جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



# تعیین مکانیسم مولکولی افزایش تولید لیزین در باکتری موتانت *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* حاصل از پرتوتابی گاما با استفاده از نشانگر STS

**سیده حمیده نورالدینی[۱]– پروین شورنگ*[۲]– محمدطاهر حلاجیان[۲]– حامد زرگران اصفهانی[۲]**

[۱] *دانشگاه پیام نور مرکز تهران ،گروه بیوتکنولوژی کشاورزی*

[۲] *سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای ، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی پزشکی و صنعتی*

## چکیده:

*لیزین یکی از اسید آمینه‌های ضروری است و کاربردهای بسیاری در صنایع مختلف دارد. امروزه شیوه متداول تولید لیزین، استفاده از باکتری کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم می‌باشد. انواع وحشی این باکتری قادر به تولید زیاد لیزین نیستند. از روش‌های مورد استفاده برای افزایش تولید این اسیدآمینه ایجاد جهش می‌باشد. در این مطالعه جهت القا موتاسیون در باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم از پرتو گاما استفاده شد. بیشترین مقدار لیزین به وسیله سویه‌های موتانت در دز ۲۰۰ گری در مقایسه با سویه وحشی تولید شد. برای بررسی ایجاد موتاسیون از ۳ آغازگر اختصاصی مرتبط با ژن‌های مسئول تولید لیزین استفاده شد که ۲ ترکیب آغازگری باندهایی در سویه‌های مورد مطالعه تکثیر نمودند.*

***کلید واژه:*** *پرتو گاما، کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، آغازگرهای اختصاصی، ژن‌های مسئول تولید لیزین*

## مقدمه:

لیزین یکی از اسیدهای آمینه ضروری می‌باشد که توسط انسان و دیگر پستانداران سنتز نمی‌شود و باید از طریق رژیم غذایی آنها تامین شود [۱]. از آنجایی که غلات و سبزیجات لیزین کمی دارند، بنابراین برای افزایش ارزش مواد غذایی و غذای حیوانات که از منابع گیاهی بدست می‌آیند، بایستی غنی‌سازی با افزودن اسیدآمینه لیزین انجام شود [۲]. *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* به طور گسترده‌ای برای تولید اسیدهای آمینه مثل ال-گلوتامات و ال-لیزین به‌کار برده می‌شود [۳].

این باکتری گرم مثبت، غیر اسپورزا، میله‌ای شکل با انتهای متورم شده و هوازی است [۴]. مقدار لیزین قابل تولید در میکروارگانیسم‌های طبیعی بسیار کم است و نمی‌توان با کشت و تکثیر آنها مکمل اسید آمینه مورد نیاز بازار را تأمین کرد. میکروارگانیسم‌های دارای توانایی تولید مقادیر زیاد لیزین با روش موتاسیون یا جهش تصادفی ایجاد شده‌اند و به صورت انحصاری در اختیار چند کشور قرار دارد [۵]. و از آنجایی که انواع وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* قادر به تولید بیش از حد ال-لیزین نیستند، بنابراین تحقیقات زیادی برای اصلاح کردن این ارگانیسم‌ها با جهش‌های هدف‌دار و جهش‌های تصادفی برای بدست آوردن سویه‌های اکسوتروفیک و سویه‌های دارای نقص تنظیمی انجام شده است که برای تولید بیش از حد ال-لیزین مناسب

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد


می‌باشند [٦]. *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* تولید کننده اسیدهای آمینه به صورت تجاری عمدتاً به وسیله تکرار شدن جهش تصادفی و انتخاب گسترش یافته اند [٧].

