بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی سلولی و ملکولی

# جداسازی سویه(های) بومی پنی سیلیوم مولد مایکوفنولیک اسید و شناسایی ژنهای *hmg* و *mdd*، دخیل در فرایند تولید آنتی‌بیوتیک

نگارش
فاطمه محمودیان

استادان راهنما
دکتر سید صفاعلی فاطمی
دکتر باقر یخچالی

اسفند ۱۳۹۰

حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است.

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

رساله جهت دریافت کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی

# جداسازی سویه(های) بومی پنی سیلیوم مولد مایکوفنولیک اسید و شناسایی ژنهای *hmg* و *mdd* دخیل در فرایند تولید آنتی‌بیوتیک

نگارش :

فاطمه محمودیان

این پایان‌نامه در تاریخ ۹۰/۱۲/۱ توسط کمیته داوری مورد تایید قرار گرفته و با درجه عالی و نمره ۱۹/۹۰ ارزیابی گردید.

استاد راهنما: جناب آقای دکتر سیدصفاعلی فاطمی

استاد راهنما: جناب آقای دکتر باقر یخچالی

داور: جناب آقای دکتر مصطفی مطلبی

داور: جناب آقای دکتر مهرداد عباسی

مدیر تحصیلات تکمیلی: جناب آقای دکتر فرید حیدری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست

**تقدیم به**

**پدرم که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم**

**و به مادرم، دریای بی کران فداکاری و عشق که وجودم برایش همه رنج بود و وجودش برایم همه مهر**

**و تقدیم به خانواده عزیزم،**

**به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان من بودند.**

تقدیر و تشکر

وظیفه شاگردی خود میدانم تا مراتب سپاس و قدردانی را از جناب آقای دکتر سید صفاعلی فاطمی و جناب آقای دکتر باقر یخچالی به جا آورم که همچون پدری مهربان، با سعه صدر در تمام مراحل این پایان نامه پشتیبان من بودند و مرا از راهنمایی های ارزنده شان در عرصه علم و اخلاق بهره مند نمودند.

از همراهی و مساعدت کارشناسان محترم آزمایشگاه صنعت و محیط زیست، خانم ها رحیمی و دانش و آقایان قمی و علی اکبری صمیمانه سپاسگذارم.

همچنین از خانم میرقاسمی و آقایان نوری، خداوردی، بهروزی و ضعیفی زاده که در امر انجام و تدوین پایان نامه مرا یاری نمودند تشکر مینمایم.

**چکیده :**

مایکوفنولیک اسید، یکی از متابولیت‌های ثانویه است که توسط بعضی از گونه‌های قارچی تولید می‌شود. این دارو که دارای خاصیت آنتی‌بیوتیکی و بازدارنده‌ی سیستم ایمنی می‌باشد توسط چندین سویه پنی‌سیلیوم تولید می‌شوند که در این میان *پنی‌سیلیوم بروی‌کامپکتوم* بیشترین تولید را نشان داده است. قارچ‌های تولیدکننده‌ی متابولیت‌های ثانویه، به فراوانی در خاک یافت می‌شوند. حضور قارچ‌های تولید کننده‌ی این آنتی‌بیوتیک نیز در خاک گلخانه‌ها، جنگل‌های بارانی گرمسیری و زمین‌های کشاورزی و نیز مواد غذایی، میوه و لبنیات فاسد گزارش شده است. در این تحقیق به منظور جداسازی سویه پنی‌سیلیوم بومی مولد مایکوفنولیک اسید، از خاک مناطق مختلف و نیز مواد فاسد ذکر شده نمونه‌برداری انجام شد. پس از کشت نمونه‌ها روی محیط کشت اختصاصی، ۱٤۰ سویه پنی‌سیلیوم جداسازی گردید. تمامی این سویه‌ها در محیط کشت مایع (Czapek-Dox) و به مدت ۱۲ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس از محلول رویی کشت نمونه‌برداری و از نظر تولید این آنتی‌بیوتیک با HPLC آنالیز شدند. ۳ سویه پنی‌سیلیوم بومی تولیدکننده‌ی مایکوفنولیک اسید جداسازی شد و سویه‌ی با بالاترین تولید از نظر مورفولوژیکی(ماکروسکوپی و میکروسکوپی) و ملکولی(توالی-۱۸s rDNA) شناسایی شد. نتایج نشان داد که این سویه *پنی‌سیلیوم گلابروم* می‌باشد که تاکنون تولید این آنتی-بیوتیک توسط آن گزارش نشده است. همچنین حضور دو ژن ***hmg*** و ***mdd*** از ژن‌های اصلی مسیر بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک، در سویه تولیدکننده شناسایی شد. برای این کار از پرایمرهای طراحی شده قبل استفاده شد. این پرایمرها پس از انجام همردیفی چندگانه توالی بر اساس توالی‌های آمینواسیدی کد شده توسط این ژن‌ها در گونه‌های قارچی دیگر، از نواحی حفاظت شده‌ی بین توالی‌ها طراحی شدند. قطعات به دست آمده از این ژن‌ها درون وکتور کلون و تعیین توالی شدند. همچنین برای اثبات بیان این ژن‌ها، ابتدا استخراج RNA و سپس RT-PCR انجام و حضور mRNAی این ژنها اثبات شد. قطعات DNA حاصل از RT-PCR کلون و تعیین توالی شدند. در آخر توالی نوکلئوتیدی به دست آمده از ژن و cDNA آنها مقایسه شدند.

