



بررسی اپرون مصنوعی در باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) به منظور کنترل رونویسی

پرستو مجیدیان^{۱*}، حمید نجفی زربینی^۲، کن یوشیدا^۳، غلامعلی رنجبر^۴، قربانعلی نعمت زاده^۵

^۱دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

^۲استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

^۳استاد، گروه آگروبیوساینس، دانشگاه کوبه، ژاپن.

^۴دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

^۵استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۹

چکیده

در این مطالعه، اپرون مصنوعی *gnt* با قابلیت تنظیم رونویسی برگشت‌پذیر در باکتری باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از القاء‌کننده گلوکونات ایجاد شد. ابتدا، جهت عدم تاثیر پدیده بازدارندگی کاتابولیتی کربن بر روی میزان رونویسی، در ناحیه اتصالی پروتئین کاتابولیتی A در توالی‌های *creup* و *credown* جهش ایجاد شد. سپس، ژن‌های ساختاری اپرون گلوکونات تحت کنترل یک پروموتور مداوم قوی (*P_{rpsO}*) به منظور تجزیه پذیری مداوم القاء‌کننده گلوکونات قرار گرفتند. از ژن گزارشگر *lacZ* نیز در پائین دست پروموتورهای *gnt* جهت ارزیابی کارکرد اپرون مصنوعی استفاده شد. نتایج حاصل از القاء ضربه‌ای نشان داد که آنزیم بتاگالاکتوزیداز در هر یک از سویه‌های جهش‌یافته، در زمان صفر یا عدم حضور القاء‌کننده فعالیت نشان نداد. با اضافه کردن ۱ میلی‌مولار القاء‌کننده، حداکثر فعالیت آنزیم و تجمع متابولیت در ۱ ساعت بعد از اضافه شدن القاء‌کننده دیده شد و به دنبال آن با تجزیه القاء‌کننده فعالیت آنزیم متوقف شد. با افزودن ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار گلوکونات به محیط کشت، حداکثر فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز به ترتیب در زمانهای 2h و 4h مشاهده شد. داده‌های ما بیانگر صرف زمان طولانی‌تری برای تجزیه القاء‌کننده و به تبع آن روشن ماندن اپرون در مدت زمان بیشتر و توقف رشد سلولی در حضور غلظت‌های بیشتری از القاء‌کننده بود. به طور کلی، می‌توان استفاده از سیستم القاء ضربه‌ای و اپرون‌های مصنوعی برگشت‌پذیر را جهت تولید وسیع متابولیت‌های خاص در بازه زمانی کوتاهی از رشد باکتری‌ها در مطالعات بعدی پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس سوبتیلیس، اپرون مصنوعی، گلوکونات.

مقدمه

موجود، توجه انتقادی دانشمندان را در زمینه مهندسی متابولیک به خود جلب کرده است. در ارتباط با تغییر بیان ژن، هیچ سیستم رونویسی برگشت پذیر فعال شونده با القاء کننده های شیمیایی وجود ندارد. اما، سیستم های دیگری نظیر سیستم های بیانی تغییر پذیر^۱ به واسطه نور و دما وجود دارند که سبب القاء و بازدارندگی سریع و برگشت پذیر ژن های هدف در زمان های خاص می شوند (Rinas, 1996; Lee and Keasling, 2006; Lee et al., 2013). در طی دهه های اخیر، از باکتری باسیلوس سوبتیلیس به عنوان یک باکتری الگو جهت مطالعه اپرون های القائی و بازدارندگی مصنوعی، تنظیم بیان ژن و متابولیسم ژن ها استفاده شده است (Freyre-González et al., 2013). اپرون گلوکونات یکی از اپرون های معروف این باکتری است که مسئولیت کاتابولیسم گلوکونات را با استفاده از فسفریلاسیون گلوکونات به ۶ فسفو گلوکونات طی مسیر پنتوز فسفات به عهده دارد (Reizer et al., 1991). به علاوه، بازدارندگی کاتابولیتی کربن در باکتری باسیلوس سوبتیلیس تحت کنترل عناصر اساسی نظیر پروتئین کاتابولیتی A^۲، سرین فسفریله شده^۳ و عنصر پاسخ دهنده کاتابولیتی^۴ می باشد. تنظیم پدیده CCR در اپرون گلوکونات تحت کنترل دو توالی *cre*، یکی در اولین ژن اپرون گلوکونات، ژن تنظیم کننده *gntR* با نام (*cre_{down}*) و دیگری

باکتری ها در معرض محیط های فیزیکی و شیمیایی مختلفی قرار دارند و با تنظیم بیان ژن های تولید کننده پروتئین های ساختاری، انتقالی، آنزیم ها و ... به تغییرات شرایط محیطی واکنش نشان داده و به یک شرایط اکولوژیکی خاص سازگار می شوند (Tohidfar and Khosravi, 2014). بنابراین، باکتری ها بسته به دسترسی به مواد غذایی مورد نیاز خود، بیان آنزیم های دخیل در مسیرهای بیوشیمیایی مختلف را کنترل می کنند (Balleza et al., 2009). پیشرف های اخیر در زمینه مهندسی متابولیک توجه محققین را به تولید سیستم های تنظیمی رونویسی مصنوعی با هدف کنترل ژن های درون موجود زنده، ژن های ناهمگن، حذف یا افزایش مسیرهای متابولیکی ویژه و تولید و تجمع متابولیت های خاص معطوف کرده است (Lee et al., 2012; Na et al., 2013). در زمینه مهندسی متابولیک، تعداد زیادی سیستم های بازدارندگی و القائی وجود دارد که جهت کنترل مصنوعی رونویسی استفاده می شوند. اما، اکثر این سیستم ها برگشت ناپذیر هستند، به این معنی که، زمانی که یک سیستم القائی روشن می شود به علت حضور مداوم القاء کننده نمی تواند خاموش شود و به طور مشابه، زمانی که یک سیستم بازدارندگی خاموش می شود، قابلیت روشن شدن مجدد را ندارد. در نتیجه، موضوع برگشت ناپذیری سیستم های تنظیمی رونویسی مصنوعی