اهنایشی و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی که بر روی کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم انجام دادند، دریافتند که جهش ژنی gnd منجر به افزایش تولید لیزین در این باکتری می‌شود و معرفی جهش gnd در داخل سویه AHP-۳ از طریق جایگزینی آللی منجر به افزایش ۱۵ درصدی تولید ال –لیزین شد [٨]. در تحقیقی که توسط چراغی و همکاران در سال ۲۰۱۰ برای بهبود تولید لیزین به وسیله بیان بیش از حد آنزیم مزو دی آمینو پایملات دکربوکسیلاز *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در *اشرشیاکلی* انجام شد ژن لیزین lysA که کد کننده آنزیم مزو دی آمینو پایملات دکربوکسیلاز می باشد در *اشرشیاکلی* کلون شد [٩]. آسپارتوکیناز آنزیم کلیدی مسیر بیوسنتز لیزین می‌باشد که به وسیله lysC کد می‌شود و نشان داده شده است که لیزین و ترئونین باعث مهار پس‌خوراند آن می‌شوند. در نسخه‌هایی از آسپارتوکیناز که مهار پس‌خوراند نیستند بیان بیش از حد lysC تولید لیزین را بهبود داد [١٠].

نشانگرهای مولکولی فراوان و در هر موجود زنده ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای *DNA* معرفی شده‌اند و در تجزیه‌های ژنتیکی موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها از نظر بسیاری از ویژگی‌ها مانند میزان چند شکلی، غالب یا همبارز بودن، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی‌یابی *DNA* الگو و هزینه مورد نیاز با همدیگر متفاوتند [١١]. با توجه به‌اینکه تکنیک مولکولی STS مبتنی بر جایگاه‌های نشانمند در توالی، اختصاصی و همبارز می‌باشد، در این مطالعه ارتباط وقوع موتاسیون در ژن‌های مسئول تولید اسیدآمینه لیزین و افزایش تولید لیزین در اثر بکارگیری پرتو گاما با این نشانگر بررسی شد.

**روش کار:**

باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در داخل ۱۰میلی‌لیتر محیط کشت TSB(Tryptic Soy Broth) تلقیح گردید و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری گردید. که بعد از فعال‌سازی این باکتری برای القای جهش به وسیله پرتو گاما در این مطالعه پرتوتابی با دستگاه گاماسل مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج با دامنه دز ۲۰، ۸۰، ۱٤۰، ۲۰۰، ۲٦۰، ۳۲۰، ۳۸۰، ٤٤۰، ٥۰۰ گری انجام پذیرفت.

از باکتری‌های پرتوتابی شده و نمونه کنترل، که حاوی کلنی‌های منفرد باکتری بر روی پلیت نوترینت آگار بود برای جداسازی گونه‌های تولید کننده مقدار زیاد اسید آمینه لیزین استفاده گردید. برای انجام این آزمون از محیط تخمیری استفاده شد که ترکیب آن در جدول۱ آورده شده است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



جدول۱- ترکیبات و غلظت مواد مورد استفاده محیط تخمیر

| ترکیبات | غلظت |
|---|---|
| D-glucose | ٤٠g/L |
| $(NH_٤)_٢SO_٤$ | ٥ g/L |
| $K_٢HPO_٤$ | ٨ g/L |
| $KH_٢PO_٤$ | ٤ g/L |
| $MgSO_٤.٧H_٢O$ | ٠,٢ g/L |
| NaCl | ١ g/L |
| Citric acid | ٠,٥ g/L |
| $FeSO_٤.٧H_٢O$ | ٢٠ mg/L |
| $CaCl_٢.٢H_٢O$ | ٥٠ mg/L |
| L-leucine | ١٠٠ mg/L |
| Trace element | ١٠ Ml |
| $MnSO_٤$ | ٢٠٠ mg |
| $H_٣BO_٣$ | ٦ mg |
| $(NH_٤)_٦MO_٧O_{٢٤}.٤H_٢O$ | ٤ mg |
| $FeCl_٣.٦H_٢O$ | ١٠٠ mg |
| $ZnSO_٤.٧H_٢O$ | ١ mg |
| $CuSO_٤.٥H_٢O$ | ٣٠ mg |
| Biotin | ١,٣ mg |
| Thiamine.HCl | ٤,٦ mg |
| Calciium Pantho | ١١,٣ mg |
| Nicotinic acid | ٥,٧ mg |

