

## جداسازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن تنظیمی *claR* از استرپتومایسس کلاولی جروس<sup>۱</sup> سویه ایرانی<sup>۲</sup> PTCC1705

زهره حاجتی\*، دکتر مجید متولی‌باشی\* و فرانک قاضی‌شعرباف\*

\* دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

### چکیده

استرپتومایسس کلاولی جروس یک اکتینومایست معروف برای تولید انواع آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام، بویژه کلاولانیک اسید است. کلاولانیک اسید، یک مهارکننده بتالاکتاماز است که در ترکیب با پنی‌سیلین و سفالوسپورین عملکرد سینرژیک دارد و در واقع از غیرفعال شدن این آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام جلوگیری می‌کند. در دسته ژنی بیوستنز کلاولانیک اسید، ژن *claR*، با کد کردن یک فعال‌کننده رونویسی، در تنظیم مراحل نهایی مسیر بیوستنز کلاولانیک اسید شرکت دارد. بر این اساس، با افزایش میزان بیان این ژن می‌توان میزان تولید کلاولانیک اسید را در گونه استرپتومایسس افزایش داد. نوآوری‌های موجود در زمینه تولید کلاولانیک اسید بر اساس مطالعات انجام شده روی ژن *claR* از استرپتومایسس کلاولی جروس سویه DSM738 است. در این تحقیق، با جدا نمودن و کلون نمودن ژن *claR* از سویه PTCC1705 در وکتور pMA::hyg، توالی این ژن تعیین شد. نتایج نشان دهنده یکسان بودن توالی ژن *claR* در هر دو سویه است. بنابراین، می‌توان با استفاده از این ژن کلون شده و تایید شده به مطالعات بعدی، چون ایجاد موتاسیون‌های جهت دار و هدایت شده و همچنین ایجاد تغییرات ساختاری در پروتئین مربوطه پرداخت.

واژه‌های کلیدی: کلاولانیک اسید، ژن *claR*، استرپتومایسس کلاولی جروس سویه PTCC1705

1. *Streptomyces clavuligerus*  
2. Persian Type Culture Collection

## مقدمه

اکتینومایستها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که تغییر فیزیولوژیک پیچیده در چرخه زندگی‌شان، آن‌ها را از سایر پروکاریوت‌ها متمایز می‌سازد (۱). اکتینومایست‌ها منبع غنی از انواع محصولات بیواکتیو هستند و از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه، از قبیل: آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی، داروهای ضد سرطان، علف‌کشهای طبیعی و عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی معروفند (۲ و ۳). در میان اکتینومایست‌ها، اعضای جنس استرپتومایسس ۷۰ تا ۸۰ درصد از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند (۳). تولید آنتی‌بیوتیک در گونه‌های استرپتومایسس با انواع شرایط تغذیه و فیزیولوژیک تنظیم می‌شود و با رشد و نمو مورفولوژیک ارگانسیم؛ یعنی تولید میسلیم هوایی و اسپورزایی همراه است (۴ و ۵).

تولید آنتی‌بیوتیک تحت کنترل آرایه‌ای از سیگنال‌های تنظیمی است که به صورت سلسله مراتب سازماندهی شده‌اند (۶). در زیر این سلسله مراتب تنظیم‌کننده‌های رونویسی خاص مسیر وجود دارند که در دسته‌های ژنی بیوستنز آنتی‌بیوتیک‌کد می‌شوند و بیان ژنهای بیوستنز آنتی‌بیوتیک را به طور مثبت یا منفی تنظیم می‌کنند.

گونه استرپتومایسس کلاولی جروس تولیدکننده تعدادی از ترکیبات بتالاکتام، از قبیل: سفامایسین C، کلاولانیک اسید و حداقل چهار متابولیت کلواوم دیگر است (۷).

کلاولانیک اسید، نمک‌ها و استرهای آن مهارکننده بتالاکتامازهای تولید شده توسط میکروارگانسیمهای گرم مثبت یا گرم منفی هستند. پتاسیم کلاولانات به صورت تجاری، در ترکیب با آموکسی سیلین

تری‌هیدرات عرضه می‌شود. در واقع، پتاسیم کلاولانات پایدارتر از اسید آزاد یا سایر نمک‌هاست. ترکیب کلاولانیک اسید و آموکسی سیلین بر علیه آلودگی‌های حاصل از اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس آئروس و هموفیلوس آنفلوآنزا و در درمان برونشیت، آلودگی‌های مجرای ادراری، پوست و بافت نرم که توسط باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز ایجاد می‌شوند، به کار می‌رود (۸). دسته ژنی کلاولانیک اسید شامل ژن‌های کدکننده آنزیم‌های دخیل در مراحل مشترک اولیه مسیر کلاولانیک اسید و کلاوامها (ژن‌های اولیه) و ژن‌های کدکننده پروتئین‌های دخیل در مراحل بعدی بیوستنز کلاولانیک اسید (ژن‌های تاخیری) است (۹ و ۱۰). ژن *claR* با طول ۱۲۹۹ bp، غنی از C+G (۷۴/۷٪) و یکی از ژن‌های تاخیری دسته ژنی بیوستنز کلاولانیک اسید است. ژن *claR* یک پروتئین ۴۳۱ آمینواسیدی با وزن مولکولی ۴۷۰۸۰ دالتون کد می‌کند که در تنظیم مراحل نهایی مسیر بیوستنز کلاولانیک اسید شرکت دارد (۱۱). بر اساس اطلاعات موجود در بانک‌های ژنی و با توجه به تحقیقات انجام شده، توالی ژن *claR* از استرپتومایسس کلاولی جروس DSM738 ثبت شده است و همچنین کلاولانیک اسیدهای تجاری موجود از این سویه تهیه می‌شوند (۱۲ و ۱۳). با توجه به اینکه تاکنون از توالی ژن *claR* از سویه PTCC 1705 هیچ گزارشی نشده است و از طرف دیگر، هیچ گونه مطالعه‌ای روی تاثیر ژن *claR* مربوط به این سویه روی میزان تولید کلاولانیک اسید صورت نگرفته است، در این تحقیق برای تکثیر ژن *claR*، هنگام طراحی پرایمرها از توالی مربوط به ژن *claR* از سویه DSM 738 که قبلاً تعیین و

