مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
دوره چهاردهم ، شماره دوم ، تابستان ۱۳۸۵، صفحات ۵۵-۵۱

جداسازی و تأیید مولکولی سریع استرپتومایسس های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین

فرشاد درویشی هرزویلی*[۱]، دکتر زهره حجتی[۲]، دکتر مجید متولی باشی[۳]

چکیده

مقدمه: گونه های استرپتومایسس، باکتری های رشته ای گرم مثبت و هوازی هستند که ازخاک جدا می شوند و دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک ها را تولید می کنند. استرپتومایسس گریزئوس آنتی بیوتیک استرپتومایسین و اسپور را حتی در محیط مایع تولید می کنند. دسته ژنی تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین دارای ژن strR است که پروتئین تنظیم کننده اختصاصی این دسته ژنی را کد می نماید. هدف از این تحقیق جداسازی و تأیید سریع استرپتومایست های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین به ویژه استرپتومایسس گریزئوس از خاک های ایران است تا برای افزایش تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین درستکاری شوند.

روش بررسی: دراین تحقیق از یک محیط کشت نیمه اختصاصی ابتکاری جدید به نام میحط کشت FZmsn برای جداسازی استرپتومایست ها از محیط های طبیعی به کار رفت. ۵۰ کلنی رشد یافته بر روی محیط کشت FZmsn بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و مطالعات میکروسکوپی به عنوان سویه های استر پتومایسس جداسازی شد. یک جفت پرایمر اختصاصی برای شناسایی ژن strR به وسیله نرم افزار اولیگو طراحی گردید.

نتایج: با تکنیک Colony-PCR، شش کلنی از کلنی های سویه های استرپتومایسس به عنوان کلنی های استرپتومایسس گریزئوس تعیین شد.

نتیجه گیری: از سویه های استرپتومایسس بومی به منظور درستکاری ژنتیکی استرپتومایسس گریزئوس جهت افزایش تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین استفاده خواهد شد

واژه های کلیدی: استرپتومایسس گریزئوس، استرپتومایسین ، ژن strR ، محیط کشت FZmsn ، Colony-PCR.

مقدمه

استرپتومایسس جنسی از باکتری های رشته ای گرم مثبت است که ژنوم آن دارای GC بالا در حدود ۷۳- ۶۹ مول درصد می باشد [۱]. بیش از ۵۰۰ گونه استرپتومایسس وجود دارد که ظاهرخشک کلنی بالغ، فشردگی طبیعی و رنگ آن بر روی محیط آگاردار تشخیص کلنی های استرپتومایسس را آسان می کند. جایگاه طبیعی اکثر استرپتومایست ها خاک است و حدود ۱ تا ۲۰ درصد جمعیت قابل کشت را تشکیل می دهند [۲].

استرپتومایسس ها از لحاظ پزشکی بیشتر به خاطر سنتز دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک ها اهمیت دارند. نزدیک به ۵۰ درصد از استرپتومایسس های خاک بیش از ۵۰۰ ماده آنتی بیوتیکی مجزا تولید می کنند، تعداد زیادی از این ترکیبات از لحاظ شیمیایی ساختار مشخص دارند [۳].

Streptomyces griseus یکی از گونه های جنس استرپتومایسس است که به علت تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین [۴]، تشکیل اسپور در محیط مایع با محدودیت غذایی و فقر فسفاتی [۵] و تولید یک هورمون میکروبی به نام فاکتور A گونه منحصر به فرد این جنس است [۶،۷]. کندیسیدین، نوبیوسین، سیکلوهگزامید

*۱- نویسنده مسئول: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، تلفن همراه : ۰۹۱۱۱۴۹۱۰۷۸ ، تلفن: ۷۹۳۲۴۷۹-۰۳۱۱ نمابر: ۷۹۳۲۴۵۶ – ۰۳۱۱-
E mail: fdarvishi2001@yahoo.com
۲و۳- دکتری ژنتیک مولکولی - استادیار گروه زیست شناسی - دانشکده علوم – دانشگاه اصفهان
تاریخ دریافت:۱۳۸۴/۹/۱۰ تاریخ پذیرش:۱۳۸۵/۴/۱۵

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

وکرومومایسین A از جمله سایر آنتی بیوتیک های هستند که توسط S. griseus تولید می شود[۸] و خانواده ۱۹ کتینازها ابتدا در این گونه کشف شد[۹].