محیط تخمیر در لوله‌های آزمایش به میزان ۵ میلی لیتر تقسیم گردیدند. سپس تحت شرایط اسپتیک کلنی‌های منفرد همراه با آگار محیط کشت از داخل پلیت‌ها بریده شد و به محیط تخمیر اضافه شد. سپس با استفاده از ورتکس کاملاً با محیط تخمیر مخلوط گردید تا تمام کلنی در محیط تخمیر پخش شد. از هر دز تعداد ۲۰ الی ۲۵ کلنی انتخاب گردید.

با استفاده از اسپکتروفتومتر، اسپکتروم از ۱۹۰ تا ۳۰۰ نانومتر سویه‌های موتانت گرفته شد و مشخص گردید که نمونه‌های باکتریایی دارای ماکزیمم جذب در ۱۹۷ نانومتر می‌باشد. همچنین اسیدآمینه لیزین خالص نیز که در محیط تخمیر حل گردید دارای ماکزیمم جذب در این طول موج بود. جذب نمونه‌ها در طول موج ۱۹۷ نانومتر بدست آمد و با استفاده از رسم نمودار استاندارد لیزین مقدار غلظت اسیدآمینه لیزین تخمین زده شد.

کلیه لوله‌های آزمایش با کدهای مجزا که نشان دهنده نمونه‌های مختلف بود، بر روی شیکر در ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ٢٤ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از تخمیر نمونه‌ها، از آنها در داخل میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتر کشت ذخیره تهیه گردید و همراه با ۳۰ درصد گلیسرول در فریزر ۲۰- درجه

سانتی‌گراد ذخیره شد. مابقی محیط کشت برای تعیین دانسیته سلولی با استفاده از اسپکتروفتومتر در ٥٤٠ نانومتر استفاده گردید. سپس نمونه‌ها در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و از مایع فوقانی بدست آمده با استفاده از اسپکتروفتومتر، اسپکتروم از ۱۹۰ تا ۳۰۰ نانومتر گرفته شد.

استخراج DNA ژنومی سویه‌های موتانت و وحشی باکتری با کمک کیت استخراج DNA (ساخت شرکت Roche آلمان) انجام شد و به منظور بررسی تعیین کیفیت و کمّیت DNA از دو روش اسپکتروفتومتری و روش الکتروفورز ژل استفاده شد. غلظت ژل آگارز برای بررسی نمونه *DNA* های استخراج شده، ۰/۷ درصد بود. آغازگرهای lysC-F و lysC-R و lysE-F و lysE-R از رساله دکتری کجلدسن انتخاب شدند[۱۲]. آغازگرهای LysA-F و LysA-R از مقاله چراغی و همکاران اقتباس شدند[۹].

ترکیبات و غلظت مواد مورد استفاده به ازای هر واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۲/۵میکرولیتر بافر (PCR Buffer ۱۰x) ، $Mgcl_2$ ۱ میلی‌مول، dNTP ۰/۲میلی‌مول، ۰/٤ ماکرومولار از هر آغازگر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم(Taq Polymerase(٥ unit/ µl و ۱ میکرولیتر *DNA* الگو با غلظت ۲۵۰ نانوگرم که با افزودن آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه حرارتی PCR با دمای واسرشته سازی اولیه ۹٤ درجه سانتیگراد برای یک چرخه ، به مدت ۲ دقیقه ،۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی با دمای ۹٤ درجه به مدت ۱ دقیقه،اتصال آغازگر با دامنه دمایی٦٥/٦-٥٤ به مدت ۱ دقیقه، بسط با دمای ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه برای ۱ چرخه تنظیم شد. دمای اتصال برای هر کدام از آغازگرها متفاوت بود و بهینه‌سازی دمای اتصال برای هر یک از آغازگرها انجام شد.