جدا سازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن تنظیمی *clar* از استرپتومایسس ... / ۳

کشیده شد.  
DNA پلاسمیدی نیز توسط استات سدیم رسوب داده شد (۱۴). از سویه‌های تولیدکننده کلاولانیک اسید، استرپتومایسس کلاولی جروس DSM 738 و PTCC 1705، برای تهیه DNA ژنومی استفاده شد که روی محیط GYME (حاوی ۴ گرم عصاره مخمر، ۴ گرم گلوکز، ۱۰ گرم عصاره مالت، ۲ گرم  $\text{CaCO}_3$  و ۱۲ گرم آگار در هر لیتر آب مقطر با  $\text{pH}=7/2$ ) در ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. سوسپانسیونی از ذخیره اسپور استرپتومایسس کلاولی جروس تهیه و برای ذخیره طولانی در  $-20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۵).

#### طراحی و تغییر پرایمر:

با توجه به خصوصیات ژن *clar* از قبیل میزان CG، محل شروع رونویسی و محل قرارگیری توالی‌های پالیندرومی و با توجه به ویژگی‌های وکتور *pMA::hyg*، از قبیل جایگاه شناسایی متعدد آن، یک جفت پرایمر اختصاصی *clar2* با جایگاه‌های *XbaI* و *BamHI* برش برای دو آنزیم محدودکننده *BamHI* و *XbaI* در دو انتهای قطعه ژن مورد نظر و یک جفت پرایمر داخلی برای تأیید ژن تکثیر یافته (*clarRn*) با استفاده از نرم افزار OLIGO طراحی گردید. (شکل ۱). بنابراین توالی:

5' GGATCCAGGAGAATCCGAAGAGC 3'  
به عنوان توالی پرایمر *clar2 reverse* انتخاب گردید و توالی:

5'TTCTAGACGCTCAGCCGGACATCC3'  
به عنوان توالی پرایمر *clar2 forward* انتخاب شد.

گزارش شده بود، استفاده شد. سویه مورد نظر از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با عنوان PTCC1705 تهیه شد. شایان ذکر است که این سویه با نام DSM 41826 نیز شناخته می‌شود.

#### طرز کار و مطالعه

سویه‌های باکتریایی، پلاسمیدها و شرایط رشد: در این تحقیق، از پلاسمید *pMA::hyg* استفاده گردید که از آزمایشگاه استرپتومایسس دانشگاه UMIST انگلستان تهیه گردید.

در این مطالعه *E. coli XL1-blue* خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران و از دو سویه از *Streptomyces clavuligerus* (سویه DSM 738 خریداری شده از DSMZ آلمان و PTCC 1705 خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران) استفاده گردید. برای تهیه سلول مستعد از سویه‌های اشیرشیاکلی، آن‌ها روی محیط لوریا- برتنی (حاوی ۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره باکتو- مخمر، ۱۰ گرم سدیم و ۱۷ گرم آگار در هر لیتر آب مقطر با  $\text{pH}=7/5$ ) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. محیط حاوی آمپی‌سیلین ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) به عنوان مارکر انتخابی استفاده شد.

سلولهای مستعد *E. coli* با روش کلرید کلسیم تهیه و با پلاسمیدهای *pMA::hyg* ترانسفورم شدند. در مرحله بعد برای استخراج پلاسمید از روش هلمس-کویجلی استفاده شد؛ به این ترتیب که رسوب باکتری همراه با آنزیم لیزوزیم و بافر STET در دمای  $94^\circ\text{C}$  به مدت ۴ ثانیه جوشانده شد. سپس بقایای باکتری‌های لیز شده توسط سانتیفریوژ جمع آوری و از محلول DNA بیرون

## استخراج ژنوم و تکثیر DNA:

به منظور استخراج DNA کروموزومی،  $100 \mu\text{l}$  از ذخیره اسپور به محیط YEME (حاوی ۳ گرم عصاره مالت، ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم گلوکز و ۳۴۰ گرم ساکاروز در هر لیتر آب مقطر با  $\text{pH}=7/0$ ) اضافه شد که به مدت ۳ روز در ۲۸ درجه سانتی گراد روی انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۲۰ rpm رشد کردند (۱۵). برای استخراج DNA ژنومی از استریتومایسس کلانولی جروس از روش CTAB استفاده شد (۱۵).

تکثیر DNA در هر دو سویه با استفاده از آنزیم Pfu پلیمراز، با برنامه‌ریزی دستگاه ترموسایکلر که پس از بهینه‌سازی‌های متعدد به دست آمده بود، صورت گرفت.

به منظور تأیید ژن *claR* تکثیر یافته از هر دو سویه در مرحله قبل و صحت عملکرد PCR، برش و هضم آنزیمی محصولات PCR با یک آنزیم محدودکننده با حداقل یک جایگاه برش؛ یعنی روش PCR-RFLP بود. در این تحقیق نقشه محدود قطعه DNA مورد نظر با استفاده از سایت اینترنتی (SGD) *Saccharomyces Genome Data* base تهیه شد.