دسته ژنی سنتز کننده استرپتومایسین بیش از ۲۵ ژن برای اعمال بیوسنتز، تنظیم، مقاومت و انتقال در Streptomyces griseus N2-3-11 دارد(شکل ۱). ژن strR با اندازه ۱۰۵۲ جفت باز یکی از ژنهای دسته ژنی بیوسنتزکننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. محصول این ژن پروتئین تنظیمی StrR است که اکثر اپرونهای مسئول بیوسنتز آنتی بیوتیک استرپتومایسین را تنظیم و کنترل می نماید[۱۰،۱۱].

هدف نهایی این تحقیق جداسازی و تأیید سریع مولکولی استرپتومایست های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین به ویژه استرپتومایسس گریزئوس از خاک های ایران است تا برای افزایش تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین درستکاری شوند. از آنجایی که روشهای بیوشیمیایی در تشخیص استرپتومایست ها مشکل و جوابهای متغییری می دهد و امروزه روشهای مولکولی درتشخیص میکروارگانیسمها دارای اهمیت و ضریب اطمینان بالایی است[۲]، دراین تحقیق روش مولکولی برای شناسایی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعات قبلی از روشهای مولکولی برای شناسایی استفاده شده است[۱۰]، اما در این تحقیق علاوه بر این از یک محیط کشت ابتکاری نیمه اختصاصی با کارایی بهتر برای جداسازی استرپتومایست ها استفاده گردیده است. نکته دیگر دراین تحقیق استفاده از یک روش PCR به نام Colony-PCR است که به صورت روتین در دانشگاه UMIST انگلستان و دانشگاه اصفهان انجام می شود.

روش بررسی

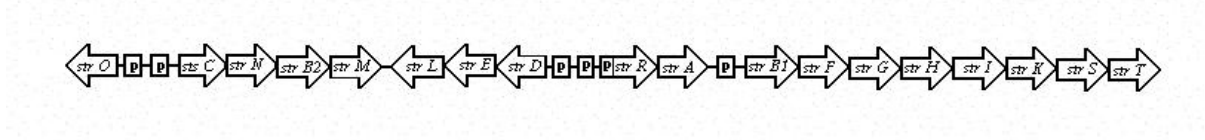
سویه باکتری: ازسویه باکتری استاندارد Streptomyces griseue در این تحقیق به عنوان شاهد در بررسی نمونه های جدا شده استفاده گردید که از دانشگاه UMIST انگلستان تهیه شد.

محیط های کشت: محیط کشت MSA (Manitol Soya Agar) برای کشت استرپتومایسس اساندارد به کار رفت[۱۲].

در این تحقیق به منظور جداسازی آسان و سریع استرپتومیست ها از محیط های طبیعی یک محیط کشت نیمه اختصاصی ابتکاری جدید به نام میحط کشت FZmsn ابداع گردیدکه براساس دو محیط کشت رشد استرپتومایسس ها یعنی MSA وGYM می باشد[۱۲]. میحط کشت FZmsn حاوی ۲۰ گرم در لیتر قند مانیتول(شرکت سیگما)، ۲۰ گرم در لیتر آرد سویا (شرکت سیگما)، پنج گرم در لیتر کلرید سدیم، دو گرم در لیتر کربنات کلسیم، ۱۶ گرم در لیتر آگار-آگار است که در یک لیتر آب مقطر حل می گردد و پس از استریل کردن و خنک شدن یک گرم در لیتر به آن نیستاتین در شرایط استریل اضافه می شود. کلنی باکتری استرپتومایسس برروی این محیط، به رنگ سفید با ظاهر خشک وگچی می باشد.

نمونه های خاک: نمونه برداری از خاک های کشاورزی مختلف به ویژه زمین های زیر کشت سویا صورت گرفت. ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد. سپس سری رقت تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از هر سری رقت بر روی میحط کشت FZmsn کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷-۳ روز در انکوباتور نگهداری گردید.

