

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 از خاک جدا می شوند و دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک ها را تولید می کنند. استرپتومایسس گریزنوس 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 استرپتومایسس های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین به ویژه استرپتومایسس گریزنوس از خاک های ایران است تا برای افزایش تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسین در دستکاری شوند.

روش بررسی: در این تحقیق از یک محیط کشت نیمه اختصاصی ابتکاری جدید به نام محیط کشت FZmsn برای جداسازی استرپتومایسس 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 استرپتومایسس 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 گریزنوس تعیین شد.

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

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

مقدمه

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 فسفات^(۵) و تولید یک هورمون میکروبی به نام فاکتور A گونه منحصر به فرد این جنس است^(۶،۷). کندیسیدین، نوبوسین، سیکلو هگزامید

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 ظاهر خشک کلنی بالغ، فشردگی طبیعی و رنگ آن بر روی محیط آگاردار تشخیص کلنی های استرپتومایسس را آسان می کند. جایگاه طبیعی اکثر استرپتومایسس ها خاک است و حدود ۱ تا ۲۰ درصد جمعیت قابل کشت را تشکیل می دهند^(۲).

* نویسنده مسئول: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، تلفن همراه: ۰۹۱۱۱۴۹۱۰۷۸، تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۹، نم: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۵۶

E mail: fdarvishi2001@yahoo.com

۳ و ۲- دکتری ژنتیک مولکولی - استادیار گروه زیست شناسی - دانشکده علوم - دانشگاه اصفهان

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۵/۴/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۸۴/۹/۱۰

برای کشت استرپتومایسس استاندارد به کار رفت^(۱۲). در این تحقیق به منظور جداسازی آسان و سریع استرپتومایسس ها از محیط های طبیعی یک محیط کشت نیمه اختصاصی ابتکاری جدید به نام محیط کشت FZmsn ابداع گردید که براساس دو محیط کشت رشد استرپتومایسس ها یعنی MSA و GYM می باشد^(۱۲). محیط 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 بر روی این محیط، به رنگ سفید با ظاهر خشک و گچی 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 محیط 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 و گچی روی محیط 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).

و کرومومایسین 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 بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسین است. محصول این ژن پروتئین تنظیمی StrR است که اکثر اپرونهاي مسئول بیوسنتز آنتی بیوتیک استرپتومایسین را تنظیم و کنترل می نماید^(۱۰،۱۱).

هدف نهایی این تحقیق جداسازی و تأیید سریع مولکولی استرپتومایسس های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسس به ویژه استرپتومایسس گریزئوس از خاک های ایران است تا برای افزایش تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسس در دستکاری شوند. از آنجایی که روشهای بیوشیمیایی در تشخیص استرپتومایسس ها مشکل و جوابهای متغییری می دهد و امروزه روشهای مولکولی در تشخیص میکروارگانیسمها دارای اهمیت و ضریب اطمینان بالایی است^(۲)، در این 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 استرپتومایسس ها استفاده گردیده است. نکته دیگر در این 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: از سویه باکتری استاندارد *Streptomyces griseus* 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)



شکل (۱): آرایش برخی از ژن های مربوط به دسته ژنی str بیوسنتز کننده استرپتومایسس^(۱۰)

اضافه می شود^(۱۳). سپس PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر پس از بهینه سازی طبق برنامه زیر صورت گرفت: دناتوره اولیه در دمای °C ۹۴ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۲۵ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره °C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه و دمای چسبیدن °C ۶۶ به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه انجام شد و در انتها تکثیر نهایی در دمای °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل ۰/۷ درصد آگاروز بررسی شدند.

نتایج

پس از ۷-۳ 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 و گچی 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 میسلیم 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 در مقایسه 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 استرپتومایسس 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 از خالص 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

پرایمرها: با توجه به هدف تحقیق که شناسایی و تأیید مولکولی استرپتومایسس های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسسین به ویژه استرپتومایسس گریزئوس بر اساس ژن تنظیم کننده تولید آنتی بیوتیک استرپتومایسسین (strR) است و با در نظر گرفتن خصوصیات ژن strR، یک جفت پرایمر اختصاصی 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)

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

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)

غلظت	حجم	نوع ترکیب
50 ng	1 μl	Template DNA
20 pM	1 μl	Upstream primer
20 pM	1 μl	Downstream primer
10 mM	1 μl	dNTP Mix
-	1 μl	DMSO
200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA, 20mM MgSO ₄	1 μl	10 x PCR buffer with MgSO ₄
2.5 u/μl	1 μl	<i>Pfu</i> polymerase
-	Up to 50 μl	deionised dH ₂ O

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 دیونیزه

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 توالی DNA پایدار است و بیانگر وجود دسته ژنی بیوسنتز کننده استرپتومایسین است، از این ژن برای تعیین و تأیید مولکولی استرپتومایسس گریزئوس استفاده شد^(۱۰). با در نظر گرفتن خصوصیات ژن *strR*، یک جفت پرایمر اختصاصی برای تأیید ژن *strR* 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 از کلنی هایی که از خاک جدا می شوند، کلنی های استرپتومایسس گریزئوس شناسایی گردد. شش کلنی استرپتومایسس گریزئوس پس از خالص 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.

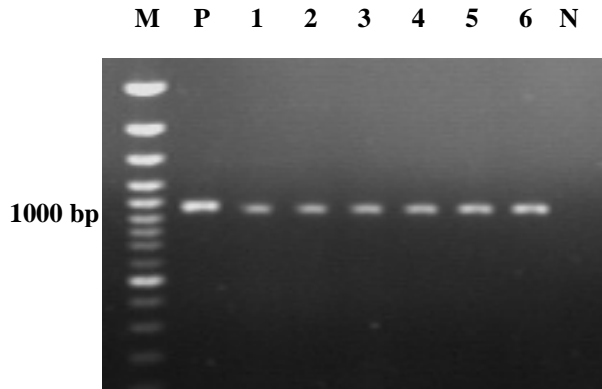
نتیجه گیری

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

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 از نمونه های خاک،
نمونه N. کنترل منفی، نمونه M. 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 استرپتومایسس جداسازی شد. آزمایش های بیوشیمیایی برای شناسایی گونه های استرپتومایسس بسیار سخت و مشکل است و معمولاً جواب های متغیری می دهد^(۲) و به همین دلیل در این تحقیق پس از بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و مطالعات میکروسکوپی استرپتومایسس ها، برای تعیین دقیق و سریع استرپتومایسس های تولید کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسسین به ویژه استرپتومایسس گریزئوس از روش مولکولی PCR استفاده شد.

در دسته ژنی بیوسنتز کننده استرپتومایسسین 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 استرپتومایسسین و از جمله ژن *strR* در سال ۱۹۸۷ توسط دیستلر و همکارانش تعیین توالی شد^(۱۰). ژن *strR* با اندازه ۱۰۵۲ bp یکی از ژنهای دسته ژنی بیوسنتز کننده آنتی بیوتیک استرپتومایسسین

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

اصفهان به خاطر حمایتهايشان سپاسگزاريم. بر خود لازم می دانيم 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 و کمک های ارزنده شان تشکر و قدردانی نمایم.

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 chitinases in Actinobacteria*. Appl Environ Microbial 2004; 70(2): 1135-1144.
- 10- Egan S, Wiener P, Kallifidas D, Wellington EMH. *Transfer of streptomycin biosynthesis gene clusters within Streptomyces 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.