

کلونینگ و تعیین توالی بخشی از ژن تانناز در آسپرژیلوس نیجر

E-mail: Hassan5628@yahoo.com

دکتر عبدالحسن کاظمی: استادیار قارچ شناسی پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۲/۵/۱۳ بازنگری نهایی: ۸۳/۵/۲۷ پذیرش: ۸۳/۶/۲۵

چکیده

زمینه و اهداف: قارچ کپکی آسپرژیلوس نیجر به عنوان بیوراکتور عمده و میکروارگانیسم پاتوژن، آلرژن و آلوده کننده مواد غذایی مورد توجه بوده و با عنایت به افزایش موارد استفاده از این میکروارگانیسم به عنوان بیوراکتور، اهمیت آن رو به تزاید است. بنابراین، کلونینگ و تعیین توالی ژن تانین آسید هیدرولاز یا تانناز جهت بررسی و آنالیز ویژگی های ژن ستر کننده تانناز در این میکروارگانیسم و مقایسه خصوصیات ژن و فرآورده آن با همان ژن سایر میکروارگانیسم ها و در نهایت، تلاش برای بیان ژن و تولید محصول انجام شد، زیرا تانناز در تهیه و عمل آوری مواد غذایی، نوشابه ها و شربت ها در صنایع غذایی کاربرد دارد و در صنایع داروسازی نیز به عنوان ماده تجاری عمده برای ساخت تری متوپریم به کار می رود.

روش بررسی: DNA ژنومی یک نمونه از آسپرژیلوس نیجر به شماره ثبت N404 که مشتق از آسپرژیلوس نیجر ۹۰۲۹ ATCC است، برای استخراج DNA و انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت و با استفاده از PCR دژنراتیو، یک قطعه اولیه از ژن تانناز به طول ۹۹۰ bp به دست آمد. قطعه ژن حاصله، متعاقب استخراج از ژل، خلص سازی و به وکتور مناسب پیوند زده شد و پس از ترانسفورماسیون، از سلول میزبان استخراج و تخلیص شد و توالی نوکلئوتیدی آن تعیین گردید.

یافته ها: آنالیز توالی محصول PCR دژنراتیو با بلاست BLASTX X در سطح اسیدنوکلئیک همسانی بسیار زیاد این توالی را با توالی ژن تانناز در آسپرژیلوس اریزه آ، آ. آوموری و آ. اکلوتوس نشان دادند (۵۲-۶۴٪). کلونینگ و تعیین توالی ژن کامل تانناز در آ. نیجر و سپس بیان ژن و تهیه آنزیم در اشل صنعتی برای استفاده در صنایع داروسازی برای مراحل آتی این پژوهش مد نظر است.

نتیجه گیری: وجود ژن تانناز در ژنوم آسپرژیلوس نیجر و همسانی بسیار بالای قطعه تعیین توالی شده با ژن تانناز سایر میکروارگانیسم های دارای قرابت فیلوژنیک با این قارچ نشان دهنده انتقال محافظه کارانه آن در مسیر تکاملی از ژنوم دودمانی است. توالی نوکلئوتیدی حاصله می تواند برای کلون کردن ژن کامل تانناز، تعیین توالی ژن کامل و نهایتاً برای بیان ژن و تولید محصول مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: آسپرژیلوس نیجر، ژن تانناز، کلونینگ، تعیین توالی