در این تحقیق برای الکتروفورز فرآورده‌های تکثیری از ژل آگارز استفاده گردید. غلظت ژل آگارز مورد استفاده ۱/۵ درصد و بافر مورد استفاده TAE بود. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ و در مدت زمان ۹۰ دقیقه انجام شد و از ژل آگارز با دستگاه ژل داک عکسبرداری گردید.

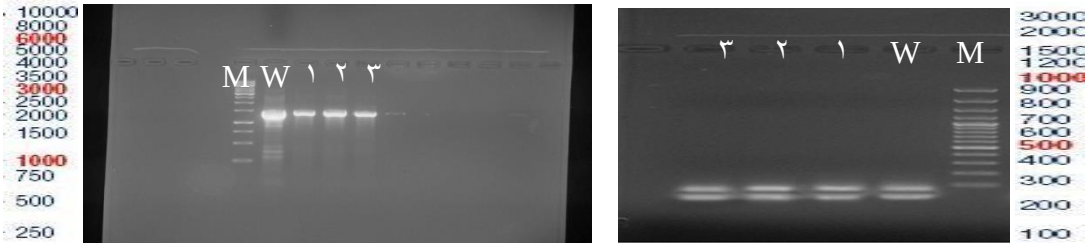
## نتایج و بحث:

مقایسه میانگین غلظت اسیدآمینه لیزین در دزهای مختلف پرتوتابی شده (جدول۲)، نشان داد که بیشترین مقدار لیزین تولید شده به وسیله این باکتری در محدوده دز ۲۰۰ گری با پرتو گاما بوده است که مقدار ۱٦/۳۸میلی‌گرم در میلی‌لیترتولید شده است.

جدول ۲- میانگین غلظت اسیدآمینه لیزین تولید شده قبل و بعد از پرتوتابی (میلی‌گرم در میلی لیتر)

| دز پرتوتابی (گری) | شاهد | ۲۰ | ۸۰ | ۱٤۰ | ۲۰۰ | ۲٦۰ | ۳۲۰ | ۳۸۰ | ٤٤۰ | ۵۰۰ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مقدار لیزین | ۱۳/۷۰ | ۱۱/۵۵ | ۱٤/۳٦ | ۱۵/۸٤ | ۱٦/۳۸ | ۱۱/۷۳ | ۱۲/۲٦ | ۱۱/٤۳ | ۱۲/۱۰ | ۱۱/۱۰ |

جهت ارزیابی مولکولی سویه‌های تولید کننده لیزین، از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مسئول تولید لیزین در باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* استفاده شد. آغازگرهای lysC-F و lysC-R مربوط به ژن lysC می‌باشند و آنزیم آسپارتات کیناز را کد می‌کند. با این جفت آغازگر در تمامی سویه‌های مورد بررسی باندهایی به طول ۱۰۰ و ۵۰ جفت باز تکثیرنمود.و آغازگرهای lysA-F و lysA-R مربوط به ژن lysA می‌باشند که آنزیم مزو دی آمینو پایملات دکربوکسیلاز را کد می‌کنند. این جفت آغازگر در تمامی سویه‌های مورد بررسی باندی به طول ۱٤۳۲جفت باز تکثیر نمود. آغازگرهای lysE-F و lysE-R مربوط به ژن lysE می‌باشند که آنزیم پرمئاز را کد می‌کنند. این جفت آغازگر در هیچ‌کدام از سویه‌های مورد بررسی باندی تکثیر نشد.




