جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های ژن انتقال‌دهنده هگزوز ۷ (HXT7) از مخمر ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی

سولماز عزیزی (M.Sc)، علیرضا تاری‌نژاد*(Ph.D)

دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

چکیده

سابقه و هدف: مخمر ساکارومایسس سروزیه از جمله مهم‌ترین میکروارگانیسم‌ها برای تولید اتانول است و از طریق تخمیر الکلی باعث تولید اتانول می‌شود. این به دلیل کارایی بالای این موجود در جذب و تخمیر قندهای هگزوز می‌باشد. مخمر ساکارومایسس سرویزیه دارای ۲۰ ژن کدکننده‌ی پروتئین‌های انتقال‌دهنده‌ی هگزوز می‌باشد که شامل HXT1-HXT17، GAL2، SNF3 و RGT2 است. از میان این خانواده ژنی، هفت ژن HXT1-HXT7 نقش مهمی در فرآیند تولید الکل دارند. محققین ثابت کردند که با افزایش میزان بیان این ژن‌ها سرعت تخمیر الکلی افزایش و در نتیجه‌ی آن میزان تولید اتانول افزایش می‌یابد هدف این مطالعه شناسایی و جداسازی ژن HXT7 از ژنوم مخمر ساکارومایسس سرویزیه از طریق PCR و همسانه‌سازی آن در وکتور دارای پروموتور بیانی مناسب به منظور پایه‌ای برای طراحی پلاسمید بیانی و نهایتاً مخمر نوترکیب بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق جداسازی ژن HXT7 با پرایمرهای اختصاصی ژن از طریق PCRصورت گرفت و با انجام لیگاسیون قطعه‌ی تکثیر یافته به پلاسمید pGEM-T کلون شد و به باکتری E. coli ترانسفرم گردید و در نهایت برای تایید نهایی قطعات کلون شده در پلاسمیدهای نوترکیب به توالی‌یابی فرستاده شدند.

یافته‌ها: توالی نوکلئوتیدی چارچوب بازخوانی این ژن به طول bp ۱۷۱۳ بوده و یک پروتئین با ۵۷۰ اسیدآمینه را رمز می‌کند. وزن مولکولی تخمین زده شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب ۶۲/۷۲۵ کیلودالتون و ۷/۸۹ است.

نتیجه‌گیری: توالی پروتئینی به‌دست آمده شباهت زیادی با Hxt7p سویه‌های دیگر ساکارومیسس سرویزیه موجود در NCBI دارد و بالاترین درصد تشابه را با Hxt7p ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی S288C ثبت شده در NCBI با کد دسترسی NP010629.3 دارد.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، ساکارومیسس سرویزیه، ژن HXT7، پلاسمید نوترکیب

مقدمه

با توجه به محدودیت سوخت‌های فسیلی و به علت مصرف روزافزون آن‌ها، تولید سوخت‌های زیستی اهمیت ویژه‌ای یافته است. اولین تکنولوژی تولید سوخت‌های زیستی در مقیاس صنعتی، مربوط به تولید بیواتانول بوده است. روش متداول تولید بیواتانول استفاده از روش‌های تخمیری است که با استفاده از سوبستراهای قندی انجام می‌گیرد [۱،۲]. امروزه از روش‌های مختلف مولکولی نظیر تکنیک کلونینگ در ایجاد استرین‌های ساکارومیسس سرویزیه جهت بهبود راندمان تولید الکلی طی فرآیند تخمیر الکلی استفاده می‌شود [۳،۴].

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۴۳۲۷۵۷۲-۰۴۱

Email: atarinejad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۳تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۱۷

Archive of SID

www.SID.ir

اکثر مخمرها قندهای شش کربنه گلوکز، فروکتوز و مانوز را برای تخمیر ترجیح می‌دهند که با افزایش غلظت این قندها و سرعت گلیکولیک میزان تولید الکل نیز افزایش می‌یابد. ورود گلوکز به سلول‌های مخمر از طریق انتشار تسهیل شده و از طریق یکسری از پروتئین‌های غشایی که HXT نامیده می‌شود انجام می‌شود. بر طبق اطلاعات موجود خانواده‌ی انتقال‌دهنده‌ی هگزوزها در ساکارومیسس سرویزیه شامل پروتئین‌های Hxt1p-Hxt17p، Gal2p، Snf3p و Rgt2p می‌باشد. با افزایش فعالیت این انتقال‌دهنده‌ها، تجمع اتانول یا اسید لاکتیک در سلول‌ها بیش‌تر می‌شود. HXT1-HXT7 جزء مهم‌ترین ناقلین هستند و از نظر متابولیسمی به هم شباهت دارند و با هم در ارتباط هستند. GAL2 برای انتقال گالاکتوز، SNF3 و RGT2 به عنوان سنسور گلوکز عمل می‌کنند. این خانواده‌ی ژنی الگوی بیان متفاوتی داشته و تنظیم آن‌ها به شدت تحت ویژگی کینتیک انتقال‌دهنده‌ها می‌باشد و گلوکز اولین فاکتور کنترل‌کننده‌ی بیان این ژن‌ها می‌باشد [۵،۶].

Hxt6p و Hxt7p یک جفت انتقال‌دهنده‌ی هگزوز هستند. شباهت این دو پروتئین به هم خیلی زیاد است و هر دوی آن‌ها شامل ۵۷۰ اسیدآمینه هستند این دو ژن پشت سر هم روی بازوی راست کروموزوم IV پایین دست HXT3 قرار دارند. شباهت بین این دو ژن bp96 قبل از کدون آغاز شروع می‌شود و حضور این ژن‌ها بدین صورت در اکثر استرین‌های آزمایشگاهی گزارش شده است. Hxt7p بیش‌ترین میل ترکیبی را با گلوکز نسبت به سایر ژن‌های این خانواده دارد و میزان خیلی کم گلوکز را (۱ تا ۲میکرومولار) قادر به جذب است [۷،۸] و میزان بیان آن در شرایط یکسان نسبت به سایر ژن‌های این خانواده بیش‌تر است. این ژن در منابع کربنی غیرتخمیری از جمله گلیسرول و اتانول و هم‌چنین مالتوز و گالاکتوز به میزان زیاد بیان می‌شود [۹].