## هضم دوگانه آنزیمی با آنزیم محدودکننده:

از آنجایی که محصولات PCR (ژن *claR*) در دو انتها و وکتور pMA::hyg در جایگاه کلونینگ متعدد خود دارای جایگاه برش با دو آنزیم محدودکننده *BamHI* و *XbaI* هستند، به منظور کلون کردن این ژن در وکتور مورد نظر، محصولات PCR و وکتور pMA::hyg پس از طی مراحل استخراج، تکثیر، تخلیص و تغلیظ توسط این دو

آنزیم برش داده شدند. بر اساس ویژگی‌های این دو آنزیم، می‌توان واکنش هضم دوگانه آنزیمی را با بافر مشترک 2X Tango™ انجام داد.

## الحاق:

پس از برش قطعات DNA (محصول PCR و وکتور) با آنزیم‌های محدودکننده، برای انجام فرآیند الحاق از آنزیم لیگاز استفاده شد. به هر ویال ۴۰۰-۵۰ نانوگرم از نمونه DNA برش یافته با آنزیم‌های محدودکننده (قطعات DNA محصول PCR و وکتور) به همراه ۵-۱ واحد از آنزیم T4 DNA Ligase و ۲ میکرولیتر از بافر ۱۰X اضافه گردید و حجم نهایی با آب دوبار تقطیر استریل یا بافر TE به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. همچنین برای بررسی امکان خودالحاقی وکتور واکنش دیگری انجام شد که در آن هیچ یک از محصولات PCR به مخلوط واکنش اضافه نشدند.

## ترانسفورماسیون:

برای انجام ترانسفورماسیون باکتری *E. coli* پس از تهیه سلول‌های مستعد، ۵۰ نانوگرم از پلاسمیدهای نوترکیب به ۳۰۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد *E. coli* اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ، به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد به آن شوک گرمایی داده شد. محتویات اپندروف به یک لوله حاوی ۲ میلی لیتر LB منتقل و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از آن روی پلیت حاوی محیط کشت LBA+AMP با استفاده از یک میله شیشه‌ای استریل پخش شد. پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب، انکوبه شد.

جدا سازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن تنظیمی *clar* از استرپتومایسس ... / ۵

کلاولی جروس PTCC 1705 و DSM 738 با خلوص و غلظت بالا استخراج شد. واکنش اصلی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *clar2* انجام شد که با توجه به توالی و محل اتصال پرایمرها، محصول PCR، با ۱۵۰۰ جفت باز تولید شد (شکل ۲).

از محصول PCR و پرایمرهای نستد در یک دور دیگر PCR استفاده شد. باندهای ۷۷۵ جفت بازی بدست آمده از روش Nested-PCR، صحت DNA تکثیر شده در واکنش اصلی PCR را تایید می کنند (شکل ۳). بعلاوه، نقشه محدود توالی *clar* تعیین کننده آنزیم هایی است که دارای محل شناسایی روی این توالی است. برای مثال *PvuII* دارای یک جایگاه شناسایی روی ژن *clar* می باشد قطعه ژنی *clar* حاصل از PCR، توسط این آنزیم برش داده شد، PCR-RFLP. بنابراین، در نتیجه این برش، باندهای ۷۷۴ و ۷۲۶ جفت بازی ایجاد شدند که تشابه فراوان ترادف ژن *clar* تکثیر یافته بین دو سویه را تایید می کند (شکل ۴).

با توجه به وجود جایگاه شناسایی آنزیمهای محدودکننده *BamHI* و *XbaI*، به ترتیب در انتهای ۵ پرایمرهای *reverse* و *forward* طراحی شده، توالی های تکثیر شده در انتهای خود جایگاه های مورد نیاز را برای ورود به وکتور هضم شده *pMA::hyg* دارا می باشند. به دنبال انجام الحاق و ترانسفورماسیون روی نمونه های DNA و وکتور هضم شده، حضور کلونی روی محیط کشت انتخابی LBA به معنی موفقیت ترانسفورماسیون است. روش colony-PCR برای اطمینان از الحاق *clar* و وکتور *pMA::hyg* و موفقیت ترانسفورماسیون آنها استفاده شد (شکل ۵).

### Colony- PCR برای تایید ترانسفورماسیون:

بدین منظور، ابتدا به هر ویال ۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد، و سپس به طور تصادفی چند کلونی از روی محیط کشت انتخابی برداشته شد و پس از وارد نمودن مقداری از هر یک از آنها در ویال مربوطه، روی محیط LBA جدید حاوی آمپی سیلین نیز کشت داده شدند. سپس سایر مواد واکنش PCR به همراه پرایمرهای اصلی به هر ویال اضافه شد و پس از واکنش PCR یک قطعه DNA به اندازه ۱۵۰۰ جفت بازی روی ژل الکتروفورز مشاهده گردید که نشان دهنده حضور آن ژن در کلونی مربوطه بود. بنابراین، با برگشتن به محیط کشت حاوی آن کلونی، استخراج پلاسمید با استفاده از روش هلمس-کویجلی انجام شد. اندازه پلازمید نو ترکیب پس از یک برش بر روی ژل ۱ درصد بررسی و تایید گردید.

### تعیین توالی و انجام Blast دو توالی:

برای دست یابی به توالی ژن *clar* از سویه PTCC 1705 تعیین توالی صورت گرفت. بدین منظور، واکنش PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های نو ترکیب انجام شد و ژن *clar* (از سویه PTCC 1705) پس از استخراج از ژل، برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد. تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت و توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار Blast، ابتدا با تمامی ترادفهای DNA در بانکهای مختلف ژنی مقایسه گردید. سپس میزان تشابه بین دو توالی با استفاده از Blast 2seq بررسی گردید.

### نتایج

DNA ژنومی از دو سویه از استرپتومایسس

روگزو<sup>۵</sup> در سال ۱۹۸۸، برای استخراج DNA از استرپتومایسس استفاده شده است (۱۷). با این که این روش بسیار وقت گیر است، ولی مقدار زیاد DNA کروموزومی با خلوص و غلظت زیاد استخراج شد که برای انجام PCR بسیار مناسب بود.