شناسایی مورفولوژیکی: کلنی های استرپتومایسس به طور معمول به رنگ سفید و ظاهری خشک وگچی روی میحط کشت FZmsn دارند، همچنین دارای بوی خاک هستند، از این ویژگی ها برای شناسایی اولیه کلنی استرپتومایسس استفاده می شود. در مرحله بعد از رنگ آمیزی گرم و همچنین روش کشت اسلایدی slide culture method می توان برای شناسایی مورفولوژیکی کلنی های استرپتومایسس با در نظر گرفتن خصوصیات نمونه استاندارد استفاده کرد[۱۲].



شکل (۱): آرایش برخی از ژن های مربوط به دسته ژنی str بیوسنتز کننده استرپتومایسین[۱۰]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

پرایمرها: با توجه به هدف تحقیق که شناسایی و تأیید مولکولی استرپتومایست های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین به ویژه استرپتومایسس گریزئوس براساس ژن تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین (strR) است و با در نظر گرفتن خصوصیات ژن strR ، یک جفت پرایمراختصاصی برای تأیید ژن strR با نرم افزار OLIGO (version 5, W. Rychlik) طراحی شد که توالی پرایمرها به صورت زیر است که محصولی به اندازه یک کیلو جفت باز تولید می نماید:

5′-CCC CGA GCA ACGT CG TGA GA-3′ (forward)

و 5′-CGA TGC CGG CCT GGT CCA GTT-3′ (reverse).

Colony-PCR : مواد و مقدار مورد نیاز از آنها برای انجام یک PCR به حجم ۵۰ میکرولیتری در جدول (۱) لیست شده است [۱۳].

جدول (۱) : مواد و مقدار مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۵۰ میکرولیتری [۱۳]

نوع ترکیب	حجم	غلظت
Template DNA	1 µl	50 ng
Upstream primer	1 µl	20 pM
Downstream primer	1 µl	20 pM
dNTP Mix	1µ2	10 mM
DMSO	1µ4	–
10 x PCR buffer with $MgSo_4$	1 µ2	200 mM Tris-HCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA, 20mM $MgSO_4$
Pfu polymerase	1µ0.3	2.5 u /µl
deionised dH_2O	Up µl to 50	–

این تکنیک با اندکی تفاوت شبیه به تکنیک PCR است ولی سریع تر از آن صورت می گیرد. در این تکنیک به جای استخراج DNA و استفاده از DNA خالص برای PCR ، به صورت مستقیم مقدار بسیار کمی از کلنی باکتری را از روی محیط کشت توسط خلال دندان استریل به مخلوط PCR اضافه کرده و به جای مقدار DNA جدول (۱) به آن آب مقطر دایونیزه اضافه می شود[۱۳]. سپس PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر پس از بهینه سازی طبق برنامه زیر صورت گرفت: دناتوره اولیه در دمای ^0C ۹۴ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۲۵ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره ^0C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه و دمای چسبیدن ^0C ۶۶ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ^0C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای ^0C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی شدند.

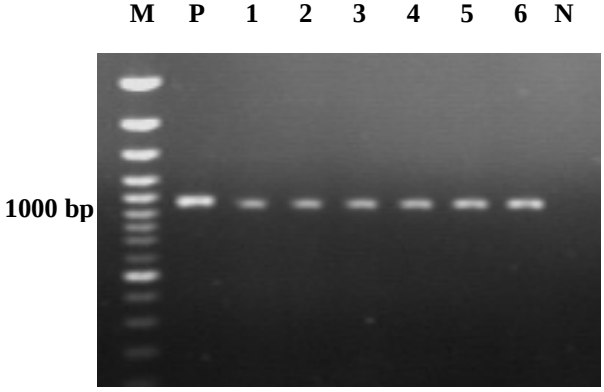
نتایج

پس از۷-۳ روز انکوباسیون نمونه های کشت شده بر روی پلیت های میحط کشت FZmsn ، پلیت ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و مطالعات میکروسکوپی نظیر رنگ سفید با ظاهر خشک وگچی روی میحط کشت FZmsn و بوی خاک حاصل از فعالیت های فیزیولوژیکی آنها و همچنین رنگ آمیزی گرم و روش کشت اسلایدی برای بررسی ویژگی های میسلیوم ها و آرایش اسپور ها، ۵۰ کلنی از مجموعه کلنی های رشد یافته بر روی میحط کشت FZmsn به عنوان سویه های استرپتومایسس شناسایی و جداسازی شد. در این تحقیق نیاز به مطالعات آماری نبود ولی میحط کشت FZmsn درمقایسه با سایر محیط های کشت استرپتومایسس ها نظیر محیط های کشت MSA و GYM اختصاصیت بالایی برای جداسازی استرپتومایسس ها دارد به طوری که به علت وجود ضد قارچ نیستاتین در این محیط کشت آلودگی قارچی ایجاد نمی شود و به خاطر کمپلکس های پیچیده و املاح نمکی موجود در آن آلودگی باکتریایی اندکی به وجود می آید.