کلمات کلیدی: پنی‌سیلیوم، مایکوفنولیک اسید، متابولیت ثانویه، آنتی‌بیوتیک

فهرست مطالب


۱- بخش اول : مقدمه ..... ۲

۲- بخش دوم : بررسی منابع ..... ۷

۲- ۱- متابولیت های ثانویه ..... ۷

۲- ۱- ۱- بیوسنتز متابولیت های ثانویه ..... ۷

۲- ۲- ایزوپرنوئیدها ..... ۱۰

۲- ۲- ۱- بیوسنتز ایزوپرنوئیدها ..... ۱۱

۲- ۳- پلی‌کتیدها ..... ۱۵

۲- ۳- ۱- بیوسنتز پلی کتیدها ..... ۱۶

۲- ۴- مایکوفنولیک اسید ..... ۲۰

۲- ۴- ۱- مکانیسم عمل مایکوفنولیک اسید ..... ۲۲

۲- ۴- ۲- بیوسنتز مایکوفنولیک اسید ..... ۲۴

۲- ۵- پنی سیلیوم ها ..... ۲۷

۲- ۶- قارچهای رشته‌ای تولیدکننده متابولیت ثانویه ..... ۳۰

۲- ۷- تنظیم بیان خوشه ژنی مربوط به متابولیت ثانویه در قارچ ها ..... ۳۳

۲- ۸- معرفی دو آنزیم درگیر در مسیر بیوسنتز مایکوفنولیک اسید ..... ۳۵

۲- ۸- ۱- آنزیم موالونات دی فسفات دکربوکسیلاز ..... ۳۵

۲- ۸- ۲- آنزیم ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم آ ..... ۳۶

۲- ۹- مهندسی متابولیک ..... ۳۸

۲- ۹- ۱- نیازمندی های مهندسی متابولیک ..... ۳۹
۲- ۹- ۲- ساختار مسیرهای سنتتیک ..... ۴۱
۳- بخش سوم : مواد و روشها ..... ۴۴
۳- ۱- مواد ..... ۴۴
۳- ۱- ۱- مواد شیمیایی ..... ۴۴
۳- ۱- ۲- میکروارگانیسم‌ها ..... ۴۵
۳- ۱- ۳- پلاسمید ..... ۴۵
۳- ۱- ۴- آنتی‌بیوتیک ها ..... ۴۵
۳- ۱- ۵-محلولها ..... ۴۶
۳- ۱- ۶- محیط کشتهای مورد استفاده ..... ۴۸
۳- ۱- ۷- بافرCTAB برای استخراج DNAی ژنومی قارچ ..... ۵۲
۳- ۱- ۸- کیت‌های آزمایشگاهی ..... ۵۲
۳- ۱- ۹-آنزیم‌ها ..... ۵۳
۳- ۱- ۱۰- نشانگرهای وزن مولکولی (DNA Size Markers) ..... ۵۳
۳- ۱- ۱۱- مواد واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ..... ۵۴
۳- ۲- روشها ..... ۵۶
۳- ۲- ۱- نمونه برداری از خاک زمین های کشاورزی مناطق مختلف ..... ۵۶
۳- ۲- ۲- جداسازی تک اسپور ..... ۵۶
۳- ۲- ۳- رنگ آمیزی و مشاهده میکروسکوپی ..... ۵۷
۳- ۲- ۴- تهیه ذخیره از نمونه های قارچ ..... ۵۸

