مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و هفتم (۱۳۸۰) شماره ۲ (۱۶۱-۱۵۱)

تولید یک سویه جهش یافته مقاوم نسبت به شوری Escherichia Coli-MK 148 و جداسازی ژنهای باکتریایی بیوسنتز پرولین از آن

اشرف‌الدین سخن‌سنج، ناهیدکرامت
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران
(دریافت: ۷۹/۲/۱۰ ؛ پذیرش: ۸۰/۸/۲۰)

چکیده

یکی از عوامل مهم در ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های اسمزی (خشکی و شوری) در محیط تولید و تراکم ترکیبات محافظ اسمزی نظیر اسیدهای آمینه پرولین، گلیسین و گلیسین بتائین، موادی نظیر پینیتول، مانیتول و همچنین پروتئینهای HSP توسط سلولهای موجودات زنده می‌باشد. از طرفی مسیر بیوسنتز این ترکیبات در گیاهان و باکتریها دارای طرح مشابهی است، بنابراین با انتقال ژن‌های دست‌ورزی شده مؤثر در تولید این گونه مواد به گیاهان می‌توان لاین‌های ترانس ژن مقاوم به تنش اسمزی ایجاد نمود. در این تحقیق از پرتودهی توسط اشعهٔ گاما که دارای خاصیت تک فامی و نفوذپذیری انتخابی می‌باشد، جهت ایجاد جهش در باکتری Escherichia coli- MK 148 استفاده گردید. کلنی‌های مقاوم به شوری به دست آمده و جداسازی گردیدند. سویه‌های حاصل تا ۶۰۰ میلی مولار نمک در محیط کشت را تحمل کرده و قادر به رشد و تولید مثل بودند. ایجاد مقاومت به شوری باید همراه با جهش در ژن مربوط به آنزیم گلوتامیل کیناز باشد که اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز پرولین است حساسیت آنزیم بعد از ایجاد جهش در ژن مربوط به آن نسبت به کنترل فیدبک توسط محصول انتهایی کاهش یافته است. ژنهای مربوط به آنزیم گلوتامیل کیناز (proB) و آنزیم گلوتامیک سمی آلدئید دهیدروژناز (proA) توسط روش PCR از سویه مقاوم به شوری جدا شده و در پلاسمید pUC 19 کلون شدند. این پلاسمید باعث رشد باکتریهای فاقد توانایی بیوسنتز پرولین در محیط فاقد پرولین و دارای شوری گردیدند.

واژه‌های کلیدی: *پرولین، گلوتامیل کیناز، گلوتامیک سمی آلدئید دهیدروژناز، تنش اسمزی، proA ,proB, MK148، ترکیب محافظ اسمزی، تنش‌شوری، مقاومت‌اسمزی، مقاومت به شوری.*