¹ Switchable gene expression

² Catabolite control protein A (CcpA)

³ P-ser-HPr

⁴ Catabolite responsive element (cre)

لاکتون غیر فعال شده و توسط اولین ژن اپرون گلوکونات (*gntR*) رمز می‌شود (Fujita and Miwa, 1989). در پژوهش ایشان مشخص شد که اپراتور *gnt* در بین موقعیت‌های -۱۰ و +۱۵ قرار گرفته و دارای ساختار پالیندرومی نیمه متقارن ATACTTGTA می‌باشد. بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر، (۱) غیر فعال سازی پدیده CCR جهت از بین بردن تاثیر آن بر روی میزان رونویسی اپرون (۲) بررسی عملکرد اپرون مصنوعی گلوکونات با هدف روشن و خاموش شدن برگشت‌پذیر سیستم بیانی در زمان های دلخواه و غلظت‌های متفاوت از القاء‌کننده در طول رشد باکتری بوده است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریائی

در این مطالعه، از سویه باسیلوس سوبتیلیس ۱۶۸ (*trpC2*) به عنوان یک سویه استاندارد استفاده شد. سویه‌های مشتق شده از سویه ۱۶۸ عبارتند از: ($\Delta gntR::P_{rpsO}$, *trpC2*, (Em^R)), ($\Delta gntR::P_{rpsO}$ (Em^R)), ($amyE::P_{gnt}$ -lacZ*gntRm*, *trpC2*, (Em^R)), ($amyE::P_{gnt1}$ -lacZ*gntRm*, $\Delta gntR::P_{rpsO}$ (Em^R)), ($amyE::P_{gnt2}$ -lacZ*gntRm*, *trpC2*, (Em^R)).

محیط کشت و شرایط رشد باکتری‌ها

بعد از ترانسفورماسیون، جهش یافته‌های باسیلوس سوبتیلیس بر روی محیط کشت agar

در ناحیه پروموتور با نام (*cre_{up}*) می‌باشد (Miwa et al., 1997; Marciniak et al., 2012) و به دو صورت کنترل می‌شوند: الف) اتصال کمپلکس CcpA/P-ser-HPr به ناحیه *cre* در پروموتور اپرون گلوکونات سبب جلوگیری از رونویسی می‌شود. ب) اتصال کمپلکس CcpA/P-ser-HPr به ناحیه دیگری از *cre* درون ژن *gntR* از پیشرفت یا ادامه رونویسی ممانعت می‌کند (Miwa et al., 1997). در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی بر روی بررسی عملکرد اپرون گلوکونات جهت ارزیابی و تنظیم سیستم‌های تنظیمی رونویسی مصنوعی انجام شده است. در سال ۱۹۸۶، فوجیتا و همکارانش، توالی نوکلئوتیدی اپرون گلوکونات را در باکتری باسیلوس سوبتیلیس گزارش کردند (Fujita et al., 1986). روش‌های آنالیز حذفی و غیر فعال سازی الحاقی نشان داد که اپرون گلوکونات شامل سه ژن ساختاری به نام‌های گلوکونات کیناز (*gntK*)، گلوکونات پرمناز (*gntP*)، یک ژن با عملکرد نامشخص (*gntZ*) و یک ژن تنظیمی (*gntR*) تولیدکننده پروتئین بازدارنده رونویسی می‌باشد (Miwa and Fujita, 1988).

در مطالعه دیگری، تنظیم منفی اپرون گلوکونات در اثر تعامل بین پروتئین بازدارنده گلوکونات توالی اپراتور کشف شد (Fujita and Fujita, 1987). در تحقیق مشابه دیگر، فوجیتا و میوا (۱۹۸۹) دریافتند که پروتئین *GntR* در تعامل با گلوکونات یا S-گلوکونو

شد و به ترتیب از جفت آغازگرهای (a067 و a070)، (a068 و a070) و (a069 و a070) برای ساخت $pCRE-P_{gnt}$ ، $pCRE-P_{gntm1}$ و $pCRE-$ P_{gntm2} استفاده شد. بعلاوه، توالی cre_{down} در ۴۰ امین کدون (ACC) توسط جهش خاموش به کدون دیگری از اسید آمینه ترئونین (ACT) تبدیل شد.

ساخت سویه جهش یافته $\Delta gntR::P_{rpsO}$ (Em^R)

به عنوان باکتری میزبان و ترانسفورماسیون

به منظور سهولت در تجزیه مداوم گلوکونات، ژن‌های ساختاری اپرون گلوکونات تحت کنترل مداوم پروموتور قوی^۲ (P_{rpsO}) قرار گرفتند (Nicolas *et al.*, 2012). کاست ژنی شامل پروموتور قوی و ژن مقاومت به اریترومایسین با استفاده از پی سی آر نوترکیب^۳ تکثیر و به باکتری ترانسفورم شد (Farbet *et al.*, 2002) (شکل ۱). با توجه به ماهیت طبیعی مستعد بودن^۴ باکتری باسیلوس سوبتیلیس و عدم نیاز به ناقل پلاسمیدی برای ترانسفورماسیون (de Vries and Wackernagel, 2002)، سلول‌های مستعد میزبان باکتریایی با استفاده از DNA استخراج شده از هر کدام از سلول‌های جهش یافته ترانسفورم شدند و کاست‌های ژنی از طریق نوترکیبی هومولوگی^۵ در نواحی A و B در کروموزوم میزبان جای گرفتند.

LB^۱ انتخابی (شامل ۱۰ گرم تریپتون، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم سدیم کلراید) با آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و کلرامفنیکل به ترتیب به میزان ۰/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر در در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت کشت داده شدند. جهت آزمون آنزیمی، سلول‌های باکتری در فاز تأخیری رشد ($OD_{600} = 0.1$) در فلاسک‌های زاویه دار حاوی محیط کشت مایع حداقل S6، تلقیح شدند.

