP_1F و SP_2R به ترتیب

4. Global regulators
5. Pleiotropic regulators
6. Pathway specific regulators
7. Large-ATP binding regulators of the LuxR family
8. Streptomycin Antibiotic Regulatory Protein
9. Shuttle vector
10. Multiple cloning site
11. Site directed mutagenesis
12. Multi copy
13. Luria-Bertani
14. Luria-Bertani Agar
15. Cethyltrimethyl Ammonium Bromide

Archive of SID
www.SID.ir

برابر ′۳ CCGGATCCTAGAAGTGCGAAGCAT ′۵ و ′۳ TATCTAGACCGCCGTCATCCGACAT ′۵ بود. شرایط PCR با توجه به محتوای بالای GC (حدود ۷۰٪) در ژنوم استرپتومایسس پس از آزمون و خطاهای متعدد بهینه سازی شد. مواد و مقادیر مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۲۵ µl با استفاده از آنزیم pfu پلیمراز به این شرح است: بافر X۱۰ PCR (بدون $MgSO_4$) به میزان ۳ µl، $MgSO_4$ ۴ µl، DMSO ۲ µl، مخلوط dNTP (با غلظت ۱۰ mM) ۰/۵ µl، پرایمر Forward و reverse (با غلظت ۲۰ pM) از هر کدام ۱ µl، DNA کروموزومی بعنوان الگو ۱ µl و آنزیم pfu پلیمراز (۲/۵ µl /u) ۰/۷ µl. PCR در دمای واسرشت سازی[16] اولیه ۹۴ °C به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل بهترتیب با دمای واسرشت سازی ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای اتصال[17] ۶۵/۷ °C برای پرایمرهای اصلی به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر[18] ۷۲ °C به مدت ۱:۱۵ دقیقه انجام شد و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. +

هضم آنزیمی دوگانه، ساخت ناقل نوترکیب و ترانسفورماسیون

از آنجایی که محصولات PCR (ژن strR) در دو انتها و ناقل pMA::hyg در جایگاه کلونینگ متعدد (MCS)[19] خود دارای جایگاه برش با دو آنزیم محدودکننده BamHI و XbaI بودند، به منظور کلون کردن این ژن در ناقل مورد نظر، محصولات PCR و ناقل pMA::hyg در معرض هضم آنزیمی دوگانه قرار گرفته و سپس با استفاده از کیت خالص سازی DNA شرکت MBI Fermentas از ژل استخراج شدند. واکنش هضم آنزیمی دوگانه بر اساس ویژگیهای دو آنزیم BamHI و XbaI با استفاده از بافر مشترک Tango X™ ۲ انجام گرفت. در این واکنش به هر ویال ۱-۰/۵ میکروگرم از نمونه DNA (محصول PCR یا پلاسمید) به همراه ۱۰-۵ واحد از آنزیمها (از هر آنزیم ۱ میکرولیتر) و ۴ میکرولیتر بافر اضافه گردید و حجم کلی با آب مقطر دو بار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. ویال حاوی مخلوط واکنش به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ °C در بنماری قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل گردد. سپس برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها، محصولات هضم آنزیمی به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰ °C قرار داده شدند.

غلظت و خلوص DNA حاصل از نمونه‌های هضم آنزیمی ناقل pMA::hyg و محصولات PCR برای وارد کردن ژن strR به ناقل مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش الحاق با استفاده از ۴۰۰-۵۰ نانوگرم از نمونه DNA برش یافته با آنزیم‌های محدودکننده (قطعات DNA محصول PCR و ناقل) به همراه ۱ واحد (۱µl) از آنزیم T4 DNA ligase طبق پروتکل شرکت سازنده (MBI Fermentas) انجام گردید. برای انجام ترانسفورماسیون باکتری E. coli، ابتدا سلولهای مستعد $CaCl_2$ تهیه و سپس ۵۰ نانوگرم پلاسمید به ۳۰۰ میکرولیتر ازسلولهای مستعد E. coli اضافه شد (۱۳). به منظور انتخاب کلونی‌های ترانسفورم شده از بین تمام کلونی‌ها، سلول‌ها در محیط انتخابی LBA حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین به مدت یک شب کشت داده شدند.

پس از تایید ساختار ژن strR، ساب کلونینگ این ژن در ناقل بیانی pBluescript نیز صورت گرفت و سازه[20] جدید با نام pBS:strR نیز به همین ترتیب ذکر شده در بالا تایید گردید.