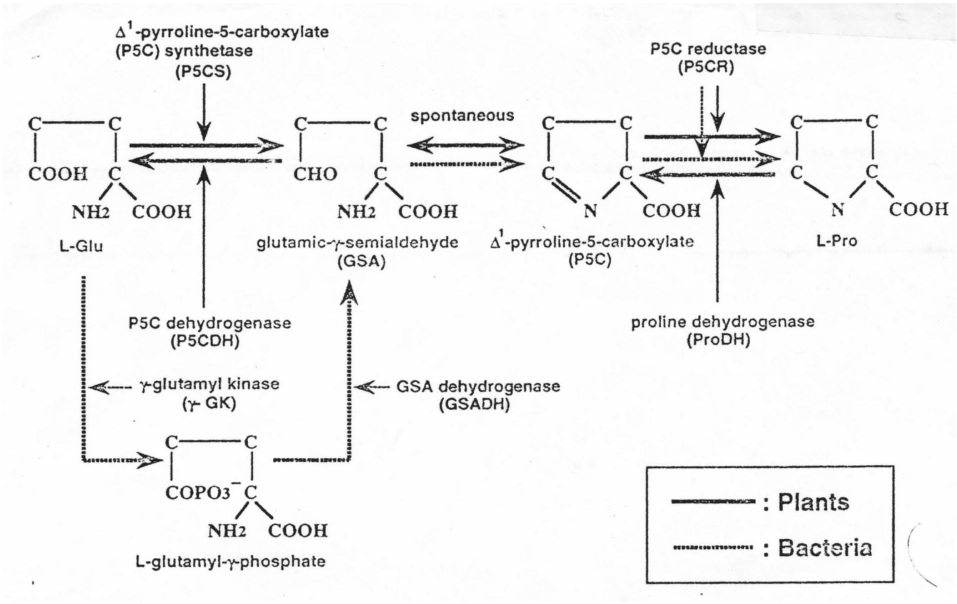
مقدمه

گیاهان از طرق مختلف با تنش‌اسمزی محیط شامل شوری و خشکی خاک مقابله می‌کنند. مثل تغییرات مرفولوژیکی نظیر مومی‌شدن، ضخیم‌شدن اپیدرم‌برگ و یا زمانبندی مراحل‌نمو مثل گل‌دهی در زمان زودتراز معمول، علاوه بر اینها و بخصوص در باکتریها، مکانیسمی که حائز اهمیت زیادی می‌باشد تولید و تراکم ترکیباتی است که به عنوان اسمولیت (Osmolyte) عمل می‌کنند نظیر پرولین، گلیسین، گلیسین بتائین، مانیتول، پینیتول (Hanson,McCue,1997)، پرولین، اسید آمینه‌ای است که در سلول‌های باکتری و بافتهای گیاهی که در معرض تنش شوری و خشکی ویا تحت تأثیر گازهایی مثل سولفوردی‌اکسید و یا در معرض پاتوژن‌ها و همچنین تحت تابش پرتوهایی مثل اشعهٔ ماوراء بنفش قرار می‌گیرند بیش از اندازه معمول ساخته شده و انباشته می‌گردد، هنگامی که سلول باکتری و یا بافتهای گیاهی در معرض حرارت یا خشکی و یا مقدار زیاد نمک در محیط قرار می‌گیرند تجمع اسید آمینه پرولین مانع از انعقاد پروتئین‌های آنزیمی می‌شود (Pollard, Wynjone, 1997).

همچنین Rudolph و همکاران (1997)، پس از یک سری آزمایشات نتیجه گرفتند که ترکیباتی نظیر پرولین و بتائین با فسفولیپیدهای موجود در غشای سلولی ارتباط پیدا کرده و از این طریق باعث ثبات آن می‌شوند.

قرار گرفتن گیاهک‌های شش روزه برنج (Oriza Sative) در معرض تنش شوری منجر به افزایش میزان پرولین همراه با کاهش فعالیت سیستم انتقال الکترون میتوکندریایی گردید. ممانعت کننده‌هایی نظیر رتنون و آتی‌مایسین A که مانع از فعالیت سیستم مذکور می‌شوند نیز منجر به تجمع این اسید آمینه می‌شوند (Saradhi , Saradhi ,1983).

تشابه مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان و باکتریها با توجه به سادگی استفاده از باکتریها در روشهای مهندسی ژنتیک محققین را بر آن داشت که از باکتریهایی نظیر Escherichia coli به عنوان منبع ژنهای کد کننده بیوسنتز پرولین استفاده نمایند، به طریقی که بتوان با انجام جهش‌هایی باعث افزایش بیوسنتز پرولین گردید . در باکتری E.coli پیش ماده بیوسنتز پرولین اسید گلوتامیک می‌باشد (شکل ۱) که ابتدا تحت تأثیر آنزیم گلوتامیل کیناز به گلوتامیک فسفات تبدیل می‌شود، آنزیم فوق‌الذکر توسط ژن proB کد می‌شود و در مرحله بعد گلوتامیک فسفات توسط آنزیم سمی آلدئید دهیدروژناز به گلوتامیک – سمی آلدئید تبدیل (GSA) می‌شود این آنزیم توسط ژن proA کد می‌شود. در مرحله بعد GSA به طور خود به خود به Δ - پرولین – ۵ – کربوکسیلات (P5C) تبدیل می‌شود که این واکنش خیلی سریع انجام می‌شود.



شکل ۱- مسیر بیوسنتزی پرولین در گیاهان و باکتریها

مرحله بعدی تبدیل P5C به پرولین می‌باشد که توسط آنزیم پیرولین – ۵ کربوکسیلات ردوکتاز (PSCR) صورت گرفته این انزیم توسط ژن proC کد می‌شود.