ژن *clar* استخراج شده از استرپتومایسس کلاولی جروس DSM 738 یکی از ژن های تنظیم کننده مسیر بیوستتز کلاولانیک اسید است که تاثیر و اهمیت آن در افزایش میزان تولید کلاولانیک اسید در مطالعات متعدد اثبات شده است (۱۱). استراتژی کلونینگ مسیری اختصاصی را برای تولید و تکثیر وکتورهای نو ترکیب حاوی قطعات مورد نظر فراهم می آورد. پارادکار<sup>۶</sup> و همکارانش در سال ۱۹۹۸، قطعه *BglIII* ۱/۹ کیلوبازی در فرودست ژن *ORF7* را از کاسمید K6 L2 که قبلا توسط آیدو<sup>۷</sup> و همکارانش ساخته شده بود، خارج نموده، در وکتورهای توالی یابی pUC119 و pUC118 کلون کردند. در نتیجه توالی یابی یک ORF کامل تعیین شد که آن را *clar* نامیدند. اطلاعات این توالی (1656-358nt) در بانک ژنی با شماره دستیابی U87786<sup>۸</sup> ثبت شد. این ژن تعیین توالی شده مربوط به استرپتومایسس کلاولی جروس NRRL3583 (DSM738) بود (۵). پرز-ردوندو<sup>۹</sup> و همکارانش در سال ۱۹۹۸، با استفاده از استرپتومایسس کلاولی جروس NRRL3583، به مطالعه ژنهای *car* و *clar* پرداختند. در این تحقیق، با استفاده از هضم جزئی *Sau3AI* از DNA استرپتومایسس کلاولی جروس،

دو وکتور نو ترکیب جدید *pFclaR* (الحاق ژن *clar* از سویه PTCC 1705 در وکتور *pMA::hyg*) و *pGclaR* (الحاق ژن *clar* از سویه DSM 738 در وکتور *pMA::hyg*) نامیده شدند (شکل ۶).

پس از استخراج پلاسمید از باکتریهای ترنسفورم شده، واکنش PCR اصلی با استفاده از نمونه های پلاسمیدی نو ترکیب انجام شد و نتیجه آن باندهای ۱۵۰۰ جفت بازی بود که در مورد قطعه *clar* انتظار می رفت.

در نهایت، پس از انجام توالی یابی روی محصول PCR - که الگوی آن پلاسمید *pFclaR* بود، آنالیزهای *blast* دو توالی مربوطه انجام شد که نشان دهنده یکسان بودن توالی ژن *clar* در هر دو سویه PTCC 1705 و DSM 738 است. همچنین نتایج تعیین توالی نشان داد که ژن *clar* بدرستی و بدون هیچ گونه جهش ناخواسته ای به وکتور وارد و کلون شده است (شکل ۷).

### بحث و نتیجه گیری

اندرسون<sup>۱</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۲، اگان<sup>۲</sup> و همکارانش در سال ۱۹۹۸ و بیب<sup>۳</sup> و همکارانش در سال ۱۹۸۵، از روش فیشر برای استخراج DNA استرپتومایسس ها استفاده کردند (۱۶ و ۱۷). در این تحقیق برای استخراج DNA استرپتومایسس کلاولی جروس، از روش استخراج CTAB استفاده شد. این روش توسط چندین محقق از جمله آسوبل<sup>۴</sup> و همکارانش در سال ۱۹۹۴ و بندیش و

1. Anderson  
2. Egan  
3. Bibb  
4. Ausubel  
5. Bendish & Rogers

6. Paradkar  
7. Aidoo  
8. Accession no  
9. Perez-Redondo

جدا سازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن تنظیمی *clar* از استرپتومایسس ... / ۷

می توان ژن *clar* در سویه PTCC 1705 را نیز به عنوان تنظیم کننده تولید کلاولانیک اسید در نظر گرفت. در مرحله بعد می توان با استفاده از پلاسمیدهای *pFclar* و *pGclar*، ژن *clar* را در وکتور اختصاصی استرپتومایسس، مثل *pMT3206*، کلون نمود و با انتقال این حامل اختصاصی با روش انتقال پروتوپلاسمی به استرپتومایسس کلاولی جروس میزان تولید کلاولانیک اسید در شرایط کنترل شده افزود. از ویژگی های این وکتور چند کپی، بیانی بودن آن است؛ به طوری که می توان مقادیر متفاوت از پروتئین *ClaR* را ایجاد نمود و تولید آنتی بیوتیک را بهینه نمود.

بنابراین، با توجه به اهمیت دارویی کلاولانیک اسید، هموار نمودن مسیر ایجاد سویه هایی که توانایی تولید مقادیر بالای این آنتی بیوتیک را دارند، از اهداف اصلی این تحقیق است. در واقع، با شناسایی و تکثیر ژن های تنظیمی این ترکیب و افزایش تعداد کپی و در نتیجه میزان بیان آن ها در سویه های تولید کننده این آنتی بیوتیک، می توان به افزایش تولید کلاولانیک اسید دست یافت. اهمیت و نتایج این تحقیق گامی مؤثر در جهت ایجاد سویه های مهندسی ژنتیک شده برای تولید آنتی بیوتیک است تا بتوان از آنها برای تولید صنعتی و خودکفایی کشور استفاده نمود.

#### سپاسگزاری

از حمایت های تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان سپاسگزاری می شود.

( $\lambda$ -GEM12) کتابخانه ژنومی تهیه کردند. سپس توسط هیبریدسازی با پروب مربوطه، فاژ حامل دسته ژنی کلاولانیک اسید-سفامایسسین را جدا نمودند. این فاژ حامل قطعه ۱۵ کیلوبازی بود که توسط چندین اندونوکلاز محدود کننده هضم و تعیین نقشه شد.