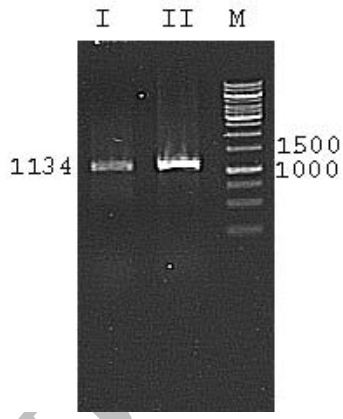
نتایج و مشاهدات

تکثیر ژن strR با کمک PCR و تائید آن با Semi Nested-PCR و PCR-RFLP

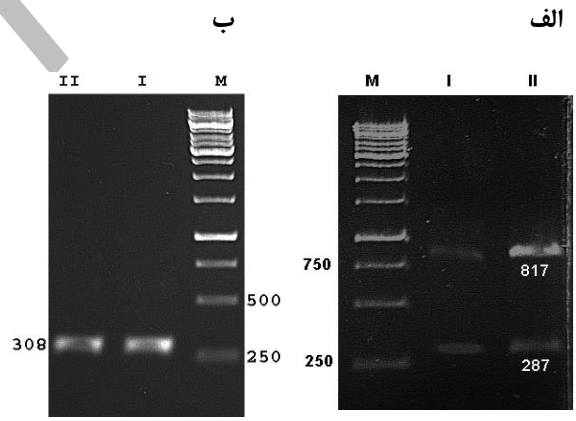
محصول PCR شامل ژن strR (۱۰۵۳ جفت باز) همراه با نواحی فرادست و فرودست آن در مجموع طولی برابر ۱۱۳۸ جفت باز دارد (شکل ۱). در روش Semi Nested-PCR برای تائید محصول PCR، محصول PCR اولیه به عنوان الگو بکار رفت و با استفاده از پرایمر اصلی SP_1F و پرایمر داخلی SP_1R محصول ۳۰۸bps مورد انتظار بدست آمد (شکل ۲- الف). برای تأیید بیشتر محصول PCR، RFLP انجام شد. پس از تهیه Restriction map از پایگاه داده srs-ebi (http://srs.ebi.ac.uk)، مشخص شد که آنزیم NlaIII دارای ۲ جایگاه هدف در ژن strR است که در نتیجه برش ژن مذکور با این آنزیم سه قطعه باطول ۲۸۷ bps، ۳۰ bps و ۸۱۷ bps بدست می‌آید که در مجموع طولی برابر ۱۱۳۴ bps دارند (یعنی طول محصول PCR). ولی به دلیل ران شدن طولانی مدت محصولات بر روی ژل، قطعه ۳۰ تایی از ژل خارج شد و در

16. Denaturation Temperature
17. Annealing Temperature
18. Extension Temperature
19. Multiple Cloning Site
20. Construct

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: تکثیر ژن strR از استرپتومایسس گریزئوس توسط PCR با استفاده از آنزیم pfu پلیمراز.
I) ژن strR از سویه ATCC۱۹۵۲؛ II) ژن strR از سویه PTCC۱۱۲۷ . M: مارکر kb Ladder۱؛ اندازه‌های ذکر شده بر اساس جفت باز می‌باشد.



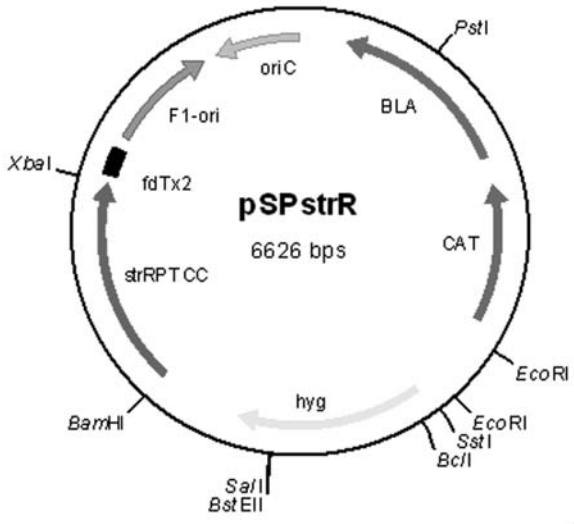
شکل ۲: تأیید ساختار ژن strR توسط Semi Nested-PCR و RFLP-PCR
الف) با استفاده از روش Semi Nested-PCR I) سویه PTCC۱۱۲۷؛ II) سویه ATCC۱۹۵۳.
ب) با استفاده از روش RFLP: در این روش محصولات PCR ژن strR با آنزیم محدودکننده NlaIII برش داده شدند: I) محصول PCR برش یافته از سویه ATCC۱۹۵۲ با ۲ جایگاه برش برای NlaIII؛ II) محصول PCR برش یافته از سویه PTCC۱۱۲۷ با ۲ جایگاه برش برای NlaIII (بدلیل ران شدن طولانی مدت قطعه ۳۰ جفت بازی از ژل خارج شد)؛ M: مارکر kb Ladder۱؛ اندازه‌های ذکر شده بر اساس جفت باز می‌باشد.