لازم به ذکر است که پرولین از پیش ماده دیگر یعنی اورنیتین نیز می‌تواند به وجود آید ولی آزمایش نشان داده است که در شرایط تنش اسمزی مسیر اسید گلوتامیک ارجحیت دارد (Delauney *et al.*, 1993).

در گیاهان مسیر بیوسنتز پرولین از اسید گلوتامیک مشابه باکتریها است ولی دو مرحله اول توسط یک آنزیم صورت می‌گیرد یعنی Δ -پیرولین – ۵ – کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) که این آنزیم دارای فعالیتهای گلوتامیل کیناز و گلوتامیک – سمی آلدئید دهیدروژناز می‌باشد. مانند سایر مسیرهای متابولیسمی اولین آنزیم مسیر بیوسنتزی به عنوان عامل محدود کننده به شمار می‌آید. اسید آمینه پرولین ممانعت کنندهٔ آلوستریک فعالیت آنزیم گلوتامیل کیناز می‌باشد. جهش‌هایی در ژن proB (کد کنندهٔ آنزیم گلوتامیل کیناز) صورت گرفته که نتیجه آنها ۲۰۰ برابر افزایش سنتز و تراکم پرولین نسبت به حالات معمولی است. در این حالت

حساسیت آنزیم نسبت به کنترل فیدبک توسط محصول نهایی به نحو قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد(Csonka *et al.,*998,Neumivakin *et al.,*1992,1995,Dendekar,Uratsu,1998).

آنزیم پیرولین – ۵ – کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) موجود در گیاهان عالی دارای فعالیت‌های گلوتامیل کینازی و گلوتامیک – سمی آلدئید دهیدروژنازی می‌باشد و ثابت شده که فعالیت این آنزیم همچون گلوتامیل کیناز باکتریایی تحت تأثیر کنترل پرولین قرار می‌گیرد و مرحلهٔ محدود کننده در مسیر بیوسنتز پرولین در گیاهان می‌باشد (Hu *et al.*, 1992). Delauney و همکارانش در ۱۹۹۳با دست‌ورزی ژنتیکی ژن کد کنندهٔ این آنزیم (proAB) موفق به تولید گیاهان ترانس ژن توتون مقاوم به تنش اسمزی گردیده‌اند.

از طرفی یکی از ژن‌های جهش یافته proB (proBosm) تحت کنترل پروموتور یوکاریوتی ویژه ارگان Pmas به گیاهان توتون انتقال داده شده و ۵ برابر افزایش بیوسنتز پرولین و بدنبال آن مقاومت اسمزی افزایش یافته مشاهده شده است (Sokhansanj *et al.*,1997).

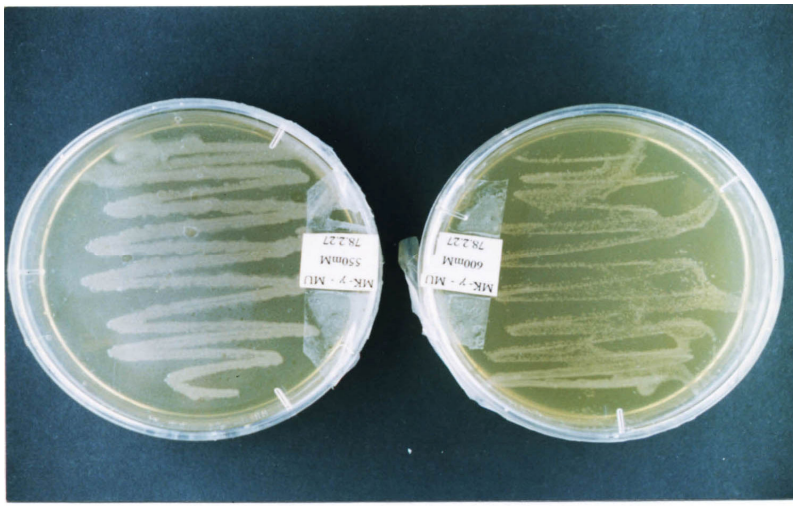
با توجه به این نکته که بین افزایش تولید (Overprodution) پرولین با تنش شوری رابطه مستقیم و مثبت وجود دارد و با هدف دستیابی به ژن جهش یافته proB جهت غربالگری باکتریهای جهش یافته از محیط دارای مقادیر متفاوت نمک (NaCl) استفاده گردید. همچنین در این تحقیق برای ایجاد موتاسیون از پرتوی گاما استفاده شد. اشعهٔ گاما دارای خاصیت تک فامی (Monochronicity) است و دارای قابلیت نفوذپذیری بیشتری نسبت به سایر امواج الکترومغناطیسی است.