قطعه ۲/۸ کیلوبازی برش داده شده با *BglIII*-*EcoRI* در پلاسمید *pBSK+* کلون و توالی یابی شد. در نتیجه دو *ORF8* و *ORF9* شناسایی شدند. در سایر بررسی هایی که انجام دادند، مشخص شد کلونینگ ژن *clar* در پلاسمیدهای چند کپی منجر به افزایش ۳ برابر کلاولانیک اسید و ۶-۵ برابر آلانیل کلاوام می شود، در حالی که تولید سفامایسسین را کاهش می دهد. همچنین مشخص شد که ژن *car* هیچ تأثیری روی تولید ترکیبات ذکر شده ندارد (۱۱).

در این مطالعه علاوه بر سویه DSM738 برای اولین بار از سویه PTCC1705 نیز برای استخراج ژن *clar* استفاده شد. در مورد میزان تولید کلاولانیک اسید و ساختار ژن *clar* در این سویه هیچ گونه اطلاعاتی وجود ندارد. به دلیل محدودیت در جایگاه کلونینگ متعدد و آنزیم های محدود کننده در پلاسمیدهای اختصاصی استرپتومایسس نمی توان ژن *clar* را به طور مستقیم در این پلاسمیدها وارد نمود. بنابراین، از پلاسمید *pMA::hyg* با جایگاه کلونینگ متعدد و آنزیم های محدود کننده بیشتر برای کلونینگ ژن مورد نظر استفاده شد.

با ورود و کلونینگ ژن *clar* در پلاسمید *pMA::hyg*، پلاسمیدهای جدید *pFclar* و *pGclar* ساخته شدند. تعیین توالی ژن *clar* سویه PTCC1705 و بررسی های بیوانفورماتیکی انجام شده روی این ژن نشان دهنده یکسان بودن توالی ژن *clar* در هر دو سویه است. بنابراین،

## References

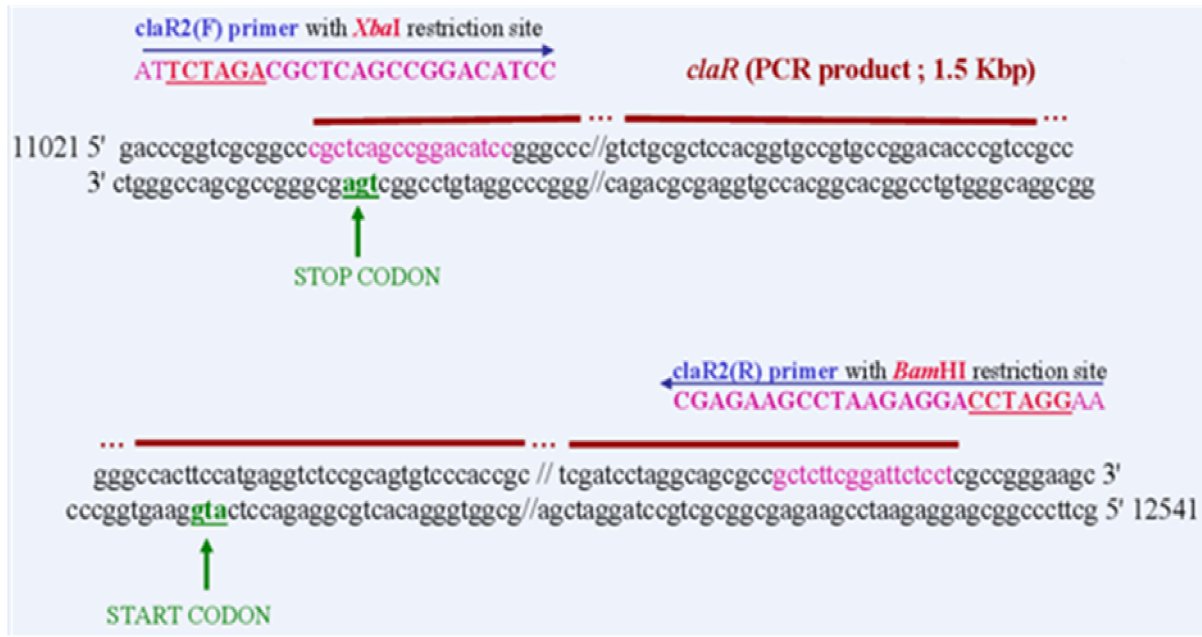
- Anderson, A. S., Clark, D. J., Gibbons, P. H. and Sigmund, J. M. 2002. The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural population of actinomycetes. *J. Indust. Microbiol. & Biotechnol.* 29: 60-69.
- Bredholt, H., Fjarvik, E., Johnsen, G. and Zotchev, B. S. 2008. Actinomycetes from Sediments in the Trondheim Fjord, Norway: Diversity and Biological Activity. *Marine Drugs* 6(1), 12–24
- Challis, G. L. and Hopwood, D. A. 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(2): 14555-14561.
- Chater, K. F. 2006. *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. Review. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 361: 761–768.
- Dawn R. D., Tahlan, B., Colvin, K. R., Jensen, S. E. and Leskiw, B. K. 2005. Expression of *ccaR*, Encoding the Positive Activator of Cephamycin C and Clavulanic Acid Production in *Streptomyces clavuligerus*, Is Dependent on *bldG*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 49: 1529–1541.
- Egan, S., Wiener, P., Kallifidas, D. and Wellington, E. M. H. 1998 Transfer of streptomycin biosynthesis gene cluster within Streptomyces isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (12): 5061-5063.
- Flårdh, K., Buttner M.J., 2009. Streptomyces morphogenesis: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Rev Microbiol.* 7(1):36-49. Review.
- Henry, J. H., Fedor K., V., Gregory, J. Hannon, M, A. E., 2008. Developmentally regulated cleavage of tRNAs in the bacterium *Streptomyces coelicolor*. *Nucleic Acids Research.* 36(3):732-741.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. and Hopwood, D. A. 2000. Practical *Streptomyces* genetics, a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, England.
- Li, W., Ying, X., Guo, Y., Yu, Z., Zhou, X., Deng, Z., Kieser, H., Chater, K. F., and Tao, M., 2006. Identification of a Gene Negatively Affecting Antibiotic Production and Morphological Differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of Bacteriology*, December, p. 8368-8375, Vol. 188, No. 24
- Liras, P. and Martín, J. F. 2006. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Internat. Microbiol.* 9: 9-19.
- Liras, P., Gomez-Escribano J. P., Santamarta I., 2008. Regulatory mechanisms controlling antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:667–676
- Mellado, E., Lorenzana, L., Rodríguez-Sa'iz, M., B. Díez, M., Liras, P. and Barredo, J. L. 2002. The clavulanic acid biosynthetic cluster of *Streptomyces clavuligerus*: genetic organization of the region upstream of the *car* gene. *Microbiol.* 149:1427–1438.
- Pulsawat, N., Kitani, S., Fukushima, E., and Nihira, T., 2009. Hierarchical control of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae* by three pathway-specific regulators: VmsS, VmsT and VmsR. *Microbiology* April 1, 155:1250-1259
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 2002. Molecular cloning: a laboratory manual, Third Edition, Chapter one. Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York.