در مرحله بعد تکنیک Colony-PCR بر روی ۵۰ کلنی جداسازی شده به عنوان سویه های استر پتومایسس صورت گرفت و محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی شد که نتایج در شکل (۲) ملاحظه می شود. شش کلنی استرپتومایسس گریزئوس پس ازخالص سازی با روش مولکولی Colony-PCR شناسایی شد، به علت چسبندگی شدید استرپتومایسس گریزئوس به محیط کشت آگاردار بهینه سازی Colony-PCR به مراتب بسیار مشکل تر از PCR بر روی DNA استخراج شده است به همین دلیل برخی از باندهای مربوط به شش سویه استرپتومایسس گریزئوس بر روی تصویر ژل شکل (۲) ضعیف و قوی هستند، البته نتایج به دست آمده با آزمایش های

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

بیوشیمیایی اختصاصی استرپتومایسس گریزئوس نیز تأیید شد.



شکل (۲) : نتایج Colony-PCR از کلنی های استرپتومایسس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی.
نمونه P . محصول حاصل از Colony-PCR کلنی استرپتومایسس گریزئوس استاندارد به عنوان کنترل مثبت،
نمونه های 1-6 . محصول حاصل از Colony-PCR کلنی های استرپتومایسس جداسازی شده ازنمونه های خاک،
نمونه N . کنترل منفی، نمونهM . مارکر.

بحث

با استفاده از محیط کشت FZmsn و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و مطالعات میکروسکوپی استرپتومایسس ها از بین کلنی های مختلف، ۵۰ کلنی به عنوان سویه های استر پتومایسس جداسازی شد. آزمایش های بیوشیمیایی برای شناسایی گونه های استر پتومایسس بسیار سخت و مشکل است و معمولاً جواب های متغییری می دهد [۲] و به همین دلیل در این تحقیق پس از بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و مطالعات میکروسکوپی استر پتومایسس ها، برای تعیین دقیق وسریع استرپتومایست های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین به ویژه استرپتومایسس گریزئوس از روش مولکولی PCR استفاده شد.

در دسته ژنی بیوسنتز کننده استرپتومایسین بیش از ۲۵ ژن برای اعمال بیوسنتز، تنظیم، مقاومت و انتقال در N2-3-11 Streptomyces griseus وجود دارد. برخی از ژنهای مهم و مشخص از لحاظ عملکرد دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین و از جمله ژن strR در سال ۱۹۸۷ توسط دیستلر و همکارانش تعیین توالی شد [۱۰]. ژن strR با اندازه bp ۱۰۵۲ یکی از ژنهای دسته ژنی بیوسنتزکننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. ژن strR پروتیین StrR را کد می نماید که فعال کننده نسخه برداری ویژه مسیر برای تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین می گردد و در نتیجه بیان آن، دسته ژنی استرپتومایسین برای بیوسنتز استرپتومایسین از گلوکز فعال می شود [۱۱].

به علت نقش حیاتی و عملکرد ژن تنظیم کننده دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین(strR) که از لحاظ توالیDNA پایدار است و بیانگر وجود دسته ژنی بیوسنتزکننده استرپتومایسین است، از این ژن برای تعیین وتأیید مولکولی استرپتومایسس گریزئوس استفاده شد [۱۰]. با در نظر گرفتن خصوصیات ژن strR، یک جفت پرایمراختصاصی برای تایید ژن *str*R با نرم افزار OLIGO (version 5, W. Rychlik) طراحی شد.