مقدمه

قارچ کپکی آسپرژیلوس نیجر به عنوان بیوراکتور عمده و میکروارگانیسم پاتوژن، آلرژن و آلوده کننده مواد غذایی مورد توجه بوده و با عنایت به افزایش موارد استفاده از این میکروارگانیسم به عنوان بیوراکتور اهمیت آن رو به تزاید است (۱ و ۲). تانین آسید هیدرولاز (EC 3.1.1.20) یا تانناز قابل تهیه از این بیوراکتور، در تهیه و عمل آوری مواد غذایی، نوشابه ها و شربت ها در صنایع غذایی کاربرد داشته است و معمولاً از این آنزیم به عنوان تانناز یاد می شود (۳ و ۴). این ماده به عنوان افزودنی به جیره غذایی حیوانات اضافه می شود و در صنایع داروسازی به عنوان ماده تجاری عمده برای ساخت تری متوپریم که داروی ضد باکتری است، به کار می رود. برای ساخت تری متوپریم از اسید گالیک استفاده می شود. تانناز با هیدرولیز اسید تانیک آن را به اسید گالیک مورد نیاز تبدیل می کند (۵). این آنزیم همچنین به عنوان آنزیم کلیدی در بسیاری از میکروارگانیسم های

موجود در خاک و طبیعت موجبات تجزیه تانین های قابل تجزیه را در شرایط هوازی و بیهوازی فراهم می آورد و نقش بسیار مهمی در تجزیه مواد و تعادل اکولوژیک محیط ایفا می کند (۶ و ۷). گروهی از میکروارگانیسم های میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش حیوانات مثل رومن باکتری ها نیز دارای قدرت تجزیه مجموعه تانین- پروتئین هستند و با تولید و ترشح آنزیم تانناز به هضم مواد در دستگاه گوارش علفخواران کمک می نمایند (۸-۱۰). تانین ها مواد پلی فنولیک محلول در آب هستند که به دو صورت قابل هیدرولیز و فشرده در بیشتر مواد گیاهی وجود دارند (۱۱). با توجه به عملکرد قارچ کپکی با رشد سریع آسپرژیلوس نیجر به عنوان بیوراکتور، جداسازی، کلونینگ و تعیین توالی ژن تانناز در این میکروارگانیسم پروژه اصلی تولید صنعتی این آنزیم از طریق کشت کپک فوق الذکر در اشل صنعتی و جداسازی فرآورده آنزیمی را فراهم خواهد آورد.