شکل۱- سمت راست: الگوی باندی فرآورده‌های PCR حاصل از آغازگرهای lysC-F و lysC-R برای ٤ سویه و لدر bp ۱۰۰ سمت چپ: الگوی باندی فرآورده های PCR حاصل از آغازگرهای lysA-F و lysA-R برای ٤ سویه و لدر kb ۱ (M: لدر، ۱ و ۲ و ۳ سویه‌های موتانت، W: سویه وحشی)

با توجه به نتایج و داده‌های مولکولی حاصله، نشانگر چند شکل مرتبط با افزایش تولید لیزین در سویه‌های موتانت در مقایسه با سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* مشاهده نشد این مسئله حاکی از آن است که جهش‌های حذف یا بیشبود در نواحی مرتبط با افزایش تولید لیزین در نواحی غیر از توالی‌های مکمل با آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق رخ داده است و یا جهش در سایر ژن‌های مسئول تولید لیزین یا نواحی پروموتری مرتبط با ژن‌های مسئول و یا نواحی بالادست و پایین‌دست ژن‌های مسئول اتفاق افتاده است.

**مراجع:**

۱-Tryfona T., Bustard M.T., Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*: transmembrane transport and metabolic flux analysis, Pro Biochem, ٤۰ ٤۹۹–۵۰۸, ۲۰۰۵.
۲-Hermann, T., Industrial production of amino acids by Coryneform bacteria. Journal of Biotechnology, ۱۰٤: ۱۵۵-۱۷۲،۲۰۰۳.
۳-Seibold, G., Auchter, M., Berens, S., Kalinowski, J., Eikmanns, B. J., Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: Growth and lysine production. Journal of Biotechnology ۱۲٤; ۳۸۱–۳۹۱, ۲۰۰٦.

٤-Abe S, Takayama K, Kinoshita S. Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. J Gen Appl Microbiol; ١٣: ٢٧٩- ٣٠١, ١٩٦٧.
٥-Shah, A. H., Studies on the Microbial Production of Lysine. Ph.D thesis. Quaid-i-Azam University, Islamabad. ١٩٩٨.
٦-Hilliger, M., Biotechnologische Aminosäureproduktion. Bio Tec vol.٢, ٤٠-٤٤, ١٩٩١.
٧-Ikeda, M., Amino acid production process, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol, ٧٩, ١–٣٥, ٢٠٠٣.
٨-Ohnishi J., Katahira R., Mitsuhashi S., Kakita S., Ikeda M., A novel gnd mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* FEMS Microbiology Letters.٢٦٥–٢٧٤., ٢٠٠٥.
٩-Cheraghi S.,Akbarzade A., FarhangiA., Chiani M., Saffari Z., Ghassemi S., Rastegari H.and Mehrabi M. R.,Improved Production of L-lysine by Over-expression of *Meso*-diaminopimelate Decarboxylase Enzyme of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli*,٥٠٤-٥٠٨, ٢٠١٠.
١٠-Georgi, T., Rittmann, D., Wendisch, V. F., Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: Roles of malic enzyme and fructose-١،٦-bisphosphatase,٢٩١-٣٠١, ٢٠٠٥
١١-Naghavi M.R.,Ghareyazi B.,Hosseini S.G., Molecular markers, University of Tehran press, ٣٣٤, ٢٠٠٩.
١٢-Kjeldsen K.R., Optimization of an industrial L-lysine producing *Corynebacterium glutamicum* strain, Ph.D. Thesis. Center for Microbial Biotechnology Department of Systems Biology Technical University of Denmark, ١٨٧, ٢٠٠٨.

## Determination of molecular mechanism for increasing lysine production in mutant bacteria (*Corynebacterium glutamicum*) by gamma irradiation using STS marker

**Abstract**

Lysine is an essential amino acid with many applications in various industries. Current method of lysine production is the usage of *Corynebacterium glutamicum*. Wild type of these bacteria could not produce high amount of lysine. For enhancing lysine production, induction of mutation is favorable. In this study, for inducing mutation in *Corynebacterium glutamicum* gamma irradiation was applied. The highest lysine production was producied in mutant type created at ٢٠٠ gray in comparison to wild type.

Three specific primer for genes related to lysine production was used to evaluate mutation occurrence. Of which, two primer components multiplicate bands in studied mutants.

Keywords: Gamma ray, *Corynebacterium glutamicum*, Specific primers, Gens related to lysine product