مواد و روشها

باکتری دارای قابلیت جهش پذیری شرطی Escherichia coli (Conditional Mutation) سویه MK 148 از مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهیه گردید. این باکتری در پنج پتری‌دیش که حاوی محیط کشت نوترینت آگار بود کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرفته تا کاملاً رشد کردند. سپس این باکتری تحت تأثیر دوزهای متفاوت تابش گاما قرار گرفتند (۵۰۰، ۷۰۰، ۱۰۰۰، ۱۱۰۰، ۱۲۰۰ Grray) پس از این مرحله به منظور بررسی تأثیر تابش بر باکتریها، تعدادی از کلنی‌های هر یک از پتری‌دیش‌ها به محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف نمک انتقال داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند .

غلظت‌های متفاوت نمک (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میلی‌مولار) به منظور بررسی و انتخاب مقاومترین باکتری که غلظت بالاتری از نمک را تحمل می‌کند و همچنین از نظر

وضعیت رشد نسبت به سایر نمونه‌ها مناسب‌تر باشد مورد استفاده قرار گرفت. بعد از انتخاب بهترین سویه، کلنی‌های آن به پتری‌های حاوی غلظت‌های بالاتر نمک برده شدند. کلنی‌های حاصل مورد آزمون‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی قرار گرفتند تا عدم آلودگی آنها توسط سایر سویه‌های مقاوم محرز شود (شکل ۲).



شکل ۲- وضعیت رشد باکتریهای جهش یافته در محیط دارای ۶۰۰ میلی مولار نمک (تصویر چپ) و ۵۵۰ میلی مولار (تصویر راست)

استخراج کروموزوم از سویه اخیر با روش استفاده از بافر قلیایی صورت گرفته و عصارهٔ اولیه توسط فنل و کلروفرم شستشو شد.

پرایمرهای ساخته شده برای PCR به طریقی طراحی شدند که در دو سوی ژن‌ها پس از تکثیر، جایگاههای برش توسط آنزیمها مطابق با جایگاههای موجود در پلی‌لنیکرپلاسمید میزبان (pUC19) باشد. به این ترتیب در دو طرف ژن proBmu (proB جهش‌یافته) توالی‌های قابل شناسایی توسط آنزیم BamHI و در طرفین ژن proA توالی‌های قابل شناسایی توسط آنزیم‌های Bgl11 و Cla1 وجود خواهند داشت.

مواد لازم برای PCR :

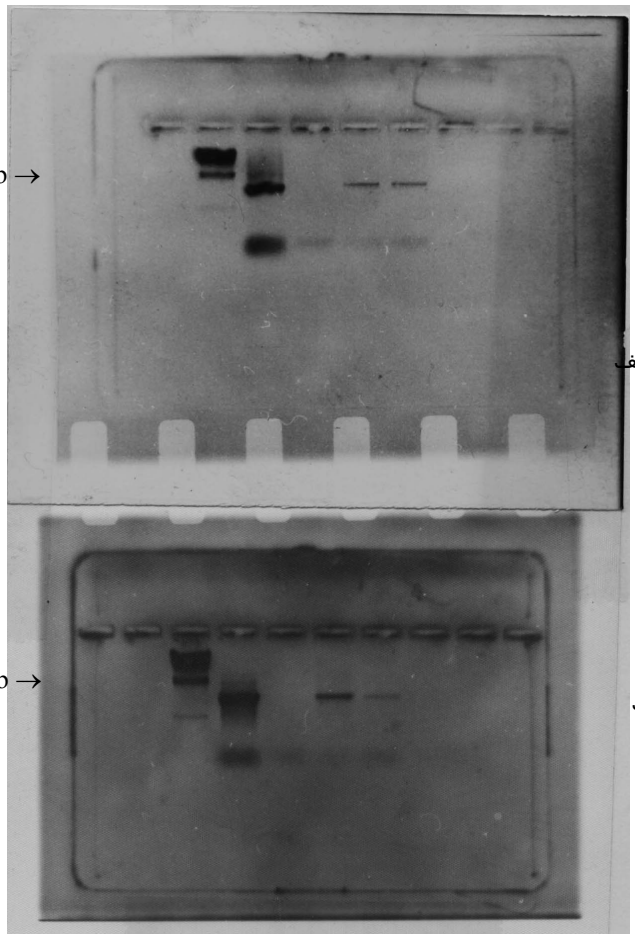
بافر × ۱۰ پلی‌مراز، محلول ۲۰۰ میکرومولار dNTP، ۵/۱۰ – ۵/۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۱ – ۱ میکرومول از هر یک از پرایمرها.