سیگنالینگ گلوکز به‌وسیله‌ی سنسورهای Snf3 و Rgt2 انجام می‌شود که در این مسیر یک سرکوب کننده رونویسی به نام Rgt1 نقش مهمی دارد. در غیاب گلوکز Rgt1 به پروموتور ژن‌های HXT متصل و از رونویسی این ژن‌ها به‌وسیله یک‌سری پروتئین دیگر از جمله Cyc8، Tup1، Mth1 و Std1 جلوگیری می‌کند [۱۰]. زمانی که گلوکز در محیط وجود دارد به سنسورهای Snf3 و Rgt2 متصل و منجر به فسفوریلاسیون Mth1 و Std1 می‌شود. سپس Mth1 و Std1 در کمپلکس (SCFGr1-ubiquitin-Ligase) یوبی‌کویئتینه شده و در نهایت در S ۲۶ پروتئوزوم تخریب و تجزیه می‌شوند. از طرفی pKA باعث فسفریلاسیون Rgt1 شده و در نتیجه‌ی آن Rgt1 فسفریله شده از پروموتور ژن‌ها جدا و رونویسی ژن‌های HXT صورت می‌گیرد [۱۱].

هدف این تحقیق کلون ژن HXT7 با توالی صحیح در داخل وکتور pGEM-T و بررسی آن از نظر ترادف ژنی و آمینواسیدی می‌باشد هم‌چنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی به‌دست آمده با استفاده از بررسی‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شده و بررسی‌های فیلوژنتیکی با سایر ژن‌های این خانواده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت مخمر ساکارومیسس سرویزیه. سویه‌ی مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی ایرانی بوده که در نانوایی و شیرینی‌پزی استفاده می‌شود و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیده است. پس از کشت مخمر در محیط اختصاصی YPD حاوی ۱۰ gr دکستروز، ۲۰gr پپتون، ۱۰gr عصاره‌ی مخمر و ۱۵ gr آگار و رشد کلونی‌ها، تک کلونی‌ها به محیط کشت مایع YPD جهت استخراج DNA منتقل و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای°C ۳۰ قرار داده و از آن جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد.

جداسازی DNA . سوسپانسیون حاصل از کشت مخمرها در محیط کشت مایعYPD ابتدا توسط سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰rpm رسوب داده شد و بر روی رسوب حاصله بافر Harjuکه حاوی ۲-X Triton ۱۰۰٪، ۱٪ SDS، mM ۱۰۰NACL، ۱۰ mM Tris-Hcl (pH=۰/۸)، mM EDTA

Archive of SID

www.SID.ir

است اضافه شد [۱۲]، تیوب‌ها در اتانول مطلق سرد به مدت ۲ دقیقه و سپس در دمای ۹۵ °C یک دقیقه قرار گرفتند، این مرحله تکرار و ورتکس انجام شد در ادامه با افزودن کلروفرم، ورتکس و سانتریفیوژ، فاز بالایی به تیوب جدید منتقل شده و بر روی آن اتانول مطلق اضافه شد و در دمای ۲۰- °C قرار داده شد، در نهایتDNA مخمر با استفاده از روش‌های رسوب و خالص‌سازی اسیدنوکلئیک خالص شده و در ۵۰-۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید.

طراحی آغازگر و انجام PCR. ابتدا آغازگرهای مناسب به منظور جداسازی ژن HXT7 با توالی زیر طراحی گردید.

primerF: 5′ -ATGTCACAAGACGCTGCTAT-3′

primerR: 5′ -TTATTTGGTGCTGAACATTC-3′

برنامه‌ی انجام PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴ °C و انجام ۳۵ سیکل متوالی (۹۴ °C یک دقیقه، ۴۸°C به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۸۰ ثانیه) انجام شد.

همسانه‌سازی در وکتور pGEM-T . بعد از تکثیر ژن توسط PCR و خالص‌سازی آن، عمل لیگاسیون بین ژن و پلاسمید pGEM-T صورت گرفت. پلاسمید pGEM-T شامل پروموتورهای T7 و SP6 پلیمراز در طرفین ناحیه‌ی سایت برشی (MCS) است و ژن انتخابگر آن برای گزینش E. coli ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد هم‌چنین یک مکان ژنی دارای کاست ژنی حاوی β- گلوکونیداز تحت پروموتورهای SP6و T7 در طرفین سایت برشی اختصاصی (MCS) جهت گزینش به روش Blue-White وجود دارد. پس از انجام لیگاسیون و ایجاد پلاسمید نوترکیب، ترانسفورماسیون به وسیله‌ی شوک حرارتی به باکتری E. coli نژاد Top ۱۰ انجام شد. در مرحله‌ی بعد باکتری‌ها روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-GAL کشت داده شدند، و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ °C، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب انتخاب و مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند. در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب انجام گرفته و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌ها برای توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال گردید.

بررسی توالی. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam و ProtScale تعیین گردید.