از بین بردن پدیده CCR با ایجاد جهش در P_{gnt} و ناحیه رمز کننده پروتئین بازدارنده ($gntRm$)

جهت جلوگیری از اثر CCR بر روی میزان رونویسی، دو جهش در توالی cre در بالادست (P_{gnt}) و پائین دست ($gntR$) اپرون gnt ایجاد شد. ابتدا، از ناحیه پروموتری $ysiAB-etfBA$ شامل ناحیه ۱۰- (TATCA)، یک توالی رابط ۱۷ جفت بازی بین نواحی ۱۰- و ۳۵- و ناحیه ۳۵- (TTGCAT) بدست آمده از پایگاه داده‌ای DBTBS مشابه با توالی پروموتر P_{gnt} استفاده شد (Ishii *et al.*, 2001). به منظور ایجاد P_{gntm1} ، ناحیه ۳۵- پروموتر gnt با ناحیه پروموتری $ysiAB-etfBA$ جایگزین شد و در مورد P_{gntm2} توالی مورد توافق TTGACA در ناحیه ۳۵- پروموتر gnt قرار گرفت. جهت تکثیر و کلونینگ قطعات P_{gnt} ، P_{gntm1} و P_{gntm2} ، پلاسمید $pCRE-$ test با آنزیم‌های برشی $EcoRI$ و $BamHI$ هضم

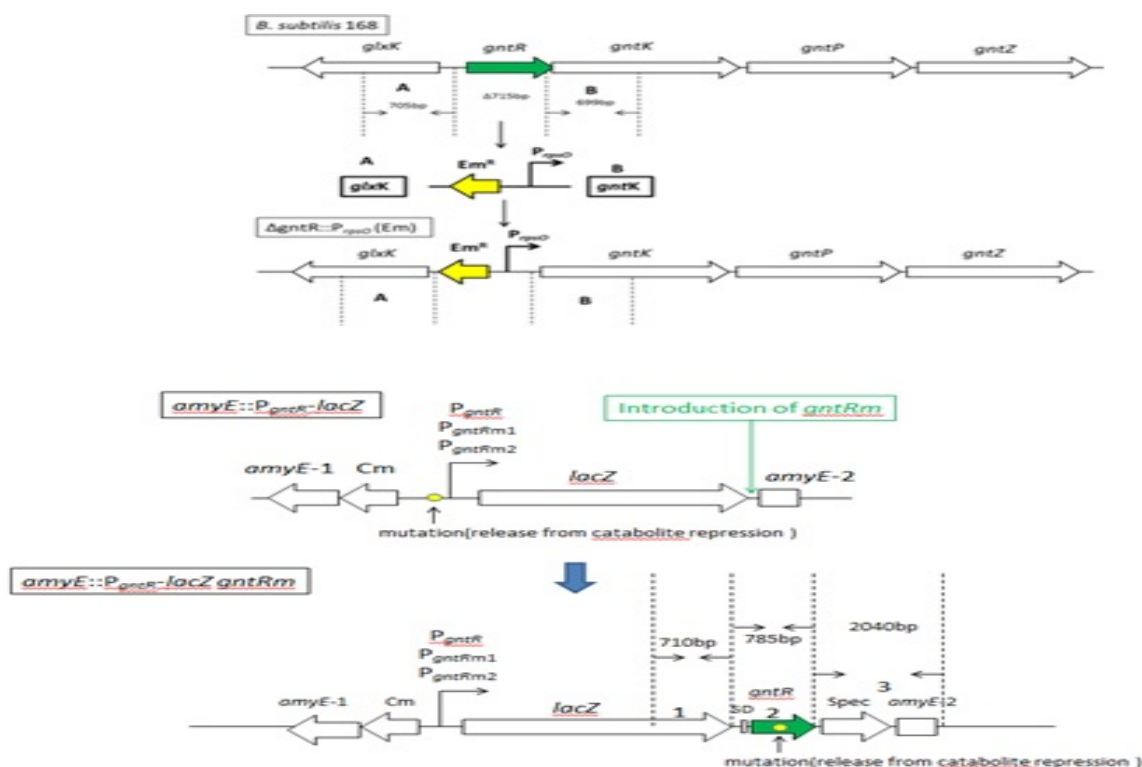
² Constitutively strong promoter

³ Recombinant PCR

⁴ Natural competence cell

⁵ Homologous recombination

¹ Luria broth medium



شکل ۱- الگوی ساخت سویه‌های جهش‌یافته. شکل بالا، حذف ژن تنظیم کننده *gntR* در اپرون *gnt* و جایگزینی با پروموتور مداوم قوی (P_{rpsO}) را نشان می‌دهد. شکل پائین نشان‌دهنده الحاق قطعه *gntRm* در پائین دست ژن گزارشگر و ساخت سویه‌های *amyE::P_{gntR}-lacZgntRm*، *amyE::P_{gntRm1}-lacZgntRm* و *lacZgntRm* می‌باشد.

Figure 1- Construction of new strains. The upper figure shows deletion of *gntR* gene in the *gnt* operon and replacement with constitutive strong promoter (P_{rpsO}), the lower figure indicates the insertion of *gntRm* under *lacZ* reporter and construction of *amyE::P_{gntR}-lacZgntRm*, *amyE::P_{gntRm1}-lacZgntRm* and *amyE::P_{gntRm2}-lacZgntRm* strains.

پتری دیش، با استفاده از روشی مطابق مقاله ژانگ و همکاران با کمی تغییرات استخراج گردید (Zhang et al., 2011). تغییرات کروموزومی بدست آمده با استفاده از روش‌های PCR و توالی‌یابی با دستگاه توالی‌یابی ABI تأیید شدند. در نهایت، داده‌های بدست آمده از توالی‌یابی بوسیله نرم افزارهای Sequence scanner

تأیید سویه‌های جهش‌یافته با پی سی آر^۱ و توالی‌یابی^۲

جهت استخراج تک کلونی‌ها^۳، کلونی‌های بدست آمده از هر محیط کشت بر روی محیط کشت جدید با استفاده از یک لوپ کشت شدند. DNA ژنومی از تک کلونی‌های هر

¹ PCR
² Sequencing
³ Single colony isolation

باکتریائی به مدت ۴۰ ساعت بر روی محیط کشت LB agar حاوی سویسترا X-gal (۱۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شدند. در آزمون کمی، میزان فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز بر اساس اندازه‌گیری ماده زرد رنگ او نیتروفنل بتا دی گالاکتوزید^۴ و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر BioRad powrwave XS انجام شد (Griffith and Wolf, 2002).