پرایمرهای مربوط به proB شامل: GGGGATCCATGAGTGACAGCCAGACG و CTACTGTACTAATGGGC و AATTCCTACCGG

و پرایمرهای مربوط به proA شامل: GGGAGATCTGATGCTGGAACAAATGGG و ATTCGTGTTTTCAGGTCCTAGGGG می‌باشد.

بعد از انجام الکتروفورز محصولات PCR با روش استفاده از پودر سیلیکا و شتشو با بافر مخصوص از ژل برداشته شده و پس از برش هر یک از محصولات با آنزیم مخصوص در مخلوط Ligation به همراهی پلاسمید و pUC19 بریده شده توسط آنزیم لازم قرار داده شدند.

ترانسفورماسیون محصولات Ligation با استفاده از روش کلروکلسیم انجام گردید و کلنی‌های نو ترکیب از نظر داشتن هر یک از ژن‌ها مورد آزمون قرار گرفتند (شکل ۳ الف- ب).



شکل۳ – نتایج آزمون PCR برای اثبات وجود ژن‌های proB (الف) و proA(ب)در پلاسمید pUC19

لاین ۱ : مارکر DNA λ بریده شده توسط Hind III

لاین ۲ : کنترل مثبت

لاین ۳ : نمونه بدون DNA

لاین ۴ : نتیجه PCR

لاین ۵ : تکرار آزمون PCR

از باکتری E. Coli سویه HB 101 که فاقد توانایی بیوسنتز پرولین می باشد جهت بررسی عمل پلاسمید حاوی ژن‌های بیوسنتزی پرولین استفاده گردید.

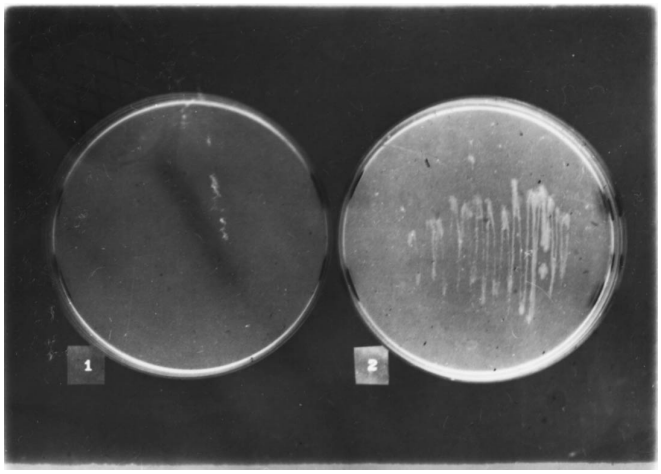
نتیجه‌گیری و بحث :

انتخاب مقاومترین کلنی‌ها بعد از انجام جهش توسط اشعهٔ گاما اولین مرحله مهم در انجام این پژوهش بود. هر یک از پتری‌دیش‌ها که تحت تأثیر دوزهای متفاوت اشعهٔ گاما قرار داشتند با علامت (γ)نشان داده شده‌اند. به این ترتیب $\gamma 0$ مربوط به پتری‌دیش‌هایی که در معرض اشعه قرار نگرفتند. $\gamma 1$ برای پتری‌دیش‌های مربوط به دوز ۵۰۰ G ، $\gamma 2$ برای ۷۰۰G، $\gamma 3$ مربوط به ۱۰۰۰G، $\gamma 4$ برای ۱۲۰۰Gو $\gamma 5$ مربوط به ۱۵۰۰G می‌باشد.