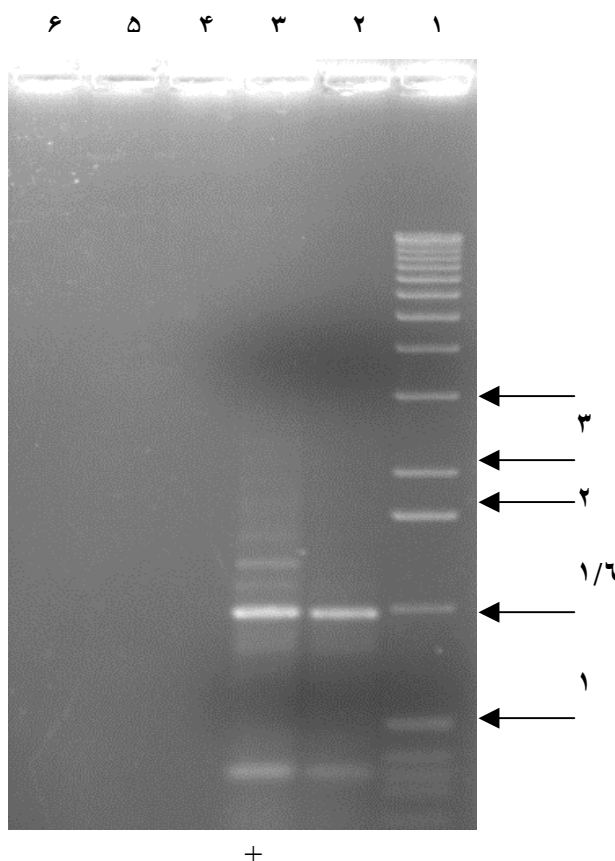
مواد و روش ها

نمونه آسپرژیلوس نیجر مورد استفاده در این پژوهش به شماره ثبت N404 مشتق از آسپرژیلوس نیجر ATCC 9029 بوده و در ATCC^۱ ثبت و ذخیره شده است. DNA ژنومی آسپرژیلوس نیجر با استفاده از روش پایه ریدر و برود (۱۲) با اندکی تغییر استخراج گردید. برای این منظور عناصر قارچی در نیتروژن مایع آسیاب و به مدت ۲۰ دقیقه در حرارت 65°C با حجم مساوی از بافر استخراج DNA مخلوط شد و سپس با افزودن مقادیر مساوی از کلروفرم و ایزومیل الکل (نسبت ۱:۲۴) به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شد. مخلوط فوق به مدت ۳۰ دقیقه در $12000 \times g$ و در حرارت 4°C سانتریفوژ شد، لایه بالایی به لوله استریل جدید منتقل و با استفاده از حجم مساوی ایزوپروپانول و سانتریفوژ به مدت ده دقیقه در $4000 \times g$ ، DNA ژنومی رسوب داده شد و نهایتاً با شستشو به وسیله اتانول ۷۰ درصد و حل نمودن رسوب DNA در و افزودن RNAase A ماده

ژنتیکی حاصل برای مصارف آتی در 20°C نگهداری گردید. به عنوان نمونه شاهد مثبت، DNA ژنومی کانادیدا آلیکانس نیز به روش فوق تهیه و ذخیره شد.

PCR دژنراتیو: با استفاده از ردیف های نوکلئوتیدی محافظت

شده برای ژن تانناز در آسپرژیلوس اریزه آ. آ. آواموری و آ. اکتوتوس، پرایمرهای لازم برای تکثیر قطعه تخمینی به طول ۱ kb طراحی شد. پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از: AGC ACT ATT IAA و TTC TGC CTC IGA TCG CAA TCTG. TAC TCA AGC تکثیر قطعه مورد نظر با روش PCR دژنراتیو از DNA ژنومی در میکروارگانسیم هدف و شاهد در ترموسایکلر با شرایط ۳ دقیقه در 94°C برای یک دور، یک دقیقه در 94°C ، یک دقیقه در 47°C و 90°C ثانیه در 72°C برای ۲۹ دور و نهایتاً یک دقیقه در 94°C ، یک دقیقه در 47°C و هفت دقیقه در 72°C برای یک دور انجام گردید و فرآورده PCR در ژل آگارز الکتروفورز تهیه شده با بافر TBE و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و آنالیز شد (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR دژنراتیو، ستون یک نوار شاخص و ستون های ۲ و ۳ نوارهای مربوط به محصولات PCR دژنراتیو از DNA ژنومی قارچ آسپرژیلوس نیجر را در دو غلظت متفاوت Mg^{++} نشان می دهد. ستون چهار مربوط به نمونه کنترل فاقد DNA ژنومی و ستونهای ۵ و ۶ مربوط به نمونه کنترل های دارای یک پرایمر است. علامت + جهت رانش را نشان می دهد.