نتایج

نتایج حاصل از القاء ضربه‌ای در باکتری‌های جهش‌یافته

بر اساس نتایج بدست آمده، سلول‌های باکتری در محیط کشت بدون القاء‌کننده (0h) منحنی رشد نرمال را نشان دادند. یک ساعت بعد از اضافه کردن ۱ میلی‌مولار گلوکونات (القاء‌کننده) به محیط کشت نیز تغییر محسوسی در میزان رشد سلول‌های باکتری ایجاد نشد. اما با افزایش مقادیر ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار از گلوکونات به محیط کشت، غلظت سلول‌های باکتریائی در فاز سکون^۵ کاهش یافته و سبب توقف رشد سلولی شد. به عنوان مثال، افزودن ۵ میلی‌مولار گلوکونات نسبت به ۱ میلی‌مولار به محیط کشت، رشد کندتری در فاز سکون را سبب شد (شکل ۲). از این رو، غلظت ۱ میلی‌مولار از القاء‌کننده، رشد مناسب‌تر باکتری را نشان داد.

GENETYX version 10.1 و version 1.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

اضافه کردن مقادیر متفاوتی از القاء‌کننده (گلوکونات) به محیط کشت باکتریائی جهت القاء ضربه‌ای^۱

سویه‌های باکتریائی بعد از پیش کشت^۲، در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع S6 انتقال یافته و در شیکر انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. کشت سلول‌های باکتری در فاز تأخیری رشد (OD_{۶۰۰} = ۰/۰۱) آغاز شد و پس از رسیدن فاز لگاریتمی رشد (OD_{۶۰۰} = ۰/۳)، نمونه‌گیری از سلول‌های باکتریائی (۱ میلی‌لیتر) انجام شد. به محض رسیدن فاز لگاریتمی رشد به ۰/۳، سلول‌ها به مدت ۳ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس، به میزان ۱ میلی‌مولار القاء‌کننده (گلوکونات) به محیط کشت اضافه شد و سلول‌ها با فاصله زمانی ۱، ۲، ۴ و ۸ ساعت بعد از اضافه کردن القاء‌کننده به میزان ۵۰۰ میکرولیتر جمع‌آوری شدند.

آزمون آنزیمی

آزمون آنزیمی به دو صورت کمی و کیفی انجام شد. در حالت فنوتیپی، آزمون غربالگری کلونی‌های آبی - سفید^۳، میزان بیان ژن گزارشگر lacZ را نشان داد. بر این اساس، سلول‌های

^۴ O-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG)

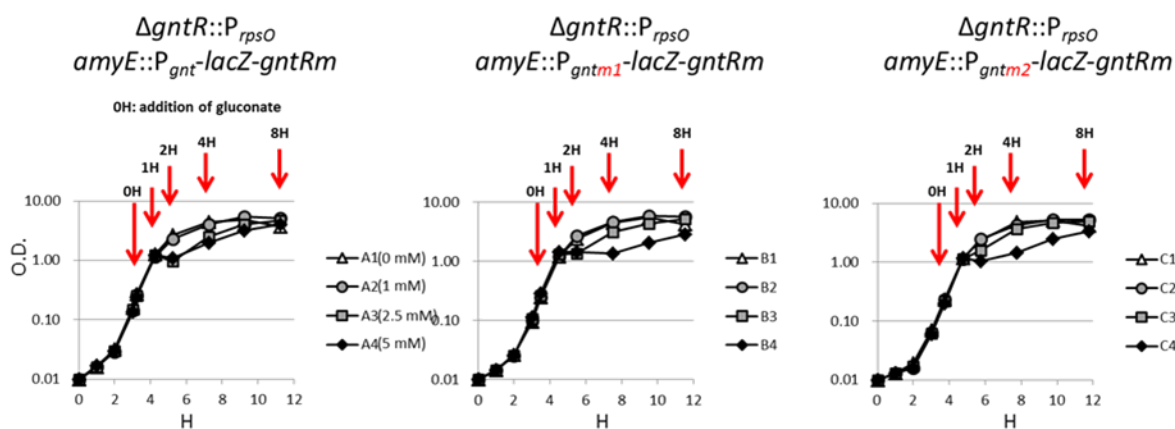
^۵ Stationary phase

^۱ Pulse induction system

^۲ Pre-culture

^۳ Blue - white colony screening

Pulse-induction by addition of gluconate



شکل ۲- سیستم القائی ضربه‌ای در سویه‌های جهش‌یافته باکتری باسیلوس سوبتیلیس در عدم حضور القاء‌کننده (۰ میلی‌مولار) و در حضور غلظت‌های متفاوتی از گلوکونات (۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) به همراه ۵ میلی‌مولار گلوکز

Figure 2- Pulse induction system in synthetic *Bacillus subtilis* strains without any inducer and addition of 1 mM, 2.5 mM and 5 mM gluconate as well as 5 mM glucose.

نتایج بدست آمده از آزمون آنزیمی کمی نشان داد که هیچ گونه فعالیت آنزیمی در زمان (0h) به علت عدم حضور القاء‌کننده وجود ندارد (شکل ۳ پائین). با اضافه کردن ۱ میلی‌مولار گلوکونات به محیط کشت، بالاترین سطح فعالیت آنزیم در زمان (1h) در هر سه سویه باکتریایی دیده شد و با تجزیه القاء‌کننده بعد از یک ساعت فعالیت متوقف شد. با اضافه کردن ۲/۵ میلی‌مولار القاء‌کننده، بیشترین میزان فعالیت آنزیم در زمان (1h) در سویه $\Delta gntR::P_{rpsO}$ (Em^R) (Cm^R) amyE::P_{gnt} lacZgntRm، در زمان (2h) در سویه $\Delta gntR::P_{rpsO}$ (Em^R) amyE::P_{gntm1}-lacZgntRm (Cm^R) و در زمان‌های (1h-2h) در سویه $\Delta gntR::P_{rpsO}$ (Em^R) amyE::P_{gntm2}-lacZgntRm (Cm^R) مشاهده شد.