بعد از پرتودهی کلنی‌های هریک از پتری‌های مزبور به محیط‌های دارای غلظت‌های گوناگون نمک از ۵۰ الی ۲۵۰ میلی‌مولار به ترتیب S_1 الی S_5 انتقال داده شدند. هر یک از وضعیتهای ترکیبی (جدول ۱) $S_n\gamma_n$ از نظر تعداد کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و به هر یک از وضعیتها شاخص‌های کلی شامل ۴ (وضعیت رشد خیلی خوب)،۳ (وضعیت رشد خوب)، ۲ (وضعیت رشد متوسط)، و ۱ (وضعیت رشد ضعیف) نسبت داده شد.

با ملاحظه جدول، اپتیمم دوز تابش در وضعیت (۷۰۰G) مشخص می‌گردد و ملاحظه می‌شود که پتری‌های تحت این دوز تابش، از خود مقاومت تقریباً یکسانی به مقادیر متفاوت NaCl نشان می‌دهند. کلنی‌های موجود در این پتری‌ها به محیط‌های دارای غلظت‌های بیشتر نمک انتقال داده شدند و در نهایت سویه‌ای بدست آمد که تا مقدار ۶۰۰ میلی‌مولار NaCl موجود در محیط کشت را به خوبی تحمل می‌نمود.

چنانکه در قسمت مقدمه اشاره شد پرولین یکی از ترکیبات محافظ اسمزی است که در شرایط استرس شوری به میزان زیادی و از پیش ماده اسید گلوتامیک به وجود می‌آید. (Delauney *et. al.*,1993) . به این ترتیب جهت اطمینان از اینکه ژن مربوط به آنزیم گلوتامیل کیناز (اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز پرولین) جهش یافته یا به عبارتی مسئله مقاومت به شوری با افزایش بیان پرولین ارتباط و همبستگی دارد، پلاسمید حامل ژن‌های جهش یافته proA,proB به استرین باکتری HB 101 (pro) انتقال داده شده و رشد آنها درمحیط فاقد پرولین که در ضمن دارای مقدار 400mm نمک بوده در مقایسه با سویه‌های ترانسفورم نشده مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴).



شکل ۴- سمت چپ سویه HB101 ترانسفورم شده باکتری در محیط فاقد پرولین. سمت راست: سویه ترانسفورم شده که ضمن مقاومت به شوری قادر به رشد در محیط فاقد پرولین می باشد

در مسیر بیوسنتز پرولین بخش مشابه در باکتریها و گیاهان مرحله‌ای است که توسط آنـزیم پیرولین – ۵ – کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) صورت گرفته که توسط ژن proC کد مـی‌شـود تنها وجه تمایز وجود ژن‌های proB,proA به صورت جداگانه در اوپرون بیوسنتز باکتریایی است در حالی که در گیاهان عالی ژن proA نقش دارد با توجه به اینکه هدف نهایی از این طرح بیان ژن‌های proBmu, proA در گیاهان است و نظر به اینکه بیان ژن‌هـا در یوکاریوتهـا بـه صـورت مونوسیسترونیک می باشد ابتدا لازم است در ژن proBmu, proA توسط PCR از یکدیگر جـدا شوند تا پس از گذر از پلاسمیدهای حد واسط نهایتاً در یک حامل انتقالی (Shuttle Vector) به نحوی قرار گیرند که هر یک بعد از پروموتور جداگانه و قبـل از جایگـاه پلـی‌آدنیلاسـیون قـرار گیرد. در اولین مرحله انجام PCR همراه با پرایمرهای اختصاصی به نحوی که محصـولات قابـل کلون کردن باشد منجر به ایجاد پلاسمیدهای pUC19 حامل ژن‌های proB, proA بـه صـورت جداگانه گردید (شکل ۳ الف- ب) همچنین لازم به ذکر است سویهٔ بدست آمده حاصـل دارای اهمیت زیادی از نظر منبع ژنتیکی تغییرات منجر به افزایش مقاومت می‌باشد. چنانچه ذکر شد ترکیبات محافظ اسمزی نظیر گلیسین ، مانیتول و پینیتول و همچنین پروتئینهایی نظیر Hsp-1 و Hsp2 علاوه بر پرولین حائز اهمیت فوق‌العاده‌ای هستند و نظر بـه اینکـه مسـئله مقاومـت اسمزی که در برگیرنده مقاومت به شوری و خشکی می باشد از مـواردی اسـت کـه کنتـرل آن توسط چندین ژن صورت می‌گیرد از سویه بدست آمده حاصل می‌توان جهت بررسی تغییراتـی

که در سطح رونویسی یا در سایر مراحل بیان ژن صورت می‌گیردو همچنین درمورد سایر ترکیبات محافظ اسمزی بهره گرفت.