۳- ۲- ۵- آماده سازی نمونه ها ..... ۵۹
۳- ۲- ۶- اندازه‌گیری کمی و کیفی تولید مایکوفنولیک اسید تولید شده ..... ۵۹
۳- ۲- ۷- روش کشت اسلاید ..... ۶۰
۳- ۲- ۸- استخراج DNA ژنومی قارچ به روشCTAB ..... ۶۱
۳- ۲- ۹- الکتروفورز DNA ..... ۶۲
۳- ۲- ۱۰- تعیین غلظت و خلوص DNA ..... ۶۳
۳- ۲- ۱۱- تکثیر اختصاصی مولکول DNA از طریق واکنش زنجیره ای پلی مراز ..... ۶۴
۳-۲-۱۲-بازیافت قطعات DNA از ژل آگارز ..... ۶۸
۳- ۲- ۱۳- اتصال قطعات DNA به وکتور PTZ57R/T ..... ۷۰
۳- ۲- ۱۴- تهیه‌ی سلولهای مستعد ..... ۷۱
۳-۲-۱۵-انتقال پلاسمید به باکتری مستعد شده ..... ۷۲
۳- ۲- ۱۶- کلونی PCR ..... ۷۲
۳- ۲- ۱۷- استخراج DNA پلاسمیدی ..... ۷۳
۳- ۲- ۱۸- استخراج RNA با استفاده از تریزول ..... ۷۵
۳- ۲- ۱۹- RT-PCR ..... ۷۷
۳- ۲- ۲۰- پایگاهها و نرم افزارهای بیوانفورماتیک ..... ۷۸
۴- بخش چهارم : نتایج ..... ۸۲
۴- ۱- کشت نمونه های مختلف ..... ۸۲
۴-۲-تولید مایکوفنولیک اسید توسط ایزوله‌ها ..... ۸۵
۴- ۲- ۱- تهیه نمودار استاندارد مایکوفنولیک اسید ..... ۸۶

۴- ۲- ۲- شناسایی مایکوفنولیک اسید در ایزوله‌های پنی‌سیلیوم ..... ۸۶
۴- ۲- ۳- رسم منحنی استاندارد مایکوفنولیک اسید ..... ۸۹
۴- ۳- شناسایی مورفولوژیکی قارچ مولد مایکوفنولیک اسید ..... ۹۱
۴-۳-۲-خصوصیات میکروسکوپی سویه ..... ۹۳
۴- ۴- شناسایی مولکولی ..... ۹۴
۴- ۴- ۱- استخراج ژنوم سویه *پنی سیلیوم گلابروم* ..... ۹۴
۴- ۴- ۲-تکثیر ۱۸s rDNA توسط PCR ..... ۹۵
۴- ۴- ۳- شناسایی ژنهای *mdd* و *hmg* در ژنوم سویه *پنی‌سیلیوم گلابروم* ..... ۹۹
۴- ۴- ۴- بررسی بیان ژنهای *mdd* و *hmg* در سویه *پنی‌سیلیوم گلابروم* ..... ۱۰۳
۵- نتیجه گیری نهایی ..... ۱۰۸
۶- پیشنهادات ..... ۱۰۹
۷- منابع ..... ۱۱۰

فهرست جدول ها

جدول ۳-۱- مشخصات باکتری اشریشیاکلی سویه $DH_5A$ ..... ۴۵

جدول ۳-۲- خصوصیات پلاسمید استفاده شده ..... ۴۵

جدول ۳-۳- آنتی بیوتیک های مورد استفاده ..... ۴۵

جدول ۳-۴- محلولهای مورد نیاز برای استخراج DNA پلاسمیدی در مقیاس کم به روش لیز قلیایی ..... ۴۶

جدول ۳-۵- مواد تشکیل دهنده TAE 50X ..... ۴۷

جدول ۳-۶- ترکیبات محیط کشت LB ..... ۴۸

جدول ۳-۷- ترکیبات محیط کشت مایع CZAPEK-DOX(CZ) برای تولید مایکوفنولیک اسید ..... ۵۰