1 GACACTATTG AATACTCAAG CTATGCATCC AACGCGTTGG GAGCTCTCCC
 51 ATAAGGTCGA CCTGCAGGCG GCCGCGAATT CACTAGTGAT TGATGGGGGA
 101 GAGGATAATC AGAAGCGCAT CTGGACGGTG TCATCCCCGC CATTGTGGGA
 151 GTAGGCCAAG GTTACGTTGC AATAGTCGAT CGTGGTGGCT GGGTATACCG
 201 CAGAGCCGCT AGTAGAGACG TTGTAGACAG GGTAGCGGA GAGGTTGGTG
 251 TGGCTAATAG TGATCCCAGG ATAAACATTA TCGACGGGCA ACTTAGATCG
 301 AACGTATGCA GGGGTGCAGA CATCATCGAG AGTGGTGGAA GTGGTGACGG
 351 CGTGAACCAG TGTCGCCCCA AGGATGATGA CTAGTGGCAG ACACCCCATC
 401 TCAGATGAAA GAACAAGGAT GTGTGGAATA TAATGATGAG AAGTGACCGA
 451 AGTAATGATG CAAGCTATGC TAATACCAAG CAGGGCATGG ACTGACTTTA
 501 CCAGATTAAG CCAGGCTGTA CTAGTAGCAT CACCGCGATT CGTATAGCCA
 551 CCTGACTTCA ACGCTCTTTA TCAGAGGCGG AAAACTGGTA CTTTATATAG
 601 TACATCTTTT GGCATTTGCA TCGGCATCTC GGGCCCAAGT TTACCTGTTT
 651 CATGTCTCCC CAATTATCGA AAATAATTGT TGAGACGCGT TGCTACATCT
 701 GAAAGTGCTT GTTACGTAGG CATATAGTTT TAAATGTGG CCTGACGATC
 751 CAGGTGCAAC GGGGCTTTT CATGTGGAGA AAGCTTTCCC GCATTTCCCT
 801 ACTTAGGGGG TTCTTTGCGA GAAGCCGGGT CGGCCTCGGC GTTTAACCTG
 851 GATGTAGGCC CGACAAAACG AACACCGTCC CGCCTGCTGC ATGCCCCCTG
 901 TGCGATAGGA TAAAGCTGCC TGTTTTAAAC ACCTCGAAAT GACACCACGG
 951 TGCCGTAAAC TTGCTCAACA GATTGCGATC CAGAGCAGAA

شکل ۲: توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن تانناز آسپریلوس نیجر

پرایمرهای MBR و MBF (Amersham Pharmacia. UK) در ترموسایکلر و با شرایط 96°C به مدت چهار دقیقه برای یک دور، 94°C به مدت 30 ثانیه، 50°C به مدت 15 ثانیه، 70°C به مدت چهار دقیقه برای 25 دور انجام گردید و تعیین توالی نوکلئوتیدها در محصول نهایی PCR با استفاده از روش ABI اتوماتیک انجام گردید و توالی قطعه ای از ژن تانناز آسپریلوس نیجر به طول 990 bp به دست آمد (شکل ۲).

ساترن بلائینگ: به منظور تأیید وجود ژن تانناز در ژنوم میکروارگانیسم، بررسی تعداد کپی ژن در ژنوم و همچنین تخمین اندازه مناسب قطعه ژنومی برای کلونینگ و تعیین توالی ژن کامل در مراحل بعدی، DNA ژنومی با سریالی از اندونوکلازهای محدودالتر شامل *Apa I* و *Brf I* و *Bji I* و *Kpn I* و *Sal I* و *Xba I* هضم و ساترن بلائینگ با استفاده از پروب DNA نشاندار شده با دیگوکسیجین (DIG) انجام و قطعات DNA حاوی تمام یا قسمتی از ژن تانناز به ترتیب به طول های تخمینی 3 kb و $3/2\text{ kb}$ و 6 kb و $4/1\text{ kb}$ و 3 kb و $5/7\text{ kb}$ و $1/5\text{ kb}$ در شرایط بحرانی شناسایی گردید. DNA نشاندار شده مورد استفاده به عنوان پروب، توالی نوکلئوتیدی به طول 990 bp حاصل از PCR اولیه بود.

بحث و نتیجه گیری

از تعیین توالی قطعه ژن حاصل از PCR اولیه، توالی به طول 990 bp حاصل شد که مربوط به ژن تانناز در آسپریلوس نیجر است. توالی نوکلئوتید ژن تانناز آسپریلوس نیجر (990 bp) همسانی بسیار بالایی با توالی نوکلئوتیدهای ژن مشابه را در سایر میکروارگانیسم ها نشان می دهد. جستجوی ذخایر اطلاعاتی ژنوم در وب با استفاده از BLAST X همسانی ژن تانناز آسپریلوس نیجر با آسپریلوس

کمیت سنجی DNA: کمیت سنجی DNA ژنومی استخراج شده از میکروارگانیسم مورد نظر و شاهد مثبت با استفاده از دو روش مقایسه غلظت DNA رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در ژل الکتروفورز با غلظت DNA استاندارد (DNA شاخص 1 kb , GIBCO BRL) و غلظت سنجی DNA در محلول تهیه شده با استفاده از $OD_{260}=1$ در اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

کلونینگ و تعیین توالی: مقدار کافی (50 ul) از محصول PCR در ژل الکتروفورز تهیه شده با بافر TAE آنالیز شده و پس از برش نوار مورد نظر از روی ژل، قطعه حاصل از ژل استخراج و تلخیص شده (QIAquick gel extraction kit) نوار 990 bp استخراج شده، به وکتور pGEMT[®]-Easy vector پیوند زده شد و سپس به سلول میزبان (*E. coli Top 10 F'*) منتقل گردید. غربالگری کلنی های آبی - سفید در محیط کشت LB حاوی 5 - برومو - 4 - کلرو - 3 - ایندول - بتا - دی - گالاکتوپیرانوزید (X-gal) و ایزوپروپیل - بتا - دی - تیوگالاکتوپیرانوزید (IPTG) انجام شد و پس از انتخاب تعدادی (6 کلنی) حاوی وکتور ترانسفورم شده، کلنی های حاصله در محیط LB (Luria-Burtani) مایع کشت داده شد و متعاقب آن وکتور حاوی قطعه PCR از مجموعه باکتری های تک تک محیط های LB مایع با انجام لیز سلولی و مراحل بعدی آن جدا گردید. برش قطعه PCR از ناحیه MCS¹ وکتور با استفاده از اندونوکلاز محدودالتر *Eco RI* انجام گردید و پس از تأثیر دو ساعته آنزیم فوق در 37°C بر روی وکتور، محصول حاصل در ژل آگاروز حاوی بافر TAE آنالیز شد و نوار مورد نظر با برش از ژل و انجام مراحل مربوط به تلخیص قطعه DNA از ژل به صورت خالص به دست آمد. برای انجام مراحل مربوط به تعیین توالی نوار هدف، PCR مجدد با استفاده از پلاسمید M13 و

تکاملی در بین گونه های مختلف جنس *آسپرژیلوس* است همچنان که حداقل همسانی ۵۲ درصد بین ژن تانناز قارچ کپکی *آ. اکلوئوتوس* نیز از استاندارد تشابه ۲۵ درصد بسیار زیاده تر بوده و می تواند دلالت بر این امر داشته باشد که در مسیر تکاملی سلسله قارچ ها، انتقال میراث ژنی در مورد ژن های دارای نقش اساسی در ساختار حیاتی و ژنتیکی این میکروارگانیسم ها به نحو بسیار محافظه کارانه ای انجام گرفته است.

مطالعات مربوط به تعیین توالی ژن هایی که محصولات نهایی آنها دارای اهمیت اقتصادی و صنعتی باشند، عمدتاً با هدف تعیین میزان و سطح بیان ژن در میکروارگانیسم، تعیین خصوصیات بیوشیمیایی و عملکرد محصول ژن، و استنباط اطلاعات پایه برای ارایه شیوه تولید محصول ژن و ... صورت می گیرد و کلونینگ و تعیین توالی ژن کامل تانناز در *آ. نیجر* و سپس بیان ژن و تهیه آنزیم در اشل صنعتی برای استفاده در صنایع داروسازی برای مراحل آتی این پژوهش مد نظر است.

تقدیر و تشکر

از مساعدت دکتر جفری رابسون، دکتر دیوید دنینک و سایر کارکنان گروه PME دانشکده علوم حیاتی دانشگاه منچستر در انجام این پژوهش و از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت پشتیبانی مالی انجام این تحقیق سپاسگزاری می شود.