جدول ۱- وضعیت رشد کلنی‌های مختلف جهش یافته با دوزهای مختلف اشعهٔ γ بر اساس شاخص‌های ۱تا ۴ در محیط‌های دارای غلظت‌های مختلف نمک (S)

$\gamma_0 S_1=2$	$S_2 \gamma_0= 2$	$S_3 \gamma_0=2$	$S_4 \gamma_0=2$	$S_5 \gamma_0$
$\gamma_1 S_1=2$	$S_2 \gamma_1= 2$	$S_3 \gamma_1=2$	$S_4 \gamma_1=3$	$S_5 \gamma_1=3$
$\gamma_2 S_1=4$	$S_2 \gamma_2= 4$	$S_3 \gamma_2=4$	$S_4 \gamma_2=4$	$S_5 \gamma_2=4$
$\gamma_3 S_1=3$	$S_2 \gamma_3=3$	$S_3 \gamma_3=2$	$S_4 \gamma_3=3$	$S_5 \gamma_3=1$
$\gamma_4 S_1=2$	$S_2 \gamma_4=2$	$S_3 \gamma_4=1$	$S_4 \gamma_4=1$	$S_5 \gamma_4=1$
$\gamma_5 S_1=2$	$S_2 \gamma_5=2$	$S_3 \gamma_5=1$	$S_4 \gamma_5=1$	$S_5 \gamma_5=1$

Reference

Boyer, J.S., (1982) *Plant productivity and environment*; Science, (Esc) **218**, 443-448.

Csonka, L.N., (1939) *physiological and genetic responses of bacteria oto osmoticsteres,* Microdiol. Rev, **53**, 121-147.

Csonka L.N., Gelvin S.B., Goodner B.W., Orser C.S., (1988) *Nucleotide sequence of a mutation in the proB gene Escherichia coli That confers proline overproduction and enhanced to lerance of osmotic stress*; Gene, **64**, 199-105

Delauney, A.J., Hu. C.A., Kavi Kishor, P.B and Verma, D.P.S., (1993) *Ornithine amino transport and proline biosynthesis in Vigna aconitifiolia*, J. Biol. Chem.,**268**,18673-18678.

Dendekar A.M., Uratsu S.L., (1988) *A single base pair change in proline biosynthesis genes causes osmotic stress tolerance*; J. Bacterial, **170**, 5943-5945.

Hu C.A.A., Delauney A.J., and Verma, D.P.S., (1992) *A bifunctional enzyme (Δ-pryyoline- 5 – carboxylate synthetase) catalyses the first two steps in proline biosynthesis in plants; proc.Nati*. Acad . Sci. (USA), **89**, 9354-9358.

Le Rudlier D., Stom A.R., Dandekar A.M., Smith L.T., Valentine R.C., (1984) *Molecular biology of osmoregulation*; Science, **224**,1064-1068.

Mc Cue K.F., Hanson A.D., (1990) *Drought and salt – tolerance. Understanding and application*, Trends Biotech., **8**, 358-362.

Neumivakin L.V., Solovgee V.P., Sokansanj A., (1995) *Increase in asmotolerance of Rhizobium fredii Soybean isolate BD32 by the proBosm- proA operon of Escherichia coli;* Biochem & Biophys. Res Commun, **217(3)**, 796-801.

Pollard A, Wynjones RG, (1979) *Enzyme activities in concentrated solutios of glycinedbeta ine and othersolutes*, planta **144**, 291-298.
Rudolph A.S., Crow J.H and crow L.M., (1986), *Effects of three Stabilizing Agunts: Proline, Betaine and trehalsose on Membrance phosoholids*, Archives of Biochem & Biophys., **245(L,p)**, 134-143.
Saradhi P.P., Arera, A. Prasadkys, (1995) *Suppression of mitochondrial electron transport is the prime cause behind stress induced proline accumulation*, Biochem, Biophys. Res commun **290**, 1-5.
Sokhansanj A. Neumivakin, L.V., Moseiko N.A., and piruzian E.S., (1997) *Transrer of bacterial genes participating in proline biosynthesis in to plants and their expression under the control of various promoters*, Russian Journal Genetics, **33**, 763-769.