جدول ۳-۸-ترکیبات محیط کشتCYA ..... ۵۱

جدول ۳-۹- ترکیبات محیط کشتMEA ..... ۵۱

جدول ۳-۱۰- ترکیبات و غلظت آنها در بافر CTAB ..... ۵۲

جدول ۳-۱۱- فهرست آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق ..... ۵۵

جدول ۳-۱۲- مواد مورد نیاز PCR مربوط به تکثیر توالی ۱۸S rRNA ..... ۶۵

جدول ۳-۱۳- برنامه PCR استفاده شده برای تکثیر توالی ۱۸S rRNA ..... ۶۶

جدول ۳-۱۴- مواد مورد نیاز PCR برای تکثیر دو ژن MDD و HMG ..... ۶۷

جدول ۳-۱۵- برنامه PCR استفاده شده برای تکثیر ژن MDD ..... ۶۷

جدول ۳-۱۶- برنامه PCR استفاده شده برای تکثیر ژن HMG ..... ۶۸

جدول ۳-۱۷- مقادیر مواد مورد نیاز برای واکنش LIGATION ..... ۷۰

جدول ۳-۱۸- مواد مورد نیاز در تهیه cDNA ..... ۷۸

جدول ۳-۱۹- برنامه مورد استفاده در RT-PCR ..... ۷۸

جدول ۳-۲۰- انواع مختلف برنامه های BLAST..... ۷۹

جدول ۴-۱- محلهای نمونه برداری خاک و تعداد سویه های پنی سیلیوم جداشده و تولید کننده ی MPA۸۳

جدول ۴-۲- غلظت مایکوفنولیک اسید تولید شده توسط ایزوله ها ..... ۹۱

فهرست شکل ها

شکل ۲-۱- ساختار بیوشیمیایی بعضی از متابولیت های ثانویه ..... ۹

شکل ۲-۲- رده های متفاوت ایزوپرنوئیدها و پیش سازهای آنها ..... ۱۱

شکل ۲-۳- مسیر MEP در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها ..... ۱۳

شکل ۲-۴- مسیر موالونات در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها ..... ۱۵

شکل ۲-۵- مراحل اصلی بیوسنتز پلی کتید های قارچی ..... ۱۷

شکل ۲-۶- نمونه هایی از انواع پلی کتید سنتازهای قارچی ..... ۱۸

شکل ۲-۷- نمونه هایی از خوشه های ژنی دخیل در بیوسنتز پلی کتیدها ..... ۱۹

شکل ۲-۸- خوشه ژنی مربوط به بیوسنتز تتراکتید مایکوفنولیک اسید ..... ۲۰

شکل ۲-۹- ساختار شیمیایی مایکوفنولیک اسید ..... ۲۰

شکل ۲-۱۰- مسیرهای بیوسنتز نوکلئوتید گوانین و اثر مایکوفنولیک اسید روی آنزیم اینوزین مونوفسفات دهیدروژناز ..... ۲۴

شکل ۲-۱۱- ژن کد کننده آنزیم پلی کتید سنتاز در *پنی سیلیوم بروی کامپکتوم* ..... ۲۵

شکل ۲-۱۲- پروتئین محصول ژن MPAA، دارای فعالیت پرنیل ترانسفرازی ..... ۲۶

شکل ۲-۱۳- مسیر بیوسنتز مایکوفنولیک اسید در *پنی سیلیوم بروی کامپکتوم* ..... ۲۷

شکل ۲-۱۴- ساختار میکروسکوپی جنس پنی سیلیوم ..... ۳۰

شکل ۲-۱۵- مدل پیشنهادی برای کنترل وابسته به کروماتین در خوشه های ژنی مربوط به متابولیت های ثانویه ..... ۳۴

شکل ۲-۱۶- واکنش تبدیل موالونات دی فسفات به ایزوپنتنیل دی فسفات ..... ۳۶

شکل ۲-۱۷- واکنش تبدیل ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیم آ به موالونات ..... ۳۷

شکل ۳-۱- نشانگرهای وزن مولکولی ..... ۵۳

شکل ۳-۲- تصویر لام شمارش نئوبار (هموسیتومتر) زیر میکروسکوپ ..... ۵۸

شکل ۳-۳- روش کشت اسلاید ..... ۶۱

شکل ۴-۱- تصویر ساختار پنی سیلیوم های جدا شده با استفاده از میکروسکوپ نوری ..... ۸۲