بیان ژن گزارشگر *lacZ* با استفاده از آنالیز فنوتیپی میزان بیان ژن گزارشگر *lacZ* تحت کنترل پروموتورهای *P_{gnt}*، *P_{gntm1}* و *P_{gntm2}* در سه حالت بدون القاء‌کننده و با القاء‌کننده (۱ و ۵ میلی‌مولار) با استفاده از روش غربالگری کلونی‌های آبی - سفید انجام شد (شکل ۳ بالا). کلونی‌های آبی رنگ مشاهده شده در محیط‌های کشت هر سه سویه باکتری فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در حضور القاء‌کننده مشاهده شد. در حالی که وجود کلونی‌های سفید رنگ، عدم القاء پروموتور در اثر عدم حضور القاء‌کننده در محیط کشت را تأیید کرد.

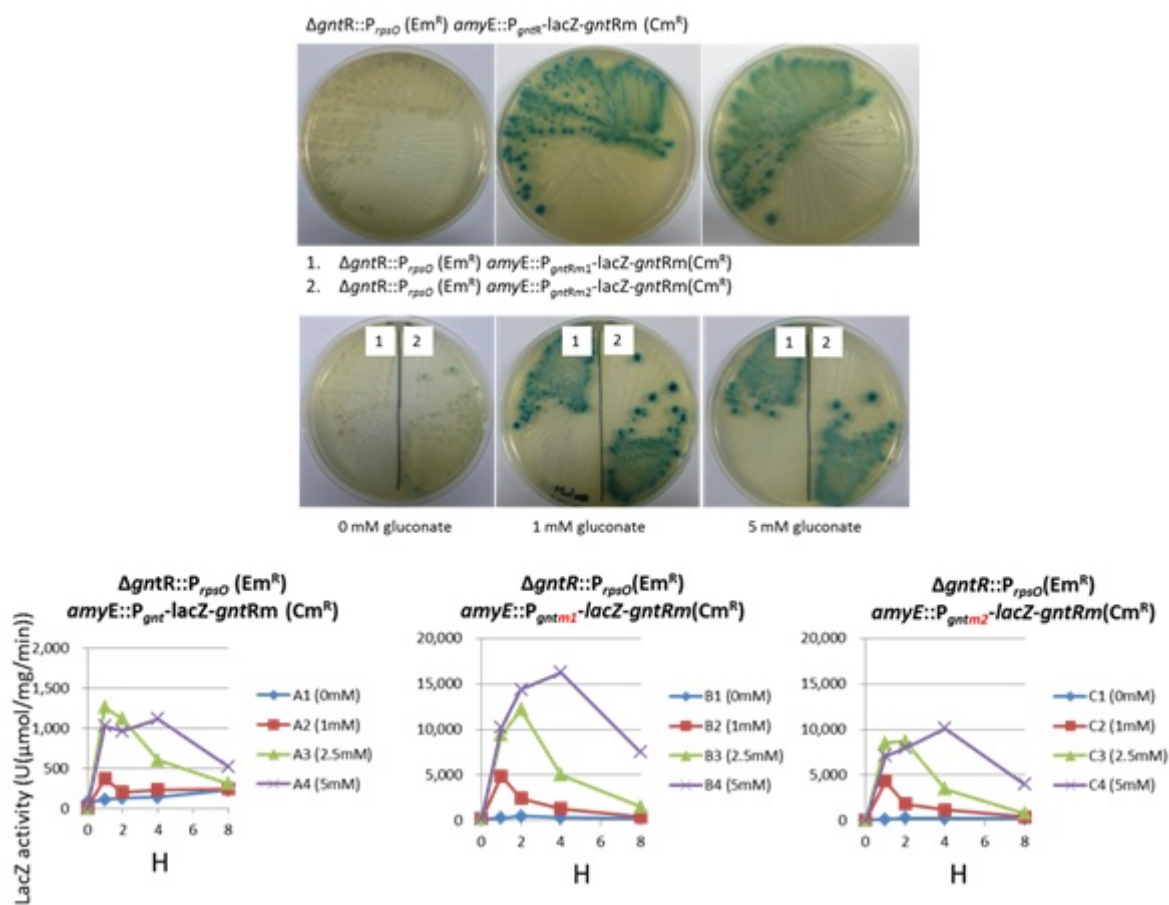
خاص با کنترل کارآمد سیستم‌های بیولوژیکی و مسیرهای بیوشیمیایی ضروری است (Drepper *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012). در نتیجه، دستیابی به یک ابزار مناسب جهت کنترل بیان ژن‌های باکتریایی به صورت دقیق و موقتی در پاسخ به محرک‌های خارجی به درک و دستکاری سیستم‌های بیولوژیکی پیچیده کمک می‌کند.