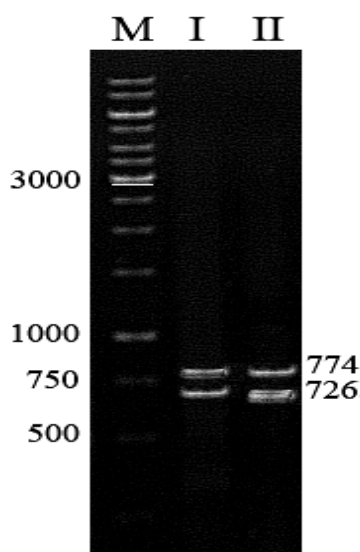
جدا سازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن تنظیمی *claR* از استرپتومایسس ... / ۹

Song, J. Y., Kim, E. S., Kim, D. W., Jensen S. E. and Lee, K. J., 2009. A gene located downstream of the clavulanic acid gene cluster in *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 encodes a putative response regulator that affects clavulanic acid production. *J of Indust Microbiol and Biotechnol.* Volume 36,

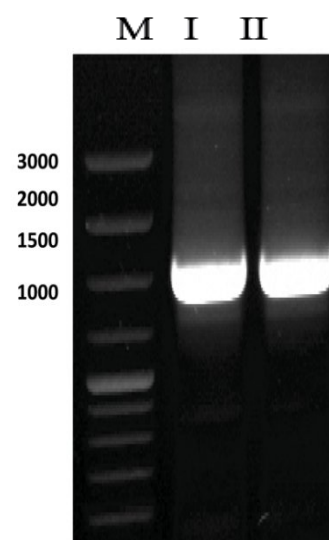
Number 2 , February  
Zelyas, N. J., Cai, H., Kwong, T. and Jensen, S. E., 2008. Alanylclavam Biosynthetic Genes Are Clustered Together with One Group of Clavulanic Acid Biosynthetic Genes in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Bacteriol.* December 15, 190:7957-7965