جدول۱. میزان یکسانی و شباهت توالی اسیدآمینه‌ای Hxt7p با سایر توالی‌های اسیدآمینه‌ای سویه‌های دیگر مخمر ساکارومیسس سرویزیه مورد استفاده در تهیه همردیف‌سازی مقایسه‌ای و ساخت درخت فیلوژنتیکی

درصد یکسانی	درصد تشابه	نام سویه	نام اختصاصی ژن	شماره دستیابی
۱۰۰	۹۹	S. c S288c	Hxt7p	NP 010629.3
۱۰۰	۹۹	S. c S288c	Hxt6p	NP 010630.1
۱۰۰	۹۹	S. c EC1118	Hxt7p	CAY78842.1
۱۰۰	۹۹	S. c x S kudriavzevii VIN7	Hxt7p	EHN07909.1
۹۹	۹۶	S. c YJM789	Hxt7p	EDN60673.1
۸۷	۹۹	S. c Vin 13	Hxt7p	EGA76253.1
۸۸	۹۶	S. c AWR1796	Hxt7p	EGA75554.1
۸۳	۱۰۰	S. c S288c	Hxt4p	NP 011960.2
۷۳	۹۹	S. c S288c	Gal2p	NP 013182.1
۷۶	۹۸	S. c S288c	Hxt3p	NP 010632.1
۷۱	۹۸	S. c S288c	Hxt9p	NP 012316.1
۷۱	۹۸	S. c S288c	Hxt11p	NP 014486.1
۶۸	۹۸	S. c x S kudriavzevii VIN7	Hxt8p	EHN02199.1

Archive of SID

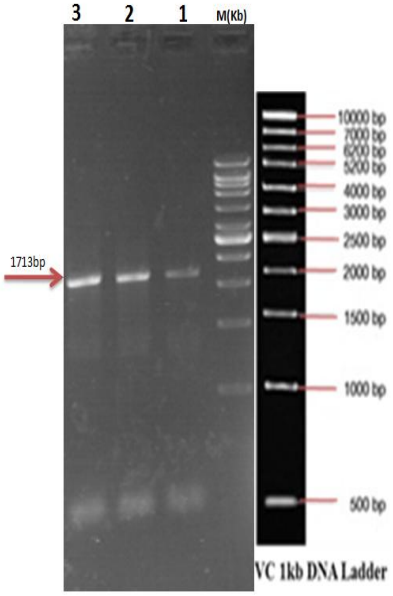
www.SID.ir

توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از سویه‌های دیگر ساکارومایسیس سرویزیه که بیش‌ترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف Hxt7p و انواع ژن‌هایی انتقال‌دهنده هگزوز با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 انجام شد. توالی‌های پروتئینی از سویه‌های دیگر ساکارومایسیس سرویزیه که برای تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند به همراه شماره دست‌یابی در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

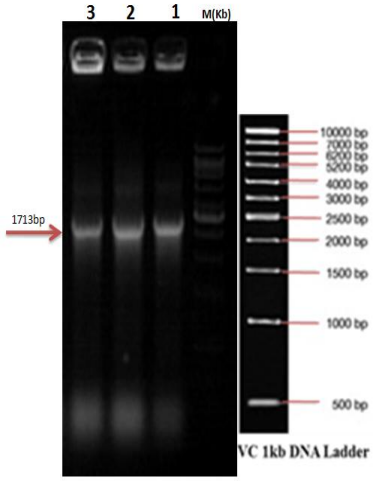
نتایج

پس از استخراج DNA ژنومی مخمر، PCR به منظور تکثیر ژن HXT7 با استفاده از آغازگرهای طراحی شده اجرا گردید. محصول PCR یک باند ۱۷۱۳ جفت بازی روی ژل آگارز نشان داد، که مطابقت با ژن HXT7 موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دست‌یابی NP010629.3 داشت (شکل ۱). پس از خالص‌سازی، محصول PCR در وکتور pGEM-T کلون گردید. برای تایید قطعه‌ی کلون شده، PCR کلونی از کلونی‌های سفید (شکل ۲) و PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های ترانسفورم شده انجام شد (شکل ۳). نتایج نشان داد که ژن HXT7 به طور صحیح در پلاسمید pGEM-T کلون شده است. نمونه‌های کلون شده بعد از الکتروفورز و اطمینان از تشکیل باند مورد نظر برای تعیین توالی با دو پرایمر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال گردید.

شکل۳. تصویر الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HXT7 روی پلاسمید pGEM-T+HXT7. ۱، ۲ و۳ سه تکرار مستقل هستند، M (Kb) مارکر شکل ۴. تصویر شماتیک پلاسمید نوترکیب حاصل از کلون کردن DNA ژن HXT7 در پلاسمید pGEM-T. پروموتورهای T7 و SP6 امکان مشخص کردن توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی الحاقی را فراهم می‌کنند.



شکل۱. تصویر الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *HXT7* روی DNA ساکارومیسس سرویزیه. ۱، ۲ و ۳ سه تکرار مستقل هستند، M(Kb) مارکر

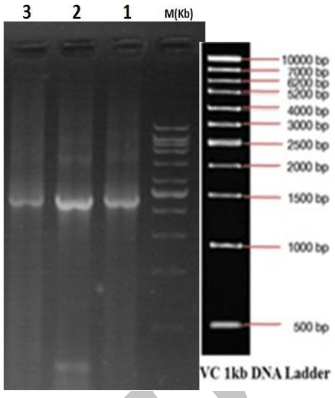


شکل۲. تصویر الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *HXT7* روی کلونی pGEM-T+*HXT7* . ۱، ۲ و۳ سه تکرار مستقل هستند، M(Kb) مارکر

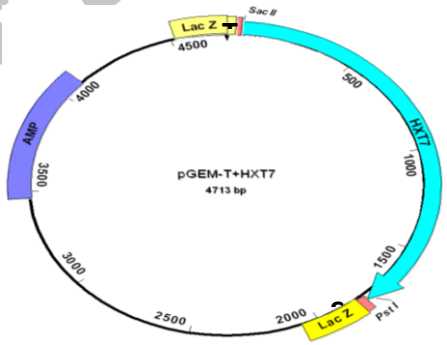
نتایج توالی یابی با دو پرایمر T7 و SP6 برای ژن HXT7 بر روی وکتور pGEM-T نمایانگر این بود که موقعیت قرارگیری آن روی سایت برشی اختصاصی (MCS) وکتور در

www.SID.ir

جهت معمولی می‌باشد و کدون آغاز ATG در سمت T7 قرار دارد و یک پروتئین با ۵۷۰ اسیدآمینه را رمز می‌نماید (شکل ۴).