بر این اساس، از اپرون *gnt* در باکتری باسیلوس سوبتیلیس به دلیل ماهیت ذاتی برگشت پذیری‌اش و قابلیت تجزیه پذیری گلوکونات نه به عنوان منبع کربن بلکه به عنوان القاء‌کننده، جهت ایجاد اپرون مصنوعی برگشت پذیر استفاده شد. شواهد بدست آمده از مطالعه حاضر، به وضوح القاء ضربه‌ای در سیستم القائی مصنوعی در اثر اضافه کردن القاء‌کننده به محیط کشت نمونه‌های *m1* و *m2* را نشان داد. بعلاوه، عدم فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در نمونه‌های جهش یافته در عدم حضور القاء‌کننده بیانگر کارآمد بودن جهش‌های ایجاد شده در پروموتورهای مذکور و از بین رفتن پدیده CCR بود. تحقیقات مختلفی در زمینه پدیده بازدارندگی کربن در باکتری‌ها انجام گرفته است که با نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای مشابه، فسفریلاسیون مولکول‌های واسط *Hpr* و *Crh* جهت اتصال به پروتئین *CcpA* و تشکیل کمپلکس به منظور پدیده بازدارندگی کربن در اپرون *xyn* بررسی شد (Galiniere *et al.*, 1991).

lacZgntRm (Cm^R) مشاهده شد. با اضافه کردن ۵ میلی‌مولار القاء‌کننده به محیط کشت، بیشترین سطح فعالیت آنزیم در زمان (4h) در همه سویه‌ها دیده شد. با توجه به مقایسات انجام شده می‌توان گفت که با اضافه کردن غلظت ۵ میلی‌مولار از گلوکونات به محیط کشت، سلول باکتری قادر به تجزیه تمام آن نمی‌باشد و ژن هدف (*lacZ*) دیرتر فعال شده و اپرون به طور مداوم روشن می‌ماند. در حالی که، در غلظت پایین‌تر القاء‌کننده (۱ میلی‌مولار)، گلوکونات در طول بازه زمانی کوتاه‌تری کاملاً تجزیه شده سبب بازدارندگی مجدد از فعالیت آنزیم می‌گردد. در نتیجه، پروموتور در یک زمان مشخص در حضور القاء‌کننده تجزیه پذیر روشن و با تولید میزان کافی از محصول ژن گزارشگر (آنزیم بتاگالاکتوزیداز) خاموش می‌شود.

بحث

سیستم‌های بیان ژن تغییرپذیر به دلیل القاء و بازدارندگی برگشت‌پذیر ژن‌های هدف در هر زمان و کاهش اثرات پلئوتروپی ناشی از بیش‌بیان ژن‌ها، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. از سوی دیگر، سیستم‌های در دسترس موجود تنها سیستم‌های القاء شونده با دما، pH و نور می‌باشند و سیستم‌های القائی با مواد شیمیایی جهت استفاده در تولید انبوه متابولیت‌های خاص در صنعت وجود ندارد (Jana and Deb, 2005; Valdez-Cruz *et al.*, 2010). در این میان، تولید حداکثر متابولیت‌های



شکل ۳- بررسی کارکرد ژن گزارشگر *lacZ* با استفاده از آنالیزهای آنزیمی و فنوتیپی. شکل بالا، آزمون غربالگری کلونی‌های آبی-سفید را در غلظت‌های (۰، ۱ و ۵ میلی‌مولار از گلوکونات به همراه گلوکز) در ۳ سویه جهش یافته نشان می‌دهد. در شکل پائین، نتایج حاصل از آزمون آنزیمی بتاگالاکتوزیداز را در عدم حضور القاءکننده و در حضور غلظت‌های متفاوتی از گلوکونات (۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) بعلاوه ۵ میلی‌مولار منبع کربن گلوکز مشاهده می‌شود. نمونه برداری از سلول‌های باکتریایی در زمان‌های ۰h، 1h، 2h، 4h و 8h انجام شد.

Figure 3- Check the functionality of *lacZ* reporter using phenotyping and enzymatic analysis. The upper part of the figure indicates the blue/white colonies in three mutant strains under different concentration of gluconate (0, 1 and 5 mM) with glucose as carbon source. The lower part shows the dendrograms of *lacZ* activity of each strain based on absence and presence of 0, 1, 2.5 and 5 mM gluconate in addition of 5 mM glucose. Time sampling was done in 0h, 1h, 2h, 4h and 8h after addition of gluconate.

توالی *cre* در اپرون *xyn* می‌گردد، اما هیچ اثری در اتصال *CcpA* به تنهائی به توالی *cre* ندارد. در تحقیق دیگری، بیان اپرون *dra-nupC-pdp* تحت

نتایج نشان داد که مولکول واسط فروکتوز ۱ و ۶ بی فسفات سبب اتصال کمپلکس های *P-ser-Crh/CcpA* و *P-ser-Hpr/CcpA* به

کربن اپرون *gnt* نقشی ندارد و فرآیندهای دفع القاءکننده نیز موثر نمی‌باشند.

مطالعات متعددی در زمینه ساخت اپرون‌های مصنوعی با هدف افزایش و بهینه‌سازی یک متابولیت خاص انجام شده است. به عنوان مثال، در پژوهشی، ژن‌های دخیل در مسیر سنتز ریوفلاوین (*ribA*, *ribB*, *ribD*, *ribE*, *ribC*) را در یک اپرون مصنوعی تحت کنترل پروموتور القائی *trc* جهت افزایش تولید این ماده قرار دادند. در نتیجه، بعد از مهندسی اپرون میزان تجمع ریوفلاوین به میزان ۲۲۹/۱ میلی‌گرم بر لیتر در باکتری *E. coli* افزایش یافت (Lin et al., 2014). در مطالعه‌ای مشابه، میزان بیان ژن گزارشگر CAT تولیدکننده آنزیم کلرامفنیکل استیل ترانسفراز در سویه 1A423 باکتری باسیلوس سوبتیلیس بررسی شد (Fujita and Fujita, 1987). نتایج نشان داد که در ۱۳ سلول نوترکیب مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با اضافه کردن گلوکونات، میزان سنتز ژن CAT از ۱/۱ به ۱/۶ برابر افزایش یافت. در مطالعه دیگری، سه جهش‌یافته باکتری باسیلوس سوبتیلیس جهت ارزیابی توانایی اتصال گلوکونات به اپراتور توسط بررسی شدند (Yoshida et al., 1995). در این پژوهش، پلاسمیدهای pGNT83D و pGNT177 جهش یافته مشتق شده از باکتری اشیریشیا کولی، با اضافه کردن گلوکونات، سنتز ژن CAT را به میزان بالائی نشان دادند که دلالت بر نیاز مبرم به حضور آمینو اسیدهای ۲۲۱ تا ۲۴۳ جهت سنتز پروتئین

تأثیر پدیده بازدارندگی کاتابولیتی کربن مطالعه شد (Zeng et al., 2000). نتایج بدست آمده بیانگر وجود یک توالی پاسخ دهنده کاتابولیتی سیس اکتینگ واقع در ۴۶ جفت باز در پائین دست نقطه شروع رونویسی بود. بعلاوه، در اثر ایجاد جهش نقطه‌ای در توالی *cre* منجر به غیر فعال شدن پدیده بازدارندگی کاتابولیتی کربن در اپرون *dra-nupC-pdp* شد.