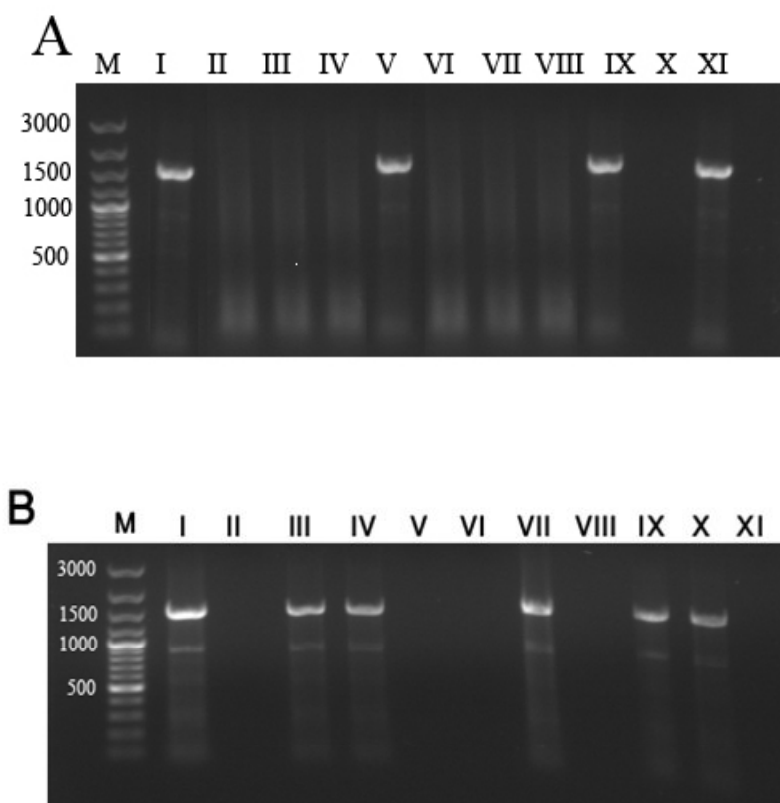
شکل ۱



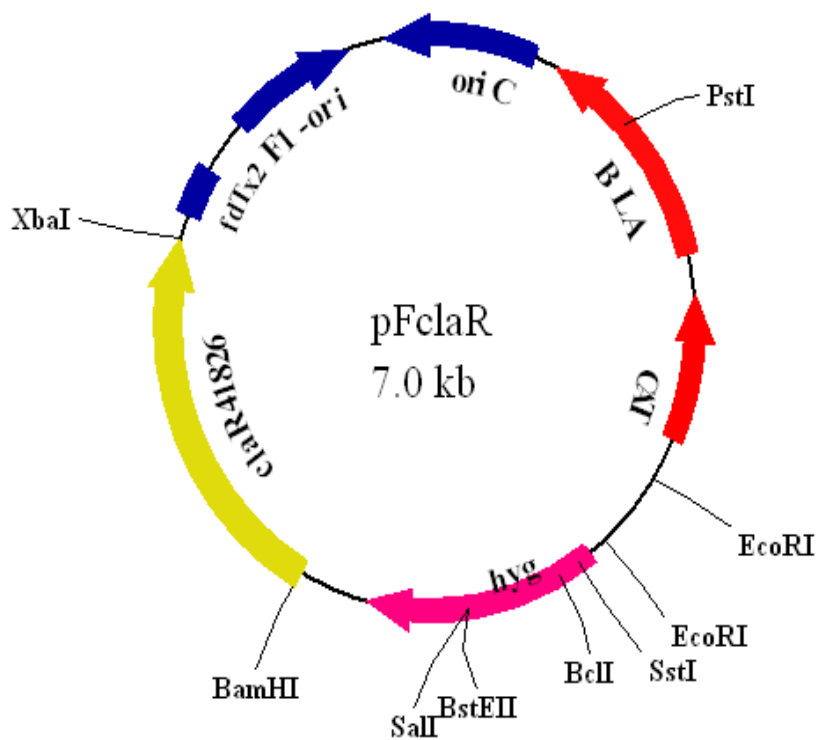
شکل ۳



شکل ۲



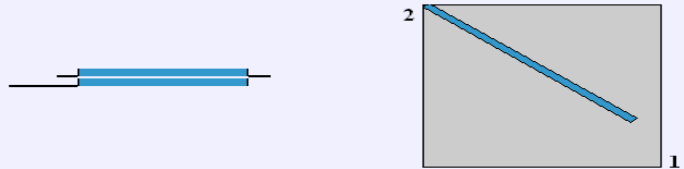
شکل ۴



شکل ۵

**Sequence 1:** lc|1  
Length = 1201 (1 .. 1201)

**Sequence 2:** lc|65536  
Length = 1467 (1 .. 1467)



**NOTE:**Bitscore and expect value are calculated based on the size of the nr database.

**NOTE:**If protein translation is reversed, please repeat the search with reverse strand of the query sequence.



Score = 1994 bits (1037), Expect = 0.0  
Identities = 1037/1037 (100%), Gaps = 0/1037 (0%)  
Strand=Plus/Minus

Query	26	CGATTCCGAAGCAATTCAAGAGCCACTTCGGACAATTCAGCGGTACAGTCCTTGACGGAA	85
Sbjct	1467	CGATTCCGAAGCAATTCAAGAGCCACTTCGGACAATTCAGCGGTACAGTCCTTGACGGAA	1408
Query	86	AAGGGAACCGACATTGTCTCTCGGGTCAGAACCACGCTCTGCTGGTGTGACCCGATGCGA	145
Sbjct	1407	AAGGGAACCGACATTGTCTCTCGGGTCAGAACCACGCTCTGCTGGTGTGACCCGATGCGA	1348
Query	146	TCTGTCTTTACTGGACGCGGTGGGACACTGCGGAGACCTCATGGAAGTGGCCCGGCGGAC	205
Sbjct	1347	TCTGTCTTTACTGGACGCGGTGGGACACTGCGGAGACCTCATGGAAGTGGCCCGGCGGAC	1288
Query	206	GGGTGTCCGGCACGGCACCGTGGAGCGCAGACTCGACCGGCTGGACCGGATCGTCCGGCCT	265
Sbjct	1287	GGGTGTCCGGCACGGCACCGTGGAGCGCAGACTCGACCGGCTGGACCGGATCGTCCGGCCT	1228
Query	266	CCCGCTGACCCCTGCGCAGCCGCCACACGGCCCGGCTGACCAACCGCGGGCTCCCGCATCCT	325
Sbjct	1227	CCCGCTGACCCCTGCGCAGCCGCCACACGGCCCGGCTGACCAACCGCGGGCTCCCGCATCCT	1168
Query	326	CGTCCGCGGGCGGCGGTTCTTCCACCAGGTCGACCTGGCCCGCGGACGCATATCTTCGG	385
Sbjct	1167	CGTCCGCGGGCGGCGGTTCTTCCACCAGGTCGACCTGGCCCGCGGACGCATATCTTCGG	1108
Query	386	CCATGGCTCCGAGGCCGCTGGACGCCCGGAGGTGCTGTGCTGGTCTCCACGGAACCCCT	445
Sbjct	1107	CCATGGCTCCGAGGCCGCTGGACGCCCGGAGGTGCTGTGCTGGTCTCCACGGAACCCCT	1048
Query	446	GCTCGACGAGGTGGTGGAGGACGCGGGCGCCTCGCTGGACCTGCTGCTGTGCGGTCCGGCA	505
Sbjct	1047	GCTCGACGAGGTGGTGGAGGACGCGGGCGCCTCGCTGGACCTGCTGCTGTGCGGTCCGGCA	988
Query	506	CGAGGCCCGCACCCAGGTCGCGCGCCCAACTGGCGGGCTACCAGGTGGACGCGGCCTACAC	565
Sbjct	987	CGAGGCCCGCACCCAGGTCGCGCGCCCAACTGGCGGGCTACCAGGTGGACGCGGCCTACAC	928
Query	566	CTGGAGCCTCCAGTCCCCCGGCACAGCCTGGAGCGGTCGTCGCGACCTGTGAGGTGCT	625
Sbjct	927	CTGGAGCCTCCAGTCCCCCGGCACAGCCTGGAGCGGTCGTCGCGACCTGTGAGGTGCT	868
Query	626	GGACGACCCGCTGTGGGTGATCCTGCCCCGGGACCATCCGCTGGCCCGCCGGCGGGAGGT	685
Sbjct	867	GGACGACCCGCTGTGGGTGATCCTGCCCCGGGACCATCCGCTGGCCCGCCGGCGGGAGGT	808
Query	686	CTCGCTCGCCGATCTGCGGGACGAGACCTGGGTGTCCGAGACGGGACCCGGCTCGGAGAT	745
Sbjct	807	CTCGCTCGCCGATCTGCGGGACGAGACCTGGGTGTCCGAGACGGGACCCGGCTCGGAGAT	748
Query	746	CCTGGTGCACGCTGTCTTCCAGCTGGCCGGGCTCACCGCGCCACCCGGCTCCACATCAC	805
Sbjct	747	CCTGGTGCACGCTGTCTTCCAGCTGGCCGGGCTCACCGCGCCACCCGGCTCCACATCAC	688
Query	806	GGGGGCATCGGTTGCCCGGGGCATCCTGCGCCGCGGGGACGCGATAGGTCTCGGCTCGCC	865
Sbjct	687	GGGGGCATCGGTTGCCCGGGGCATCCTGCGCCGCGGGGACGCGATAGGTCTCGGCTCGCC	628
Query	866	CACCCACCCGGCGGTGCAGGACCCCTCGCTGGTGCAGCCGCTCCCTGGCGGAGCGCCCGCG	925
Sbjct	627	CACCCACCCGGCGGTGCAGGACCCCTCGCTGGTGCAGCCGCTCCCTGGCGGAGCGCCCGCG	568
Query	926	CCGCACCACGAGTCTGCTCGTCGACCCACCATCGTGCCCGGGCGCTGGCGGGACGGCT	985
Sbjct	567	CCGCACCACGAGTCTGCTCGTCGACCCACCATCGTGCCCGGGCGCTGGCGGGACGGCT	508
Query	986	GGCCGCGCTGATCGCCGAGGTCCAGCTCCGGCGCTTCGCGGAACACCACCGCGACTGCT	1045
Sbjct	507	GGCCGCGCTGATCGCCGAGGTCCAGCTCCGGCGCTTCGCGGAACACCACCGCGACTGCT	448
Query	1046	GGACGAGCCCTGGTGGG	1062
Sbjct	447	GGACGAGCCCTGGTGGG	431