نهایت دو قطعه ۲۸۷ تایی و ۸۱۷ تایی بر روی ژل آگارز ۱٪ تشخیص داده‌شدند (شکل ۲- ب).

ساخت ناقل‌های نوترکیب pSPstrR و pSMstrR و ترانسفورماسیون آنها به سلول‌های مستعد E. coli

ناقل‌های نوترکیب حاصل از الحاق ژن strR از دو سویه PTCC1127 و ATCC1952، به ترتیب pSPstrR و pSMstrR نام گذاری شدند (شکل ۳). به دلیل وجود ژن مقاومت به آمپی سیلین (Amp R) در ناقل اولیه pMA::hyg محیط کشت انتخابی LBA واجد آنتی بیوتیک آمپی سلین (غلظت ۱۰۰ mg/ml) برای رشد کلونی‌های ترانسفورم شده در نظر گرفته شد. سپس برای تائید صحت ترانسفورماسیون، استخراج ناقل‌های نوترکیب به روش جوشاندن هولمز کویجلی[۲۱] انجام گرفت (۱۴). ناقل‌های نوترکیب در ژل ۱٪ آگاروز در کنار ناقل دست نخورده pMA::hyg بارگیری شدند (شکل ۴- الف). برای تأیید بیشتر وجود ژن strR در ناقل‌های نوترکیب واکنش PCR این بار از pSPstrR و pSMstrR به عنوان الگو استفاده شد و قطعه با طول ۱۱۳۸ bps یعنی همان محصول PCR اولیه بدست آمد (شکل ۴- ب).

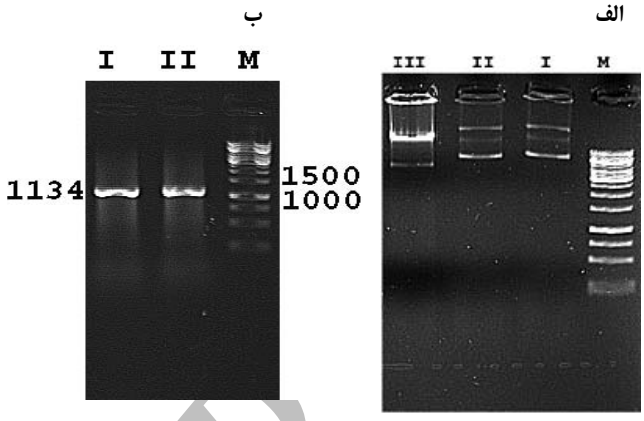
در انتها، ژن strR با انجام هضم دوگانه از پلاسمید نوترکیب جدا گردید و ساب کلونینگ آن در ناقل بیانی pBluescript نیز صورت گرفت. سازه جدید pBS:strR نیز با انجام semi nested PCR