شکل۳. تصویر الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *HXT7* روی پلاسمید pGEM-T+*HXT7*. ۱، ۲ و ۳ سه تکرار مستقل هستند، M(Kb) مارکر



شکل ۴. تصویر شماتیک پلاسمید نوترکیب حاصل از کلون کردن DNA ژن *HXT7* در پلاسمید pGEM-T. پروموتورهای T7 و SP6 امکان مشخص کردن توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی الحاقی را فراهم می‌کنند.

بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین Hxt7p با فرمول مولکولی C2881H4432N712O793S31، به ترتیب برابر ۶۲/۷۲۵ کیلودالتون و ۷/۸۹ بوده و شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۷/۲۱ می‌باشد که در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود. همچنین شاخص Aliphatic (به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه عمر این پروتئین در محیط درون شیشه‌ای محاسبه شده به‌وسیله برنامه ProtParam، به ترتیب ۹۵/۷۵ و حدوداً ۲۰ ساعت محاسبه گردید که بیانگر پایداری و مقاوم بودن پروتئین در برابر حرارت می‌باشد [۱۳] . شاخص Hydropathy محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolittle نشان داد که پروتئین Hxt7p، به دلیل خاصیت احیاءکنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز می‌باشد (شکل ۵) [۱۴] و از کل اسیدهای آمینه، ۴۴ اسیدآمینه با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۴۶ می‌باشد. همچنین پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی این پروتئین با برنامه PSORT نشان داد که این پروتئین از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیت آن درون غشای پلاسمایی است و از ۱۲ دومین تشکیل شده است (شکل ۶).

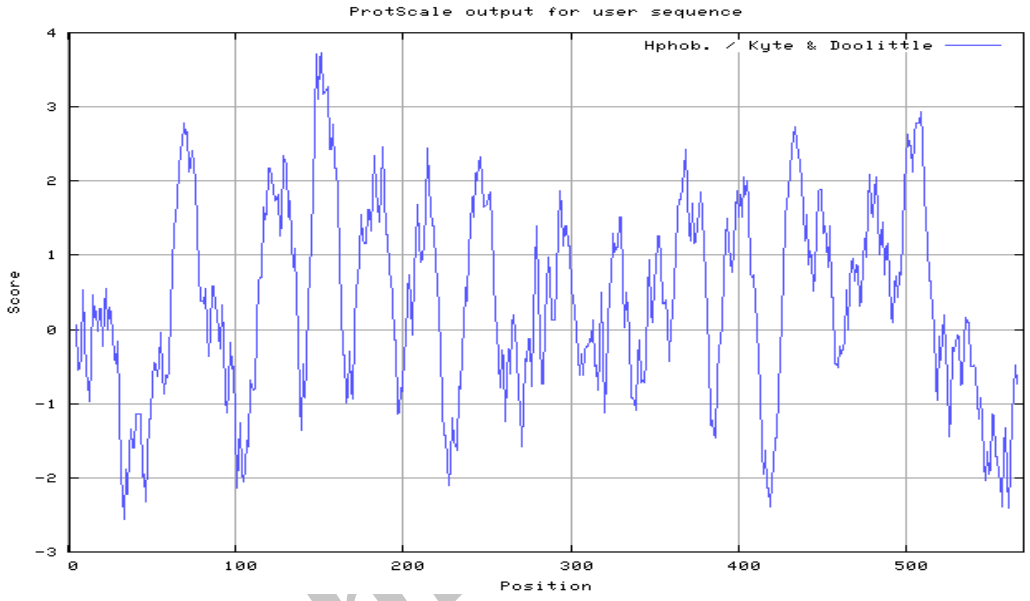
بررسی ساختار دوم پروتئین Hxt7p با استفاده از PSIpred نشان داد که این پروتئین حاوی ۷ رشته β و ۲۳ مارپیچ α می‌باشد (شکل ۷).

توالی پروتئینی به‌دست آمده از Hxt7p با سایر Hxt7p از سویه‌های دیگر مخمر ساکارومیسس سرویزیه که بیش‌ترین شباهت را داشتند انتخاب و با استفاده از برنامه Multialign مورد مقایسه قرار گرفتند (شکل ۸) و مشاهده شد که پروتئین به‌دست آمده بالاترین تشابه را با Hxt7p از مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی S288c به میزان ۹۹٪ تشابه و ۱۰۰٪ یکسانی دارد و تنها تفاوت این دو پروتئین در اسیدآمینه ۴۴۸ (Ala/Pro) است همچنین با ژن Hxt6p از مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی S288c به میزان ۹۹٪ تشابه و ۱۰۰٪ یکسانی دارد و تفاوت این دو پروتئین در دو اسیدآمینه است و نیز سویه‌های S. c EC1118، S. c. x S kudriavzevii VIN7، به میزان ۹۹٪ تشابه (۱۰۰٪ یکسانی) با ژن Hxt7p سویه‌ی ایرانی دارند و تفاوت آن‌ها در ۲ اسیدآمینه است (جدول ۱). درخت فیلوژنتیکی هم که با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شده است نشان می‌دهد پروتئین مورد بررسی ارتباط خیلی نزدیک با سایر پروتئین‌های همتای خود در سویه‌های دیگر مخمر