CPU time: 0.02 user secs. 0.01 sys. secs 0.03 total secs.

شکل ۶

شکل ۱: قسمتی از توالی ژن *claR* به همراه پرایمر اختصاصی *claR2* طراحی شده و جایگاه‌های برش آنزیمی تعبیه شده در این پرایمر. کدون شروع و ختم نیز روی شکل نشان داده شده است.

شکل ۲: تکثیر ژن *claR* توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (*claR2*)

(I ژن *claR* از سویه DSM 73 و II ژن *claR* از سویه PTCC 1705

(M مارکر ۱۰۰bp DNA Ladder Plus

توجه: اندازه‌های ذکر شده بر اساس جفت باز است.

شکل ۳: هضم آنزیمی محصول PCR ژن *claR* با آنزیم محدودکننده *PvuII*

(I سویه DSM 738 و II سویه PTCC 1705

(M مارکر ۱kb DNA Ladder Plus

توجه: اندازه‌های ذکر شده بر اساس جفت باز است.

شکل ۴: تأیید ترانسفورماسیون پلاسמידهای *pGclaR* و *pFclaR*

(A پلاسמיד *pGclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه DSM738 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II از *E. coli* ترانسفورم نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج colony-PCR روی کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورماسیون پلاسמיד *pGclaR*

(B پلاسמיד *pFclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه PTCC ۱۷۰۵ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II کنترل منفی

شکل ۵: ساختار پلاسמיד *pFclaR*

شکل ۶: بررسی بیوانفورماتیک و انجام Blast2seq، در این نمودار مربعی شکل (بالا) خطوط ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به توالی ژن *claR* از سویه PTCC1705 و سویه DSM 738 است که نشان دهنده تشابه توالی این ژن در این دو سویه است. در قسمت پایین شکل، توالی QUERY مربوط به ژن *claR* از سویه PTCC 1705 و توالی subject مربوط به ژن *claR* از سویه DSM738 است.

شکل ۷: تأیید ترانسفورماسیون پلاسמידهای *pGclaR* و *pFclaR*

(A پلاسמיד *pGclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه DSM738 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II از *E. coli* ترانسفورم نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

نتایج colony-PCR روی کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورماسیون پلاسמיד *pGclaR*

(B پلاسמיד *pFclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه PTCC ۱۷۰۵ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II کنترل منفی

نتایج colony-PCR روی کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورماسیون پلاسמיד *pFclaR*

(B پلاسמיד *pFclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه PTCC ۱۷۰۵ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II کنترل منفی

نتایج colony-PCR روی کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورماسیون پلاسמיד *pGclaR*

(B پلاسמיד *pGclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه PTCC ۱۷۰۵ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II کنترل منفی

نتایج colony-PCR روی کلونی‌های مختلف حاصل از ترانسفورماسیون پلاسמיד *pFclaR*

(B پلاسמיד *pFclaR*

(I محصول PCR ژن *claR* از سویه PTCC ۱۷۰۵ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

(II کنترل منفی