شکل ۳: نقشه ژنتیکی پلاسمید نوترکیب pSPstrR

21. Holmes Quigley

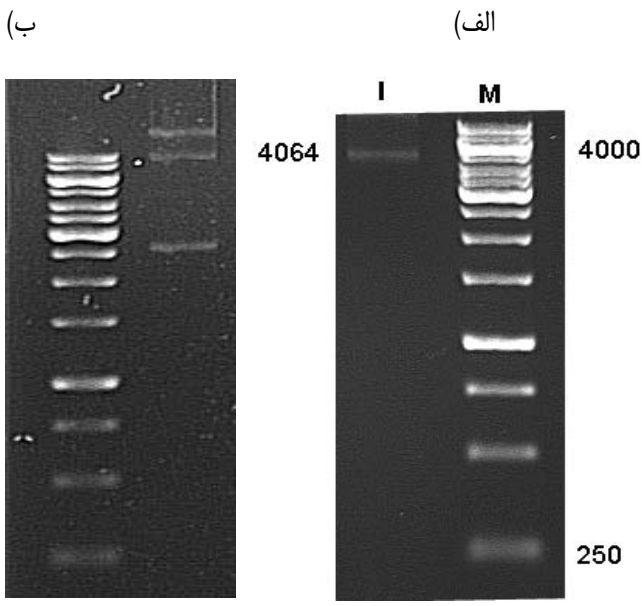
www.SID.ir



شکل۴: تأیید سازه‌های نوترکیب واجد strR

الف) پلاسمیدهای جدید استخراج شده از باکتری E. coli XL۱-Blue (I . پلاسمید pSPstrR؛ II) پلاسمید pSMstrR؛ III) پلاسمید pMA::hyg به عنوان کنترل (الگوی ۳ باندی پلاسمیدها مربوط به میزان سوپرکویل متفاوت پلاسمیدهای CCC می‌باشد؛ اختلاف وزن مولکولی وکتور pMA::hyg و وکتورهای نوترکیب مشهود است).

ب) تأیید کلون سازی ژنstrR در وکتور pMA::hyg به وسیله PCR با استفاده از پرایمرهای SP_1F و SP_2R پس از استخراج از باکتری E. coli XL۱-Blue .I) محصول PCR وکتورpSPstrR؛ II) محصول PCR وکتور pSMstrR. M: مارکر ۱kb ladder؛ اندازه‌های ذکر شده بر اساس جفت باز می‌باشد.



شکل۵: تأیید سازه pBS:strR

الف) پلاسمید نوترکیب pBS:strR قبل از هضم آنزیمی دوگانه (الگوی ۳ باندی پلاسمیدها به دلیل میزان سوپرکویل متفاوت پلاسمیدهای CCC می‌باشد).

ب) تأیید ژنstrR در وکتور نوترکیب pBS:strR به وسیلهRFLP : برش با آنزیم NlaIII ناقل حلقوی pBS:strR با طول bp ۴۰۹۴ را به ساختار خطی با طول bp ۴۰۹۴ تبدیل کرد و قطعه bp ۳۰ از ژل خارج شد.(طول ناقل pBluescript دست نخورده bp ۲۹۶۰ می باشد). M: مارکر ۱kb ladder؛ اندازه‌های ذکر شده بر اساس جفت باز می‌باشد.

و RFLP-PCR تایید گردید (شکل ۵).

بحث و نتیجه گیری

همانطور که قبلاً ذکر شد، StrR یک تنظیم کننده رونویسی مراحل انتهایی بیوسنتز استرپتومایسین است. به منظور یافتن پروتئین تنظیمی کلیدی در مسیر تولید استرپتومایسین، در سال ۱۹۸۵ Ohnuki و همکاران بخشی از خانواده ژنی بیوسنتز استرپتومایسین شامل ۴ ژن (strR ،strA، strB و strC) که در بیوسنتز و یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین نقش دارند را با استفاده از پلاسمیدهای مشتق از ناقل pOA154 در استرپتومایسس گریزئوس کلون کردند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که انتقال ناقل‌های حاوی ژن strR (pADT411 و pADT412) به سویه موتان SM196 (str^s ،str^-) که قادر به تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین نبوده و به این آنتی‌بیوتیک حساس می‌باشد منجر به بازگرداندن فنوتیپ اولیه یعنی تولید استرپتومایسین در این سویه موتان شد. در همین تحقیق انتقال ناقل‌های pADT411، pADT412، pADT41 و pADT42 حاوی ژن strR به سویه وحشی استرپتومایسس گریزئوسATCC10137 منجر به افزایش ۵ تا ۷ برابری تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین شد و نشان داده شد ناحیه‌ای از DNA که مسئول این افزایش تولید بوده است در محدوده‌ای بین جایگاه‌های BglII و BamHI قرار دارد، یعنی همان محدوده‌ای که ژن strR در آن واقع شده است (۸).

هدف از این تحقیق، جداسازی، تأیید و تکثیر ژن strR در میزبان E. coli بود. بر همین اساس دو سویه از استرپتومایسس گریزئوس انتخاب، ژن مورد نظر از کروموزوم آنها استخراج و در

Archive of SID
www.SID.ir

ناقل pMA::hyg کلون شدند. برای جلوگیری از خودالحاقی ناقل pMA::hyg، ۲ جایگاه برش متفاوت BamHI و XbaI به جای یک جایگاه برش از ناحیه MCS این ناقل برای ورود قطعه DNA انتخاب شدند. همین دو جایگاه در دو انتهای ′۵ پرایمرهای اصلی SP1F و SP2R نیز وجود داشتند طوری‌که پس از الحاق، ژن strR در جهت ′۵ به ′۳ پس از ژن hyg قرار می‌گرفت. در نهایت انتقال به سلول‌های مستعد E. coli صورت گرفت تا در مراحل بعدی اثرات افزایش مقدار و بیان ژن strR و یا جهش در آن، از طریق جهش زایی هدفمند بررسی شود.

ناقلpMA::hyg یک ناقل شاتل است که در میزبان E. coli به عنوان یک ناقل چند کپی و در میزبان اصلی یعنی استرپتومایسس به عنوان یک ناقل ادغام شونده[۲۲] عمل می کند. به همین ترتیب مولکول‌های نوترکیب حاصل از آن، ویژگی‌های ذکر شده را دارند و به عنوان ابزارهای مناسبی برای جهش زایی جهت دار شده در جایگاه، حذف ژن و استراتژی‌های جایگزینی ژن در استرپتومایسس گریزئوس استفاده می شوند. این ویژگی و سایر ویژگی‌های نشان داده شده در شکل۳، شامل ژن مقاومت به بتا لاکتام آمپی سیلین (BLA)،هایگرومایسین (hyg) و کلرامفنیکل (CAT)، pMA::hyg را یک ابزار قوی در مطالعات مولکولی خانواده استرپتومایسس ساخته است. از طرف دیگر ساب کلونینگ این ژن در ناقل چند کپی و بیانی pBluescript نیز صورت گرفت و ساختار کانستراکت جدید با نام pBS:strR نیز به همین ترتیب تایید گردید. این سازه جدید مقادیر متنابهی از ژن تنظیمی را در E. coli تولید می نماید، این پروتئین تولید شده را می توان مستقیما به محیط کشت استرپتومایسس گریزئوس اضافه نمود و میزان تولید آنتی بیوتیک را در استرپتومایسس افزایش داد. از مزایای استفاده از پروتئین تنظیمی این است که می توان آن را زودتر از زمان معمول جهت تولید متابولیت‌های ثانویه به محیط کشت استرپتومایسس اضافه نمود. به این ترتیب با شروع زود هنگام تولید آنتی بیوتیک، میزان آن را با شدت بیشتری افزایش داد.

22. Integrative

References

1. Jianqiang H, Jing Sh, Virginie M, et al. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of Streptomyces coelicolor. Molecular Microbiology 2005;58:1276–1287.

2. Springer B, Kidan Y G, Prammananan T, et al. Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance. Antimicrobial Agents and chemotherapy 2001;45:2877–2884.

3. Egan Sh, Wiener P, Kallifidas D, et al. Transfer of Streptomycin Biosynthesis Gene Clusters within Streptomycetes Isolated from Soil. Applied and Environmental Microbiology 1998;64:5061–5063.

4. Chen Y, Wendt-Pienkowski E, Shen B. Identification and utility of FdmR1 as a SARP activator for fredericamycin production in Streptomyces griseus ATCC49344 and heterologous hosts. Journal of Bacteriology 2008;10:00592–08.

5. Takano E. g-Butyrolactones: Streptomyces signaling molecules regulating antibiotic production and differentiation. Current Opinion in Microbiology 2006;9:287–294.

6. Tomono A, Tsai Y, Yamazaki H, et al. Transcriptional control by A-factor of strR, the pathway-specific transcriptional activator for Streptomycin biosynthesis in Streptomyces griseus. Journal of Bacteriology 2005;187:5595–5604.

7. Campelo A B, Gil J A. The candicidin gene cluster from Streptomyces griseus IMRU 3570. Microbiology 2002;148:51–59.

8. Ohnuki T, Imanaka T, Aiba Sh. Self-cloning in Streptomyces griseus of an str Gene cluster for streptomycin biosynthesis and Streptomycin resistance. Journal of Bacteriology 1985;164:85–94.

Archive of SID
www.SID.ir

9. Smith W C, Xiang L, Shen B. Genetic localization and molecular characterization of the nonS gene required for macrotetrolide biosynthesis in Streptomyces griseus DSM40695. Antimicrobial agents and Chemotherapy 2000;44:1809–1817.
10. Challis J L, Hopwood D A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by Streptomyces species. PNAS 2003;100:14555–14561.
11. Dyson P. 2011. Molecular Biology and Biotechnology. Caister Academic Press Pub.
12. Cullings KW. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular Ecology 1992;1:233–240.
13. Sambrook J, Russel D W .2001. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Hrbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour; New York. USA. Chapter 1, Sections: 44–46 and 116.
14. Holmes D S, Quigley M. A Rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Analytical Biochemistry 1981;114:193–197.

Archive of SID

www.SID.ir