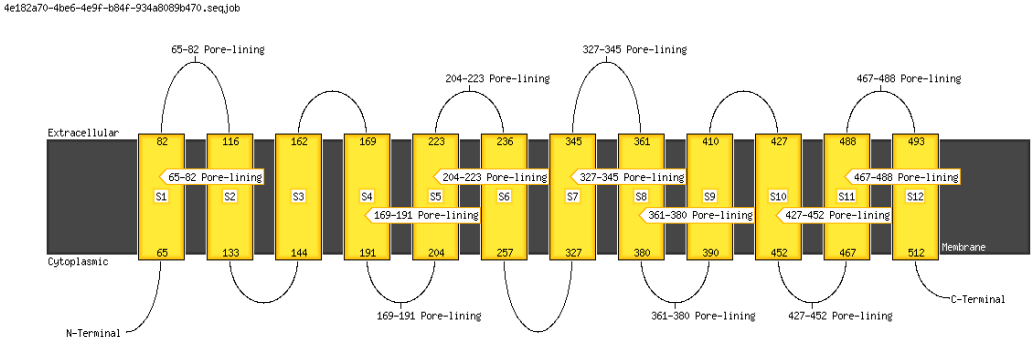
Archive of SID
www.SID.ir

ساکارومیسس سرویزیه دارد و بیش‌ترین تشابه و نزدیکی را با پروتئین‌های Hxt7p و Hxtp6 از سویه‌ی S288c دارد (شکل ۹).

هم‌چنین به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی آنالیز کلاستر توالی نوکلئوتیدی ژن HXT7 از مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی ایرانی با سایر ژن‌های خانواده‌ی انتقال‌دهنده‌های هگزوز انجام شد. بر این اساس مشخص شد ژن HXT7 سویه‌ی ایرانی بیش‌ترین شباهت و نزدیکی را با ژن‌های HXT7 و HXT6 دارد و کم‌ترین تشابه را با سنسورهای گلوکز یعنی SNF3 و RGT2 دارد (شکل ۱۰). هم‌چنین نتایج pBLAST در سطح پروتئینی نشان داد پروتئین مورد بررسی با Hxt4p، Hxt3p، Hxt9p، Hxt11p و Hxt8p به ترتیب شباهت ۱۰۰٪ (یکسانی ۸۳٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۷۶٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۷۱٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۷۱٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۶۸٪) دارد (جدول ۱).