با توجه به نتایج حاصل تکنیک Colony-PCR برای شناسایی کلنی های استرپتومایسس گریزئوس بهینه گردید. اما هدف اصلی از راه اندازی تکنیک این است که بدون نیاز به استخراج DNA و صرفه جویی در استفاده از مواد و زمان و با ضریب اطمینان بالا، تنها با استفاده ازکلنی هایی که از خاک جدا می شوند، کلنی های استرپتومایسس گریزئوس شناسایی گردد. شش کلنی استرپتومایسس گریزئوس پس ازخالص سازی با روش مولکولی Colony-PCR شناسایی شد که معتبرتر از روش های بیوشیمیایی است البته نتایج به دست آمده با آزمایش های بیوشیمیایی نیز تأیید شد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که به راحتی می توان با استفاده از محیط کشت نیمه اختصاصی ابتکاری جدید FZmsn و تکنیک مولکولی Colony-PCR، کلنی های استرپتومایسس گریزئوس را با سرعت و دقت بالا جداسازی و شناسایی کرد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق را می توان با اندکی تغییر به ویژه با طراحی پرایمرهای اختصاصی، برای جداسازی و شناسایی سایر گونه های جنس استرپتومایسس به کاربرد. در آینده نزدیک از نمونه های جداسازی شده برای هدف اصلی این تحقیق که افزایش بیان ژن strR و در نتیجه افزایش میزان تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین در سویه های بومی ایران است، استفاده خواهد شد.

سپاسگزاری

از تحصیلات تکمیلی و معاونت پژوهشی دانشگاه

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

اصفهان به خاطر حمایتهایشان سپاسگزاریم. بر خود لازم می دانیم از آقایان: دکتر ناصر گلبانگ، دکتر حمید میرمحمد صادقی و سرکار خانم مؤذن و سایر کارشناسان محترم گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خاطر همکاری وکمک های ارزنده شان تشکر و قدردانی نماییم.

از اساتید محترم و کارشناسان گروه زیست شناسی دانشگاه گیلان به ویژه جناب آقای دکتر نجفی و خانم ها شایگان و کاظمی تشکر می نماییم. همچنین از آقای فرشید درویشی هرزویلی به خاطر کمک در رسم شکل (۱) سپاسگزاریم.

References

1- Gust B, Challis GL, Fowler K, Kiser T, Chater KF**.** ***PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin.*** PNAS 2003: 100(4): 1541-1546.

2- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 5 th ed. Mc Graw-Hill Higher Education. 2002.

3- Bltz RH. ***Genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces.*** Trends in Microbiology 1998: 6(2): 76-83.

4- Lezhava A, Kameoka D, Horinouchi S, Kinashi H. ***Chromosomal deletions in Streptomyces griseus that remove the afsA locus.*** Mol Gen Gene 1997: 253: 478-483.

5- Kendrick KE, Ensign JC. ***Sporulation of Streptomyces griseus in submerged culture.*** J Bacteriol 1983: 155: 357-366.

6- Horinouchi S. ***A microbial hormone, A- factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in Streptomyces griseus.*** Frontiers in Bioscience 2002: 7: 2045-2057.

7- Horinouchi S, Beppu T. ***Autoregulatory factors and communication in actinomycetes.*** Annu Rev Microbiol 1992: 46: 377-398.

8- Ja G. ***Candicidin biosynthesis in Streptomyces griseus***. Appl Environ Microbial 2003: 60(3): 633-642.

9- Kawase T, Saito A, Kanai R, Fuji T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T. ***Distribution , phylogenetic analysis of family 19 chitinasese in Actinobactria.*** Appl Environ Microbial 2004: 70(2): 1135-1144.

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

11- Retzlaff L, Distler J. ***The regulator of streptomycin gene expression, strR, of Streptomyces griseus is a DNA binding activator protein with multiple recognition sites***. Mol Microbiol 1995: 18: 151-162.

12- Bibb MJ, Hopwood DA, Chater KF, Kieser T, Bruton C, Kieser HM, Lydiate DL, Smith CP, Ward JM, Schrempf H**.** ***Genetic manipulation of Streptomyces: a laboratory manual.*** The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom. 1985.

13- Hojati Z. ***Genetic Manipulation of the Biosynthetic Pathway for Production of the Calcium-Dependent Antibiotic in Streptomyces coelicolorA3 (2).*** PhD. Thesis UMIST, Manchester, UK. 2002.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]