شکل ۴-۲- کشت خالص پنی سیلیوم جدا شده روی پلیتPDA پس از اسپورزایی ..... ۸۳

شکل ۴-۳- کروماتوگرام مربوط به استاندارد مایکوفنولیک اسید با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر ... ۸۶

شکل ۴-۴- کروماتوگرام مربوط به سویه پنی سیلیوم شماره ۱ ..... ۸۷

شکل ۴-۵- کروماتوگرام مربوط به سویه پنی سیلیوم شماره ۲ ..... ۸۷

شکل ۴-۶- کروماتوگرام مربوط به سویه پنی سیلیوم شماره ۳ ..... ۸۸

شکل ۴-۷- کروماتوگرام مربوط به سویه شماره ۱ پس از افزودن محلول استاندارد ..... ۸۹

شکل ۴-۸- نمودار استاندارد مایکوفنولیک اسید ..... ۹۰

شکل ۴-۹- مورفولوژی سویه پنی سیلیوم شماره ۱ روی محیط کشت CYA ..... ۹۲

شکل ۴-۱۰- مورفولوژی سویه پنی سیلیوم شماره ۱ روی محیط کشت MEA ..... ۹۲

شکل ۴-۱۱- ساختار میکروسکوپی سویه پنی سیلیوم شماره ۱ ..... ۹۳

شکل ۴-۱۲- استخراج DNA ژنومی سویه *پنی سیلیوم گلابروم* ..... ۹۴

شکل ۴-۱۳- تکثیر توالی ۱۸S rDNA سویه *پنی سیلیوم گلابروم* ..... ۹۵

شکل ۴-۱۴–درخت فیلوژنی مربوط به توالی ۱۸S rDNA سویه شماره ۱ در مقایسه با تعدادی از سویه های پنی سیلیوم ..... ۹۷

شکل ۴-۱۵– توالی نوکلئوتیدی ۱۸S rDNA سویه *پنی سیلیوم گلابروم* ..... ۹۹

شکل ۴-۱۶– تکثیر قطعه ی داخلی ژنهای *HMG* و *MDD* توسط PCR..... ۱۰۰

شکل ۴-۱۷– توالی نوکلئوتیدی قطعه DNA به دست آمده از ژن *HMG* مربوط به سویه *پنی سیلیوم گلابروم* ۱۰۱

شکل ۴-۱۸– توالی نوکلئوتیدی قطعه DNA به دست آمده از ژن *MDD* مربوط به سویه *پنی سیلیوم گلابروم* ۱۰۲

شکل ۴-۱۹– استخراج RNA کل سلول از سویه *پنی سیلیوم گلابروم* .....۱۰۳

شکل ۴-۲۰– توالی نوکلئوتیدی cDNA قطعه ی ژن *HMG* مربوط به سویه *پنی سیلیوم گلابروم* .....۱۰۴

شکل ۴-۲۱– توالی نوکلئوتیدی cDNA قطعه ی ژن *MDD* مربوط به سویه *پنی سیلیوم گلابروم* .....۱۰۵

شکل ۴-۲۲– درخت فیلوژنی مقایسه توالی ژن *HMG* سویه *پنی سیلیوم گلابروم* با دیگر گونه های قارچی ۱۰۶

شکل ۴-۲۳– درخت فیلوژنی مقایسه توالی ژن *MDD* سویه *پنی سیلیوم گلابروم* با دیگر گونه های قارچی ۱۰۶

# بخش اول

# مقدمه

## ۱ - بخش اول : مقدمه

مایکوفنولیک‌اسید[۱] (٦ (٤-هیدروکسی-٦-متوکسی-٧-متیل-٣-اوکسوفتالانیل)٤متیل-٤هگزنیک اسید) در سال ۱۸۹٦ به فرم کریستال جداسازی شد و اولین متابولیت ثانویه‌ای است که خاصیت آنتی‌بیوتیکی آن علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله عامل بیماری سیاه‌زخم مشخص شده است( Vinokurova et al.,2005). مایکوفنولیک‌اسید یک داروی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی است که برای جلوگیری از رد پیوند در پیوند اعضا استفاده می شود(Overy and Frisvad, 2005). هم اکنون دو مشتق دارویی از آن با نام‌های مایکوفنولات مفتیل[۲](MMF) با نام تجاری ®CellCept و مایکوفنولات سدیم[۳] با نام تجاری Myfortic به بازار عرضه می‌شود (Torsten et al., 2011). این آنتی‌بیوتیک و مشتقات آن دارای ویژگی‌های زیستی وسیعی از جمله فعالیت ضدقارچی، ضدویروسی، ضدتوموری، ضدالتهابی، آنتی سوریاسیس و بازدارنده‌ی سیستم ایمنی می‌باشند.