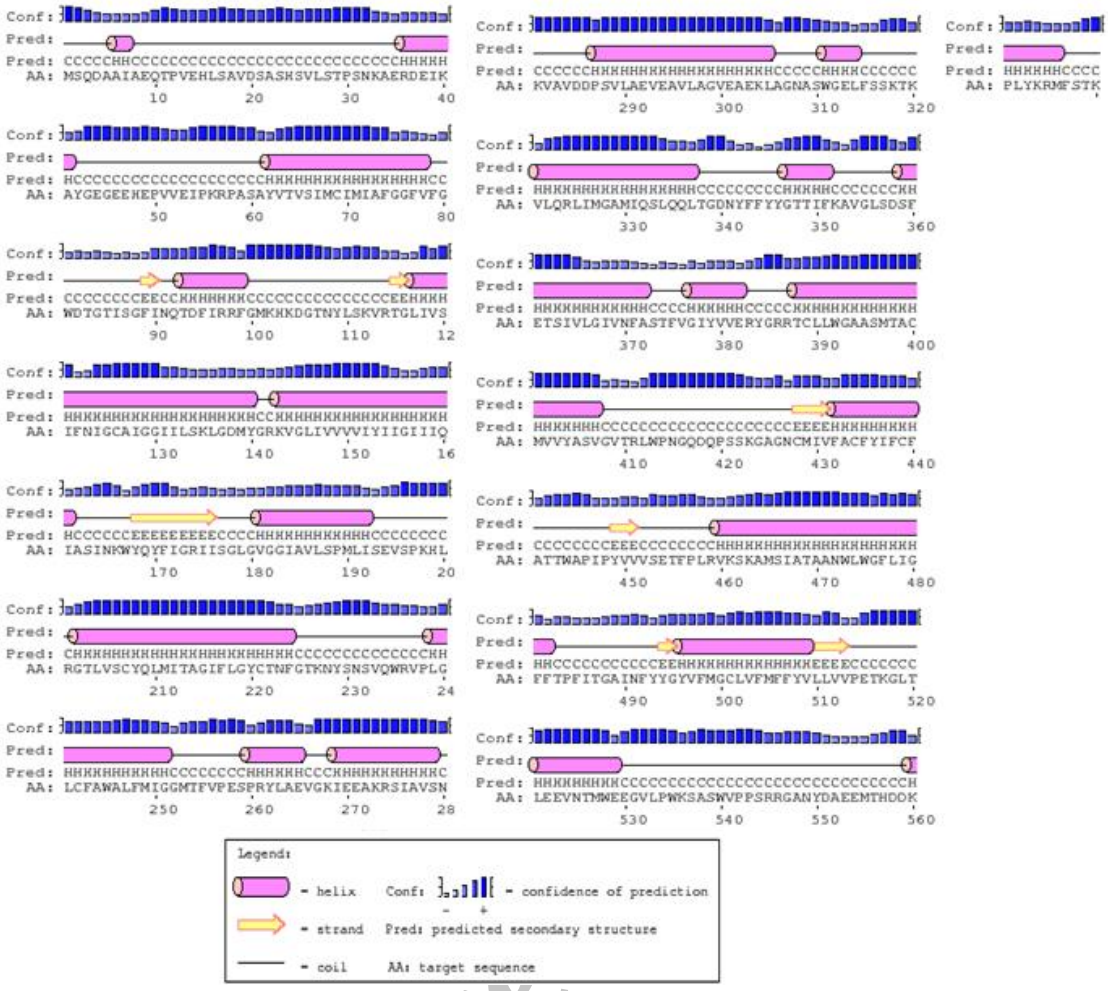


شکل۵. بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین Hxt7p

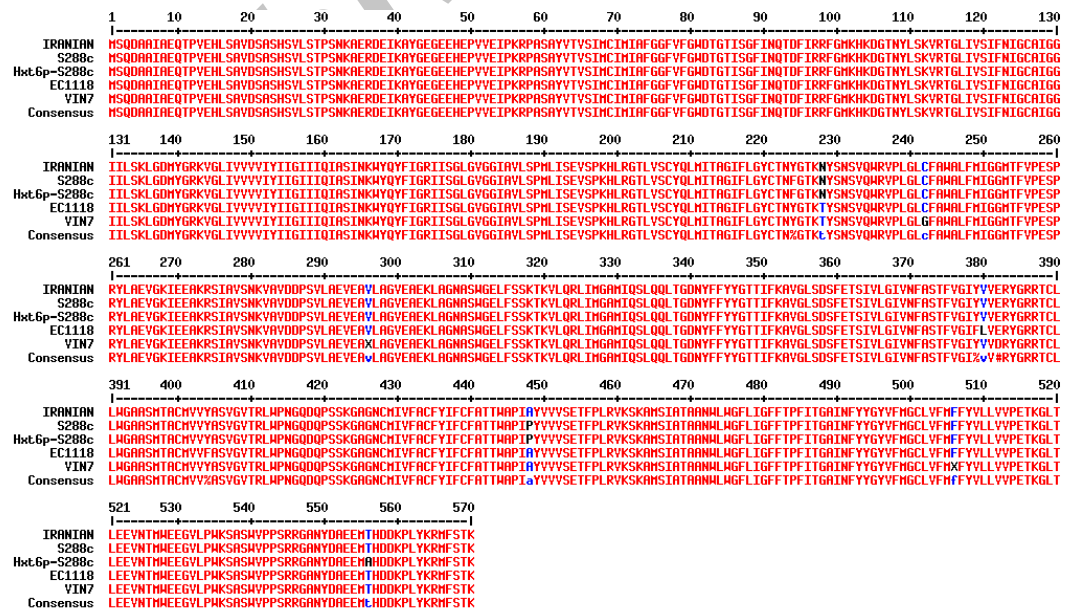


شکل۶. توپولوژی دو بعدی از سنسور گلوکز Hxt7p دومین‌های انتقال دهنده از ۱ تا ۱۲ شماره گذاری شده‌اند. بررسی ساختار دوم پروتئین Hxt7p با استفاده از PSIpred نشان داد که این پروتئین حاوی ۷ رشته β و ۲۳ مارپیچ α می‌باشد (شکل ۷).

www.SID.ir

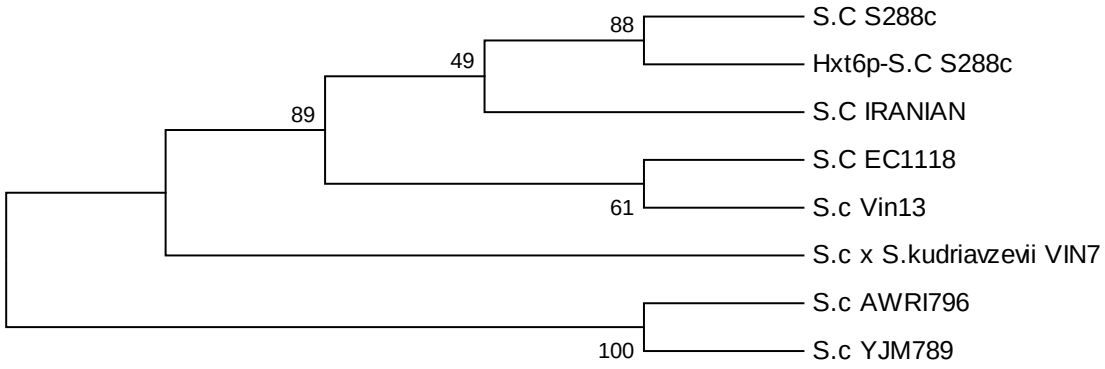


شکل۷. ساختار دوبعدی با استفاده از برنامه PSIpred.