References

1. Aguilar CN, Favela-Torres E, Viniegra-Gonzalez G, Augur C. Culture conditions dictate protease and tannase production in submerged and solid-state cultures of *Aspergillus niger* Aa-20. Appl Biochem Biotechnol. 2002 Jul-Dec;102-103(1-6): 407-14.
2. Sharma S, Bhat TK, Gupta MN. Bioaffinity immobilization of tannase from *Aspergillus niger* on concanavalin A-Sepharose CL-4B. Biotechnol Appl Biochem. 2002 Jun 1; 35(3): 165-169.
3. Mondal KC, Banerjee D, Banerjee R, Pati B. Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR9. J Gen Appl Microbiol. 2001 Oct; 47(5): 263-267.
4. Seth M and Chand S. Biosynthesis of tannase and hydrolysis of tannins to gallic acid by *Aspergillus awamori* - optimisation of process parameters. Process Biochem. 2000 Sep 1; 36(1-2): 39-44.
5. Lekha PK and Lonsane BK. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. Adv Appl Microbiol. 1997; 44: 215-60.
6. Bhat TK, Singh B, Sharma OP. Microbial degradation of tannins--a current perspective. Biodegradation 1998; 9(5): 343-57.
7. Lane RW, Yamakoshi J, Kikuchi M, Mizusawa K, Henderson L, Smith A. Safety evaluation of tannase enzyme preparation derived from *Aspergillus oryzae*. Food Chem Toxicol. 1997 Feb; 35(2): 207-12.
8. Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi M, Mizusawa K, Sekine H. Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. Gene 1997 Feb 20; 186(1): 153.
9. Banerjee D, Mondal KC, Pati BR. Production and characterization of extracellular and intracellular tannase from newly isolated *Aspergillus aculeatus* DBF 9. J Basic Microbiol. 2001; 41(6): 313-8.
10. Boadi DK, Neufeld RJ. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. Enzyme Microb Technol. 2001 May 7; 28(7-8): 590-595.
11. Mondal KC, Samanta S, Giri S, Pati BR. Distribution of tannic acid degrading microorganisms in the soil and comparative study of tannase from two fungal strains. Acta Microbiol Pol. 2001; 50(1): 75-82.
12. Reader U and Brode, P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett App Microbiol 1: 17-20.

اوریزه *آ* به میزان حداکثر ۶۴ درصد و *آ. اکلوئوتوس* به میزان حداقل ۵۲ درصد را در سطح اسید نوکلئیک نشان می دهد. همچنین با توجه به نتایج سترن بلاتینگ، فقط وجود یک نسخه از ژن تانناز در ژنوم میکروارگانیسم تأیید شد زیرا در قطعات DNA دارای طول های تخمینی ۳/۲ kb و ۶ kb و ۴/۱ kb و ۳ kb و ۵/۷ kb و ۱/۵ kb حاصل از هضم DNA ژنومی با سریالی از اندونوکلازهای محدودالایر شامل *Apa I* و *Brf I* و *Bji I* و *Kpn I* و *Sal I* و *Xba I* تنها اتصال یک قطعه به پروب مورد استفاده مشاهده شد.

مقایسه همسانی بین توالی نوکلئیدهای بخشی از ژن تانناز *آسپرژیلوس نیجر* با ژن مشابه با در سایر میکروارگانیسم استفاده از نرم افزار بیوانفورماتیکی Multiple alignment به نشانی اینترنتی <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> نشانۀ همسانی بسیار بالای توالی اسیدهای نوکلئیک این ژن با ژن تانناز در میکروارگانیسم هایی است که توالی ژنتیکی این ژن در آن میکروارگانیسم ها شناسایی شده است. مطابق استانداردهای محافل علمی و ذخایر اطلاعات ژنومی، همسانی توالی اسیدهای نوکلئیک ما بین دو ژن در حد ۲۵ درصد، مشابهت زیاد و نشانه قرابت فیلوژنیک تلقی می شود و بدین جهت همسانی حداکثر ۶۲ درصد بخشی از ژن تانناز *آسپرژیلوس نیجر* با *آسپرژیلوس اوریزه* *آ* نشان دهنده قرابت فیلوژنیک بسیار زیاد بین این دو میکروارگانیسم در میراث ژنومی و انتقال کاملاً محافظه کارانه گنجینه ژنی در طول مسیر