مایکوفنولیک اسید و مایکوفنولات مفتیل در سال ۱۹۹۵ به عنوان داروی متوقف کننده ی سیستم ایمنی برای تجویز پس از اعمال جراحی پیوند اعضا و به منظور ممانعت از پس زدن عضو پیوندی توسط بدن انسان توسط FDA تایید شد و تنها در فاصله سالهای ۱۹۹۵-۱۹۹۸ برای درمان بیش از ۵۰۰۰ بیمار پس از پیوند کلیه مورد استفاده قرار گرفت. همچنین در سال ۲۰۰۵ مایکوفنولات سدیم نیز توسط FDA تایید شد.

مایکوفنولیک‌اسید اثر اختصاصی روی لنفوسیتهایB وT دارد ولی اثر سمی خفیفی روی سایر سلولهای انسانی دارد. به همین دلیل میتواند بهترین داروی جایگزین داروهای بازدارنده سیستم ایمنی از قبیل سیکلوسپورین‌ها باشد (Xua and Yang, 2007). این آنتی‌بیوتیک اولین بار از محیط کشت مایع گونه‌های پنی‌سیلیوم جداسازی گردید.

علیرغم اهمیت این دارو و کاربردهای رو به افزایش آن، اطلاعات کمی راجع به آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز مایکوفنولیک‌اسید در قارچهای تولید کننده‌ی آن موجود است. این آنتی‌بیوتیک توسط چندین گونه از جنس پنی‌سیلیوم تولید می‌شود که در این میان *پنی‌سیلیوم بروی کامپکتوم* توانایی تولید بالاتری را

---

[۱]- Mycophenolic acid
[۲] - Mycophenolate mofetil
[۳] - Mycophenolate sodium

نشان داده است. جنس پنی‌سیلیوم‌ها شامل گروه پراکنده‌ای از قارچ‌هاست که در خاک یافت می‌شوند و انواع متنوعی از مواد آلی را تجزیه می‌کنند. این جنس دارای حدود ۲۵۰ گونه است (Seifert et al., 2011) که از این تعداد حدود ۸۰ گونه دارای مرحله جنسی یا تلئومورفیک شناخته شده هستند (Webster and Weber, 2007). پنی‌سیلیوم‌ها معتدل‌دوست و جزء آسکومیست‌ها می‌باشند.گونه‌های پنی‌سیلیوم از تولیدکننده‌های مهم متابولیت‌های ثانویه مثل مواد دارویی هستند (Otero and Nielsen , 2010).

گزارش شده است که سویه‌های تولیدکننده‌ی مایکوفنولیک اسید بیشتر از خاک گلخانه‌ها، جنگل‌های بارانی، خاک چمن‌کاری شده و زمین‌های کشاورزی زیر کشت درخت سیب و یونجه و شبدر جدا شده است. همچنین قارچ‌های تولیدکننده‌ی مایکوفنولیک اسید از مواد غذایی، میوه و لبنیات فاسد نیز جدا شده‌اند (N. G. Vinokurova and M. U. Arinbasarov, 2005).

شناسایی ساختار مایکوفنولیک اسید با فرمول شیمیایی $C_{17}H_{20}O_6$ در سال ۱۹۵۷ توسط Birch و همکارانش مشخص کرد که متعلق به گروهی از ترکیبات به نام مروترپنوئیدها می‌باشد. این ترکیبات دارای یک پلی کتید متصل به یکی از واسطه‌های مسیر موالونات به نام فارنسیل‌دی‌فسفات هستند. در نتیجه دو مسیرمجزا، مسیر بیوسنتز ایزوپرنوئیدی و مسیر بیوسنتز پلی‌کتیدی در تولید این ماده دخیل می-باشند.

در سال ۲۰۰۸ نیلسن[٤] و تورستن[٥] توانستند خوشه‌ی ژنی مربوط به سنتز بخش پلی‌کتیدی مایکوفنولیک اسید و ژن‌های درون آن را شناسایی نمایند (Nielsen and Torsten, 2008).

در سال ۱۳۸۹ نیز مدل شبکه متابولیکی شامل ۷۳ واکنش بیوشیمیایی برای بیوسنتز این آنتی بیوتیک توسط دکتر فاطمی و همکاران در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ارائه و کمی سازی شد(اردستانی، ۱۳۸۹). همچنین تاکنون ژنهای کدکننده‌ی آنزیم‌های اسکوالن سنتاز و ۳–هیدروکسی ۳–متیل‌گلوتاریل‌کوآنزیم‌آ ردوکتاز و نیز آنزیم‌های موالونات دی فسفات دکربوکسیلاز، ایزوپنتنیل پیروفسفات ایزومراز و فارنسیل دی فسفات سنتاز، توسط همین گروه در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست

[٤] - Nielsen
[٥] - Torsten

فناوری، در قارچ پنی‌سیلیوم بروی کامپکتوم شناسایی و تعیین توالی شدند(لطفی نیا، ۱۳۸۹؛ محمدیان، ۱۳۸۹).

همچنین با استفاده از نتایج حاصل از بررسی مراحل کنترل کننده مسیر متابولیکی مایکوفنولیک اسید، گلوگاه‌های احتمالی آن مشخص شده است (اردستانی،۱۳۸۹). دو آنزیم مهم که جزء این گلوگاه‌ها هستند و نقش کلیدی در بیوسنتز دارند، موالونات دی فسفات دکربوکسیلاز (EC:4.1.1.33) و ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیمآ (EC:1.1.1.34) می‌باشند.

از آنجا که تاکنون سویه تولید کننده ی مایکوفنولیک اسید بومی ایران جداسازی نشده است و از طرفی هزینه بالایی جهت واردات سالیانه ی این دارو صرف می شود، لذا دستیابی به سویه تولید کننده بالای این آنتی بیوتیک و طراحی یک سیستم زیستی کارآمد و سپس بکارگیری آن در فرآیند تخمیر تحت شرایط بهینه تولید، ضروری به نظر می رسد.

بخشی از ژن‌های گفته شده در بالا در این تحقیق در سویه بومی جدا سازی و تعیین توالی شدند. با شناسایی بالادست و پایین دست این قطعه، می‌توان به توالی کل این ژن‌ها و ساختار آن‌ها دست یافت. سپس با روش مهندسی متابولیک و دستکاری بخش تنظیمی آنها، به تولید بالاتر این آنتی‌بیوتیک در این سویه دست یافت.

این پایان‌نامه دارای پنج بخش می‌باشد. در بخش بررسی منابع به معرفی اجمالی متابولیت‌های ثانویه، ایزوپرنوئیدها، پلی‌کتیدها و مایکوفنولیک اسید و بیوسنتز آنها و نیز معرفی جنس پنی‌سیلیوم‌ها پرداخته و در ادامه در مورد محل‌های جداسازی سویه‌های پنی‌سیلیوم تولید کننده‌ی متابولیت‌های ثانویه و مایکوفنولیک اسید، توضیحاتی داده شده است. همچنین دو آنزیم مهم مسیر بیوسنتز مایکوفنولیک اسید، موالونات دی فسفات دکربوکسیلاز و ۳- هیدروکسی ۳- متیل گلوتاریل کوآنزیمآ، معرفی‌گردیده‌اند.

در بخش مواد و روش‌ها، به کلیه مواد، روش‌های آزمایشگاهی و پرایمرهای طراحی شده و مورد استفاده در این تحقیق اشاره شده است.

در بخش نتایج، به ارائه نتایج حاصل از جداسازی سویه‌های پنی‌سیلیوم از نمونه‌های مختلف و کشت آنها و نیز تعداد سویه‌های مولد این آنتی‌بیوتیک و مقدار تولید هریک پرداخته شده است. در ادامه حضور ژن-

های *mdd* و *hmg* و نیز mRNAی مربوط به این دو ژن در سویه مولد با بالاترین میزان تولید تایید گردید.

در بخش بحث و پیشنهادات، به تحلیل نتایج حاصل مقایسه با نتایج تحقیقات قبل پرداخته شده است و نیز به پیشنهاداتی در ادامه‌ی این تحقیق اشاره شده است.

برخی از اطلاعات تکمیلی نظیر نمودارهای کروماتوگرام و نتایج همردیفی توالی‌ها در بخش پیوست آمده است.