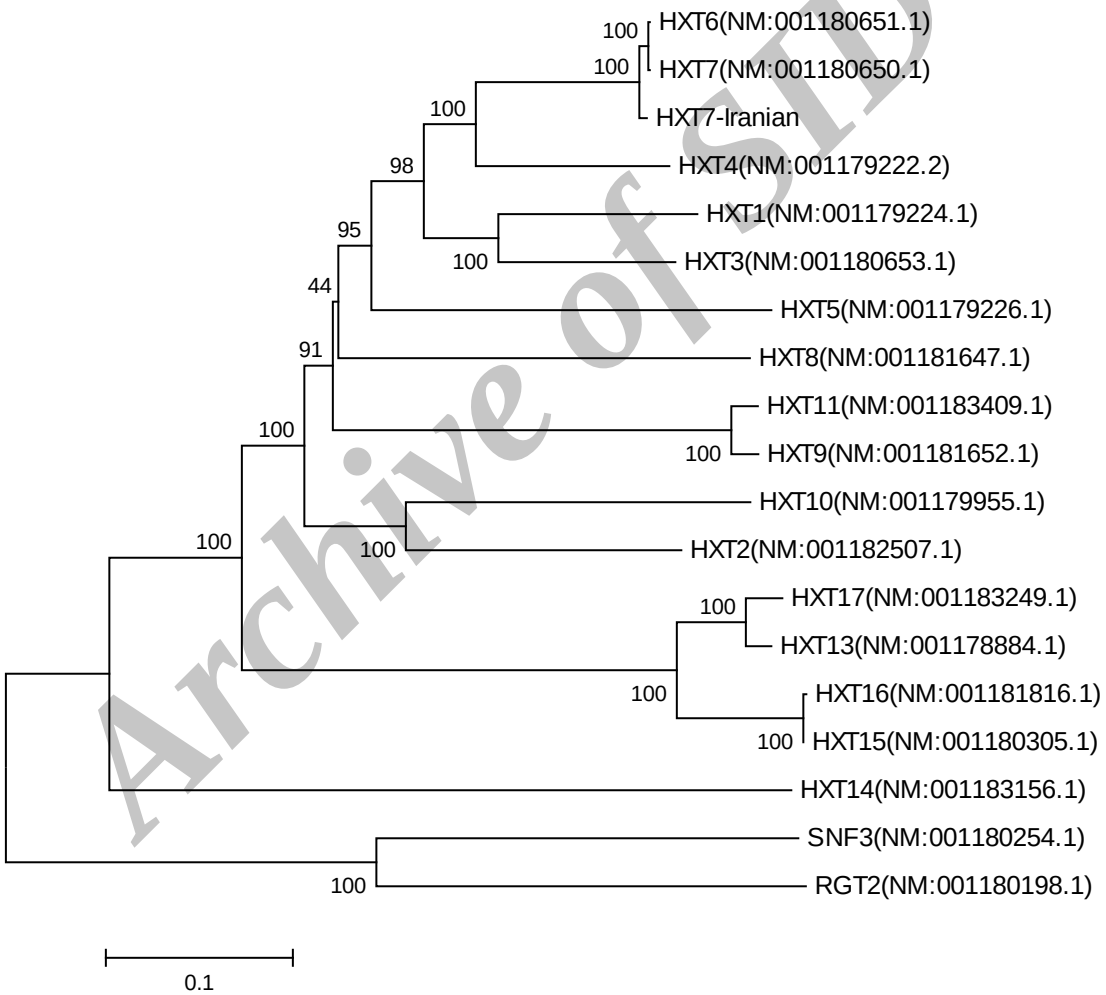


شکل۸. همردیفی مقایسه‌ای توالی اسیدآمینه‌ای HXT7 کلون شده در وکتور pGEM-T با توالی اسیدآمینه‌ای سایر HXTهای سویه‌های دیگر مخمر ساکارومیسس سرویزیه موجود در NCBI با استفاده از برنامه‌ی Multialign. ردیف آخر توالی‌های مورد توافق را پس از مقایسه نشان می‌دهد

www.SID.ir



شکل۹. درخت فیلوژنتیکی توالی اسیدآمینه‌ای Hxt7p مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی ایرانی با سایر ژن‌های همتای خود در سویه‌های دیگر مخمر ساکارومیسس سرویزیه موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شد.



شکل ۱۰. درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن HXT7 مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی ایرانی با سایر ژن‌های انتقال‌دهنده‌های هگزوز مخمر ساکارومیسس سرویزیه موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شد. کد دسترسی هر ژن داخل پرانتز آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ژن HXT7 پس از تکثیر با استفاده از روش PCR در وکتور pGEM-T کلون شد. پس از تایید پلاسمید نوترکیب، این پلاسمید به سلول‌های باکتری E. coli نژاد Top10 ترانسفرم شد. بر اساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی (هم‌ردیفی مقایسه‌ای، بلاست، درخت

Archive of SID

www.SID.ir

فیلوژنتیکی) مشخص شد این پروتئین شباهت زیادی با Hxt7p ساکارومیسس سرویزیه سویه‌های دیگر ثبت شده در NCBI دارد و این نشان می‌دهد Hxt7p در اکثر سویه‌های ساکارومیسس سرویزیه حفظ شده است. هم‌چنین بررسی‌های فیلوژنتیکی HXT7 ایرانی با سایر خانواده‌ی انتقال‌دهنده‌های هگزوز نشان از تشابه و ارتباط نزدیک HXT7 با این خانواده ژنی است و از بین آن‌ها بیش‌ترین تشابه را با HXT6 دارد.

اثر بیان بیشینه‌ی این خانواده‌ی ژنی در مخمرها مورد مطالعه قرار گرفته است و تولید اتانول را در سویه‌ی وحشی مخمر با سویه‌ی مهندسی شده مقایسه کردند. داده‌های به‌دست آمده نشان دادند که تظاهر بیش از حد این انتقال‌دهنده‌ها منجر به افزایش دریافت گلوکز شود. محققین نشان دادند که با تنظیم کردن اولین مرحله‌ی مسیر بیوسنتز گلوکز می‌توان منجر به تجمع اسیدلاکتیک شد، که یک افزایشی در حدود ۱۵٪ در تولید اتانول در مقایسه با سویه‌ی وحشی مشاهده کردند [۴،۳]. بارها این خانواده‌ی ژنی روی پلاسمیدهای مختلف کلون شده و افزایش تولید اتانول در سویه‌ی مهندسی شده در مقایسه با سویه‌ی وحشی مخمر مشاهده شده است. به طور مثال Rossi و همکاران (۲۰۱۰) از بین انتقال‌دهنده‌ی هگزوز ساکارومیسس سرویزیه HXT7 و HXT1 را کلون کرده و افزایش تولید اتانول را در سویه‌ی مهندسی شده مشاهده کردند. در سال ۲۰۱۲ نیز HXT7، HXT1 و GXS1، GXF1 (انتقال‌دهنده‌ی زایلوز) از Condida intermedia را به پلاسمید pUPG1 کلون کرده در نهایت به مخمر MT8-1/XkdXI منتقل کردند. و نتیجه‌ی کارشان را با پلاسمید کنترل مقایسه کردند و افزایش تولید اتانول را با تقویت برداشت گلوکز و زایلوز مشاهد کردند. این نتایج به طور آشکار نشان می‌دهند که افزایش بیان انتقال‌دهنده‌ها در مخمر می‌تواند توانایی تولید اتانول را به‌وسیله‌ی تسهیل مصرف گلوکز بهبود بخشد [۱۵]. در ایران نیز ژن HXT2 از طریق بهینه‌سازی PCR از ساکارومایسس سرویزیه سویه‌ی ایرانی جدا و در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد. این ژن با شماره دسترسی JQ 323554.1 در بانک جهانی ژن ثبت شده است. این اولین گزارش از جداسازی و کلونینگ این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است [۱۶].