در مطالعه دیگری، محققین بیان نمودند که علاوه بر پدیده CCR، فرآیندهای دفع القاءکننده غیر وابسته به پروتئین CcpA و کنترل فعالیت تنظیم کننده‌ها توسط فسفریلاسیون منجر به غیر فعال سازی مسیرهای جایگزین در حضور سوبستراهای ترجیحی همچون گلوکز می‌گردند (Titgemeyer and Bruckner, 2002).

در پژوهشی، محققین ثابت کردند که بازدارندگی کاتابولیتی کربن در اپرون *gnt* تحت تأثیر پدیده دفع القاء کننده نمی‌باشد (Fujita and Miwa, 1994). آنها بیان نمودند که پروتئین CcpA به عنوان عامل ضروری پدیده CCR در اپرون *gnt* نقش بازی می‌کند. بعلاوه، جهش ایجاد شده در آلل ژن *sigA* بر روی پدیده CCR تأثیر گذاشت.

در پژوهشی، بازدارندگی کاتابولیتی در اپرون *gnt* باکتری باسیلوس سوبتیلیس با استفاده از ایجاد جهش در مولکول His-15 مورد بررسی قرار گرفت (Rizer et al., 1998). آنها ثابت کردند که GntR، پروتئین بازدارنده اپرون *gnt* در باکتری باسیلوس سوبتیلیس، در بازدارندگی کاتابولیتی

در واقع، با اضافه کردن القاء‌کننده به سیستم القائی، آنزیم مسئول واکنش مورد نظر بیان می‌شود و سبب رشد نرمال می‌گردد. اما زمانی که گلوکز به عنوان منبع کربن مصرف شود (بعد از تولید کافی از سلول‌ها)، واکنش مورد نظر به طور خودکار جهت تجمع متابولیت در بیشترین سطح، خاموش می‌گردد. اگر سلول‌ها نیاز به مسیر بیوشیمیایی مورد نظر جهت زنده ماندن داشته باشند، می‌توان با اضافه کردن القاء‌کننده، به طور موقتی واکنش را ادامه داد.

نتایج بدست آمده از آزمایشات ما به طور واضح نشان داد که سطح بیان ژن گزارشگر lacZ با تنظیم زمان و اضافه کردن غلظت‌های متفاوتی از گلوکونات تغییر می‌کند. این امر دلالت بر این دارد که مکانیسم القاء ضربه‌ای می‌تواند منجر به خلق یک سیستم القائی یا بازدارندگی مصنوعی در باکتری باسیلوس سوبتیلیس یا گونه‌های خویشاوند شود. امید است که در آینده‌ای نزدیک از این سیستم‌های تنظیمی برگشت پذیر به عنوان ابزار جدید و ارزشمندی در زمینه مهندسی متابولیک، تخمیر و تبدیل زیستی از جمله تولید سوخت‌های زیستی استفاده شود.

GntR داشت. علاوه بر آن، فعالیت بالای آنزیم CAT می‌تواند دلالت بر حضور مداوم بازداننده در سلول حتی در عدم حضور القاء‌کننده را نیز داشته باشد. از خصوصیات بارز ژن گزارشگر lacZ نسبت به ژن CAT، می‌توان به طول بیشتر ژن lacZ (استخراج شده از باکتری *E. coli* رمز کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز) حدود ۳۰۰۰ جفت باز نسبت به CAT اشاره کرد. ژن lacZ در مطالعات بیولوژیکی کاربرد فراوانی دارد و به سهولت قابل دستکاری ژنتیکی است. بعلاوه، آنزیم بتاگالاکتوزیداز نسبت به CAT، نیمه عمری پائین‌تری در حدود ۱۵ دقیقه دارد (Arvidson *et al.*, 1991).

به طور کلی، در مهندسی متابولیک ممکن است نیاز به خاموش کردن یک مسیر متابولیکی ضروری به منظور تولید محصولات خاص با کارایی بالا باشد. اما این کار معمولاً غیر ممکن است به این علت که مسیر بیوشیمیایی مورد نظر برای رشد سلول ضروری است (Aristidou and Penttila, 2000). با استفاده از سیستم‌های القائی موقتی می‌توانیم یک مسیر بیوشیمیایی ضروری را جهت تجمع متابولیت مورد نظر به طور موقتی خاموش کنیم.

منابع

- Aristidou A, Penttilä M (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11: 187-198.
- Arvidson DN, Youderian P, Schneider TD, Stormo GD (1991). Automated kinetic assay of beta-galactosidase activity. *Biotechniques* 11: 733-4.
- Balleza E, Lopez-Bojorquez LN, Martínez-Antonio A, Resendis-Antonio O, Lozada-Chávez I, Balderas-Martínez YI, Collado-Vides J (2009). Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 133-151.

- Brückner R, Titgemeyer F (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS microbiology letters* 209: 141-148.
- Cho HS, Seo SW, Kim YM, Jung GY, Park JM (2012). Engineering glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for switching control of glycolysis in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 2612-2619.
- de Vries J, Wackernagel W (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 2094-2099.
- Drepper T, Krauss U, Zu Berstenhorst SM, Pietruszka J, Jaeger KE (2011). Lights on and action! Controlling microbial gene expression by light. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 23-40.
- Fabret C, Dusko Ehrlich S, Noirot P (2002). A new mutation delivery system for genome-scale approaches in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 46: 25-36.
- Freyre-González JA, Manjarrez-Casas AM, Merino E, Martínez-Nuñez M, Perez-Rueda E, Gutiérrez-Ríos RM (2013). Lessons from the modular organization of the transcriptional regulatory network of *Bacillus subtilis*. *BMC Systems Biology* 7: 127.
- Fujita Y, Fujita T, Miwa Y, Nihashi JI, Aratani Y (1986). Organization and transcription of the gluconate operon, *gnt*, of *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry* 261: 13744-13753.
- Fujita Y, Miwa Y (1989). Identification of an operator sequence for the *Bacillus subtilis gnt* operon. *Journal of Biological Chemistry* 264: 4201-4206.
- Fujita Y, Miwa Y (1994). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon mediated by the CcpA protein. *Journal of Bacteriology* 176: 511-513.
- Fujita YA, Fujita T (1987). The gluconate operon *gnt* of *Bacillus subtilis* encodes its own transcriptional negative regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84: 4524-4528.
- Galinier A, Deutscher J, Martin-Verstraete I (1999). Phosphorylation of either Crh or HPr mediates binding of CcpA to the *Bacillus subtilis xyn cre* and catabolite repression of the *xyn* operon. *Journal of Molecular Biology* 286: 307-314.
- Griffith KL, Wolf RE (2002). Measuring β -galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 397-402.
- Ishii T, Yoshida K, Terai G, Fujita Y, Nakai K (2001). DBTBS: a database of *Bacillus subtilis* promoters and transcription factors. *Nucleic Acids Research* 29:278-280.
- Jana S, Deb JK (2005). Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 289-298.
- Lee JM, Lee J, Kim T, Lee SK (2013). Switchable gene expression in *Escherichia coli* using a miniaturized photobioreactor. *PloS one* 8: e52382.
- Lee JW, Na D, Park JM, Lee J, Choi S, Lee SY (2012). Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nature Chemical Biology*, 8: 536-546.

- Lee SK, Keasling JD (2006). Propionate-regulated high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 93: 912-918.
- Lin Z, Xu Z, Li Y, Wang Z, Chen T, Zhao X (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. *Microbial Cell Factories* 13: 1.
- Marciniak BC, Pabijaniak M, de Jong A, Dühning R, Seidel G, Hillen W, Kuipers OP (2012). High- and low-affinity *cre* boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics* 13: 401.
- Miwa Y, Fujita Y (1988). Purification and characterization of a repressor for the *Bacillus subtilis gnt* operon. *Journal of Biological Chemistry* 263: 13252-13257.
- Miwa Y, Nagura K, Eguchi S, Fukuda H, Deutscher J, Fujita Y (1997). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Molecular Microbiology* 23: 1203-1213.
- Na D, Yoo SM, Chung H, Park H, Park JH, Lee SY (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* using synthetic small regulatory RNAs. *Nature Biotechnology* 31: 170-174.
- Nicolas P, Mäder U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bessières P (2012). Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science* 335: 1103-1106.
- Reizer A, Deutscher J, Saier MH, Reizer J (1991). Analysis of the gluconate (*gnt*) operon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 5: 1081-1089.
- Reizer J, Hoischen CF, Titgemeyer C, Rivolta R, Rabus J, Stulke D, Karamata MH, Saier JR, Hillen W (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular Microbiology* 27: 1157-1169.
- Rinas U (1996). Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* 12: 196-200.
- Tohidfar M, Khosravi S (2014). Challenges for releasing Bt transgenic plants. *Journal of Agricultural Biotechnology* 7:33-54.
- Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Perez NO, Ramirez OT, Trujillo-Roldan MA (2010). Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories* 9: 18.
- Zeng X, Galinier A, Saxild HH (2000). Catabolite repression of *dra-nupC-pdp* operon expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146(11), 2901-2908.
- Zhang SS, Chen D, Lu Q (2011). An improved protocol and a new grinding device for extraction of genomic DNA from microorganisms by a two-step extraction procedure. *Genetics and Molecular Research* 11: 1532-1543.
- Zhou L, Niu DD, Tian KM, Chen XZ, Prior BA, Shen W, Wang ZX (2012). Genetically switched D-lactate production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering* 14: 560-568.

Assessment of artificial operon in *Bacillus subtilis* to control transcription**Majidian P.^{*1}, Najafi H.², Yoshida K.³, Ranjbar G.⁴, Nematzadeh G.⁵**

¹ PhD candidate, Plant Breeding and Biotechnology Department, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

² Assistant professor, System Biology Department, Plant Breeding and Biotechnology Department, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Farah Abad Road, Sari, Iran.

³ Full professor, Agrobioscience Department, Kobe University, Japan.

⁴ Associate professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Sari, Iran.

⁵ Full professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Sari, Iran.

Abstract

In this study, we proposed the artificial operon which is capable of reversible transcriptional regulation control in *Bacillus subtilis*. Firstly, the *cre_{up}* and *cre_{down}* were mutated to release from CCR phenomenon. Then, the structural genes of *gnt* operon were placed under the control of constitutively strong promoter to degrade gluconate constitutively. In addition, the reporter gene (*lacZ*) was introduced under control of *gnt* promoters to evaluate functionality of the artificial operon. The results of pulse induction system showed no enzyme activity of each strain in the absence of inducer. By addition of 1 mM gluconate, the highest enzyme activity was shown at 1h after addition of inducer, and then the inducer degraded to turn off the operon. The maximum activation of enzyme was observed in 2h and 4h after addition of 2.5 and 5 mM gluconate into culture media, respectively. Our data indicated that the longer degradation of inducer and higher enzyme activity was appeared by more concentration of gluconate as well as growth arrest. It is suggested to use the pulse induction system and reversible artificial operon to achieve huge amount of special metabolite at short period of bacterial growth.

Key words: *Bacillus subtilis*, Artificial operon, Gluconate.

* Corresponding Author: Majidian P.

Tel: 09111536288

Email: parastoomajidian@yahoo.com