توالی ژن HXT7 ابتدا در وکتور پایه‌ی pGEM-T کلون شد تا محدوده‌ی استفاده از آنزیم‌های برشی برای کلونینگ افزایش یابد برای بیان این ژن نیاز به یک پروموتور قوی نظیر ADH-promoter و GAPDH-promoter می‌باشد که این پروموتورها باعث افزایش میزان جذب قندهای هگزوز توسط سلول‌های مخمر می‌شود که در نهایت میزان تولید الکل طی فرآیند تخمیری افزایش می‌یابد.

این مطالعه راهی برای پیش‌رفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب و بیان این ژن برای مطالعه آینده است. در این تحقیق با استفاده از روش مهندسی ژنتیک ژن HXT7 جداسازی و کلون گردیدند. امید است با بررسی بیش‌تر روی این ژن و سایر ژن‌های این خانواده احتمالاً در آینده مخمر نوترکیب جهت افزایش راندمان تولید الکل طی تخمیر ساکارومیسس سرویزیه تهیه نمود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به‌خاطر فراهم نمودن امکانات مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] De Bari I, De Canio P, Cuna D, Liuzzi F, Capece A, Romano P. Bioethanol production from mixed sugars by Scheffersomyces stipitis free and immobilized cells, and co-cultures with Saccharomyces cerevisiae. N Biotechnol 2013; 30: 591-597.

[2] Singh A, Bishnoi RN. Optimization of ethanol production from microwave alkali pretreated rice straw using statistical experimental designs by Saccharomyces cerevisiae. Indust Crops Produc 2012; 37: 334-341.

[3] Rossi G, Sauer M, Porro D, Branduardi P. Effect of HXT1 and HXT7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing Saccharomyces cerevisiae cells. Microb Cell Fact 2010; 9: 1-10.

[4] Gutierrez-Lomeli M, Torres-Guzman JC, Gonzalez-Hernandez GA, Cira-Chavez LA, Pelayo-Ortiz C, Ramirez-Cordova Jde J. Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 93: 363-371.

[5] Ozcan S, Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63: 554-569.

[6] Perez M, Luyten K, Michel R, Riou C, Blondin B. Analysis of Saccharomyces cerevisiae hexose carrier expression

Archive of SID

www.SID.ir

during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. FEMS Yeast Res 2005; 5: 351-361.

[7] Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of Saccaharomyces cerevisiae and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. Eur J Biochem 1997; 245: 324-333.

[8] Reifenberger E, Freidel K, Ciriacy M. Identification of novel HXT genes in Saccaharomyces cerevisiae reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. Mol Microbiol 1995; 16: 157-167.

[9] Liang H, Gaber RF. A novel signal transduction pathway in Saccaharomyces cerevisiae defined by SNF3- regulated expression of HXT6. Mol Biol Cell 1996; 7: 1953-1966.

[10] Lakshmanan J, Mosley AL, Ozcan S. Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. Curr Genet 2003; 44: 19-25.

[11] Kim JH, Polish J, Johnston M. Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. Mol Cell Biol 2003; 23: 5208-5216.

[12] Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. BMC Biotechnol 2004; 21: 4-8.

[13] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S,Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. 2005; pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.

[14] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 1982; 157: 105-132.

[15] Takanori T, Tomonori I, Chiaki O, Naoto O, Takayuki O, Akihiko K. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing Saccharomyces cerevisiae harboring a xyloseisomerase pathway. J Biosci Bioeng 2012; 114: 209-211.

[16] Amiri S, Tarinejad A, Sharifi Sirchi Gh. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose transporter gene2 from Iranian Saccharomyces cerevisiae. Koomesh 2012; 2: 138-143 (Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation, cloning and analysis of the glucose transporter gene 7 from Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Solmaz Azizi (M.Sc)[1], AliReza Tarinejad (Ph.D) [*2]
1 – Dept. of Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2 – Dept. of Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

(Received: 24 May 2014; Accepted: 8 Nov 2014)

Introduction: The most important and specific known action for *Saccharomyces cerevisiae* yeast is producing ethanol by alcohol fermentation and that is probably due to its high efficiency for absorption and fermentation of hexose sugars. The *S. cerevisiae* express 20 genes that encode hexose transporter proteins, including *hxt1-hxt17, gal2, snf3* and *rgt2*. Among all those gene families, *hxt1-hxt7* have important role in alcohol production. It has been shown that increasing the expression *hxt1-hxt7* accelerates alcohol fermentation and therefore, ethanol production. The aim of this study was to identify and isolate *hxt7* from *Saccharomyces cerevisiae* genome, using PCR and cloning it into a vector containing suitable expression promoter in order to produce recombinant yeast by transformation.

Materials and Methods*:* Isolation of *hxt7* by specific primers was achieved via PCR. The amplified fragments were cloned into pGEM-T vector and transformed into *Escherichia coli* and finally, the recombinant plasmids were sent to sequencing.

Results: The nucleotide sequence of open reading frame in gene was revealed a 1713 bp long with a deduced amino acid of 570 residues. The estimated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 62.725 kDa and 7.89, respectively.

Conclusion: The deduced protein sequence showed a high similarity to *hxt7* sequences registered in NCBI and with the highest percentage of similarity to Hxt7p S.cerevisiae S288C recorded at NCBI with access code NP010629.3.

Key words: Cloning, *Saccharomyces cerevisiae*, *HXT7* gene, Recombinant plasmids

* Corresponding author. Tel: +98 4134327572
atarinejad@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir