١٢٩٧٠١

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی سلولی مولکولی

گرایش ژنتیک

ترانسفورماسیون پروتوپلاست‌های استرپتومایسس گریزئوس با وکتور بیانی pMT3206 وکلونینگ ژن Δ*strR* در باکتری *E. coli* توسط وکتور pMA::hyg

استاد راهنما:
دکتر زهره حجتی

استاد مشاور:
دکتر مجید متولی‌باشی

پژوهشگر:
سمیه پناهی‌مقدم

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

تیر ماه ۱۳۸۸

۱۲۹۷۰۱

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق
موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه
اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه رعایت شده است
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست‌شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش ژنتیک خانم سمیه پناهی مقدم تحت عنوان

ترانسفورماسیون پروتوپلاست‌های استرپتومایسس گریزئوس با وکتور بیانی pMT3206 وکلونینگ ژن Δ*strR* در باکتری *E. coli* توسط وکتور pMA::hyg

در تاریخ ۸۸/۴/۱۳ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه دکتر زهره حجتی با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

۲- استاد مشاور پایان‌نامه دکتر مجید متولی باشی با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

۳- استاد داور داخل گروه دکتر منوچهر توسلی با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

۴- استاد داور خارج گروه دکتر حسن کربکندی با مرتبه‌ی علمی استادیار — امضا

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

امضای مدیر گروه

ستایش خدایی راکه اوّل و آخر وجود است، بی آنکه اوّلی بر او پیشی بگیرد یا آخری پس از او باشد.

باسپاس فراوان از استاد راهنمای ارجمندم سرکار خانم دکتر زهره حجتی که بی شک سهمی بزرگ در پیشبرد این تحقیق داشتند. همچنین از جناب دکتر مجید متولی باشی به سبب قبول زحمت مشاوره پایان نامه تشکر می کنم. از اساتید محترم گروه ژنتیک جناب آقایان دکتر منوچهر توسلی، دکتر کامران قائدی و دکتر صادق ولیان که این دوران سه ساله بربار علمی و اخلاقی بنده افزودند کمال تشکر را دارم و افتخار شاگردی این عزیزان مایه سرافرازی من است.

از دوستان عزیز و یاران همیشگی ام خانم ها نجمه حشمت پور، هدا باز افکن، زینب حلاجیان، فاطمه نوری، اکرم حبیبی، الناز شکرانی، کبری جنت و سایر هم کلاسی ها و دوستان نهایت تشکر را دارم، چراکه دوران سخت دوری از خانه با خاطرات شیرین در کنار این عزیزان بودن به خوشی سپری شد.

و در آخر تشکر ویژه دارم از خانواده مهربانم، پدر و مادر فداکار و برادران و خواهر دوست داشتیم به پاس همراهی شان.

به نام پدر

بوسه اي بايد زد

دست هايي را

كه مي تابانند

نيرو را

و محكم مي كنند

استواري پايه
هاي زيستن را

به نام مادر

بوسه اي بايد زد

دست هايي را

كه مي شويند غبار خستگي روزگار را

و سيراب مي كنند روح تشنه را

وتقدیم به هرآنکه جوینده ی علم است

چکیده

خانواده استرپتومایسس گروهی از باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت و خاکزی هستند. این گروه از باکتری‌ها به دلیل تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه از جمله انواع آنتی‌بیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. از میان این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به کلرامفنیکل، ونکومایسین، ریفامپیسین و پنی‌سیلین اشاره کرد.

گونه استرپتومایسس گریزئوس که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته‌است به عنوان اولین تولیدکننده آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین شناخته شده است.

تولید آنتی‌بیوتیک‌ها تحت کنترل مجموعه‌ای از پیام‌های داخل سلولی است که در ۳ سطح تنظیم شده‌اند و به ترتیب شامل تنظیم‌کننده‌های سراسری (global regulators)، تنظیم‌کننده‌های چندگانه (pleiotropic regulators) و تنظیم‌کننده‌های اختصاصی مسیر(pathway specific regulators) هستند.

StrR نوعی پروتئین تنظیم‌کننده اختصاصی مسیر است که در مراحل نهایی بیوسنتز استرپتومایسین فعال شده و تنظیم رونویسی سایر ژن‌های دسته ژنی بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک را بر عهده می‌گیرد.

با توجه به اینکه هدف نهایی این تحقیق، کلونینگ ژن تنظیمی *strR* در وکتورهای بیانی مناسب و انتقال این وکتورها به میزبان اصلی یعنی استرپتومایسس گریزئوس به منظور افزایش بیان این ژن و به تبع آن افزایش تولید استرپتومایسین است، دو هدف بطور همزمان دنبال شد. هدف اول راه‌اندازی یک روش مناسب جهت انتقال DNA خارجی به استرپتومایسس گریزئوس بود. این کار از طریق ترانسفورماسیون وکتور بیانی pMT3206 به پروتوپلاست‌های استرپتومایسس گریزئوس با روش انتقال با واسطه PEG با وزن مولکولی ۱۰۰۰ با موفقیت به انجام رسید.

هدف دوم کلونینگ ژن *strR* از دو سویه استرپتومایسس گریزئوس PTCC1127 و ATCC1952 در وکتور pMA::hyg بود. برای این منظور ژن *strR* مربوط به این سویه‌ها با روش PCR تکثیر و سپس در وکتور pMA::hyg الحاق گردید. در واکنش الحاق به دلیل به کارگیری دو جایگاه برش متفاوت *BamHI* و *Xba*I در دو انتهای ژن *strR* و وکتور pMA::hyg احتمال خودالحاقی وکتور pMA::hyg وجود نداشت. در مرحله بعد وکتورهای نوترکیب ساخته شده به نام‌های pSP*strR* (حاوی ژن *strR* مشتق از سویه PTCC1127) و pSM*strR* (حاوی ژن *strR* مشتق از سویه ATCC1952) به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* XL1Blue ترانسفورم شدند.

برای حذف یک ناحیه ۵۱ جفت بازی از ژن *strR* وکتور جدید pSP*strR* به عنوان الگو در واکنش Soeing PCR مورد استفاده قرار گرفت. ایجاد جهش حذفی در *strR* بر پایه شباهت توالی اسید آمینه پروتئین StrR با یک پروتئین تنظیمی دیگر به نام SpoOJ از باکتری باسیلوس سوبتیلیس به خصوص در دومین مشترک SpoOJ موجود در این دو پروتئین بود. پروتئین SpoOJ در تفکیک صحیح کروموزومی و همچنین شروع اسپورزایی در باسیلوس سوبتیلیس دارای نقش کلیدی است. به این ترتیب ژن *str*R دچار حذف (Δ*strR*) در وکتور pMA::hyg کلون و وکتور جدید pSPMΔ*strR* به باکتری *E. coli* XL1Blue انتقال یافت.

پرایمرهای Soeing با طوری طراحی شدند که تغییری در قالب خواندن محصول Soeing PCR ایجاد نشود.

برای تأیید صحت ورود ژن‌های *strR* و Δ*strR* به وکتور pMA::hyg، بر روی محصولات استخراج شده از باکتری *E. coli* XL1Blue انجام شد. PCR

در مراحل بعدی می‌توان ژن فاقد حذف *strR* را در وکتور بیانی pMT3206 کلون و در میزبان استرپتومایسس گریزئوس ترانسفورم کرد و اثر افزایش بیان این ژن تنظیمی را در افزایش میزان تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بررسی کرد.

همچنین با انتقال وکتور نوترکیب pSPMΔ*strR* به استرپتومایسس گریزئوس اثرات این جهش حذفی را در تغییر میزان تولید استرپتومایسین و حتی تغییر در نحوه تفکیک کروموزومی و زمان شروع اسپورزایی استرپتومایسس گریزئوس مورد بررسی قرار داد.

واژگان کلیدی: استرپتومایسس گریزئوس،ژن *strR*، استرپتومایسین، وکتور pMT3206، وکتور pMA::hyg، Soeing PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- اکتینومیست‌ها ۱

۱-۲- خانواده استرپتومایسس ۴

۱-۲-۱- مطالعات اسپورزایی با استفاده از سویه‌های موتان استرپتومایسس سیلیکالر ۵

۱-۲-۲- نقش فاکتورA در اسپورزایی ۵

۱-۲-۳- نقش فاکتورC در تمایز سلولی در استرپتومایسس گریزئوس ۶

۱-۲-۴- ژنتیک استرپتومایسس ۷

۱-۲-۴-۱- نقش احتمالی نواحی TIR در ترمیم نوترکیبی DNA ۷

۱-۲-۴-۲- عناصر متحرک ۸

۱-۲-۴-۳- پلاسمیدهای استرپتومایسس ۸

۱-۲-۵- ویژگی‌های عمومی ژنوم استرپتومایسس گریزئوس ۱۰

۱-۲-۵-۱- ساختار تلومر در کروموزوم استرپتومایسس گریزئوس ۱۱

۱-۲-۵-۲- دسته‌های ژنی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در استرپتومایسس گریزئوس ۱۳

۱-۲-۵-۳- سایر دسته‌های ژنی در استرپتومایسس گریزئوس ۱۴

۱-۳- آبشار تنظیمی بیوسنتز استرپتومایسین ۱۴

۱-۳-۱- دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین ۱۶

شکل۱-۷: دسته ژنی بیوسنتز استرپتومایسین ۱۷

۱-۴- آمینوگلیکوزیدها ۱۷

۱-۴-۱- مکانسیم فعالیت آمینوگلیکوزیدها ۱۸

۱-۵- استرپتومایسین ۱۹

۱-۵-۱- مکانسیم عمل استرپتومایسین ۲۰

۱-۶- سیستم های باکتریایی محدودیت- اصلاح ۲۳

۱-۷- روش‌های غلبه بر سدهای محدودیتی موجود در استرپتومایسس و ترانسفورماسیون استرپتومایسس .۲۴

۱-۷-۱- مکانیسم عملکرد PEG ۲۶

۱-۸- اهداف تحقیق ۲۶

عنوان | صفحه

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه‌های باکتریایی ۲۸
۲-۲- وکتورها ۲۹
۲-۲-۱- وکتور pMT3206 ..... ۲۹
۲-۲-۲- وکتور pMA::hyg ۳۰
۲-۳- محیطهای کشت ۳۱
۲-۳-۱- محیط کشتGYM ۳۲
۲-۳-۲- محیط کشت YEME ۳۲
۲-۳-۳- محیط کشت لوریا-برتنی (LB) ۳۳
۲-۳-۴- محیط کشت لوریا- برتنی آگار (LBA) ۳۳
۲-۳-۵- محیط کشت SPMR ۳۴
۲-۴- آنتی‌بیوتیک ۳۵
۲-۵- شرایط کشت و نگهداری سویه های باکتریایی ۳۵
۲-۵-۱- باکتری اشرشیاکلی ۳۵
۲-۵-۲- تهیه ذخیره اسپور از استرپتومایسس گریزئوس و استرپتومایسس سیلیکالر ۳۵
۲-۵-۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای تهیه ذخیره اسپور ۳۵
۲-۵-۲-۲- روش تهیه ذخیره اسپور ۳۶
۲-۶- کشت استرپتومایسس برای استخراج DNA ژنومی ۳۷
۲-۶-۱- استخراج DNA از استرپتومایسس گریزئوس ۳۷
۲-۶-۲- استخراج DNA با استفاده از روش CTAB ۳۷
۲-۶-۲-۱- روش استخراج DNA با استفاده از روش CTAB ۳۸
۲-۷- الکتروفورز DNA ۳۹
۲-۷-۱- مواد مورد نیاز برای الکتروفورز ۳۹
۲-۷-۱-۱- بافر الکتروفورز ۱۰X TBE ۳۹
۲-۷-۱-۲- بافر الکتروفورز ۱۰X TAE ۳۹
۲-۷-۱-۳- اتیدیوم بروماید ۳۹
۲-۷-۱-۴- لودینگ بافر ۴۰

عنوان | صفحه

۲-۷-۱-۵- مارکرهای اندازه DNA ۴۰
۲-۷-۲- ژل آگارز و الکتروفورز ۴۱
۲-۸- پرایمرها ۴۱
۲-۸-۱- طراحی پرایمرها ۴۱
۲-۸-۲- رقیق کردن پرایمرها ۴۳
۲-۹- تکنیک PCR ۴۶
۲-۹-۱- مواد مورد نیاز برای PCR ۴۶
۲-۱۱- تکنیک Nested-PCR ۵۰
۲-۱۲- تکنیک PCR-RFLP ۵۱
۲-۱۲-۱- تهیه Restriction Map برای تکنیک PCR-RFLP ۵۱
۲-۱۲-۲- روش انجام تکنیک PCR-RFLP ۵۱
۲-۱۳- خالص‌سازی نمونه‌ها از ژل ۵۳
۲-۱۳-۱- مواد لازم برای خالص‌سازی نمونه‌های DNA از ژل ۵۳
۲-۱۳-۲- روش استخراج وخالص‌سازی نمونه‌های DNA از ژل ۵۴
۲-۱۴- تعیین اندازه و غلظت DNA توسط الکتروفورز ۵۵
۲-۱۵- هضم دوگانه آنزیمی با آنزیم محدودکننده ۵۶
۲-۱۵-۱- مواد لازم برای هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده ۵۶
۲-۱۵-۲- روش هضم آنزیمی با آنزیم محدودکننده ۵۶
۲-۱۵-۲-۱- *BamHI* : ۵۶
۲-۱۵-۲-۲- *XbaI* : ۵۶
۲-۱۶- تکنیک الحاق ۵۷
۲-۱۶-۱- مواد لازم برای تکنیک الحاق ۵۸
۲-۱۶-۲- روش انجام تکنیک الحاق ۵۸
۲-۱۷- آماده سازی سلول‌های باکتریایی جهت انتقال DNA بیگانه ۵۸
۲-۱۷-۱- تهیه پروتوپلاست استرپتومایسس ۵۸
۲-۱۷-۱-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه پروتوپلاست استرپتومایسس گریزئوس ۵۸
۲-۱۷-۱-۲- روش تهیه پروتوپلاست‌های استرپتومایسس ۶۰

عنوان | صفحه

۲-۱۷-۲- تهیه سلولهای مستعد *E. coli* ۶۱
۲-۱۷-۲-۱- مواد مورد نیاز برای تهیه سلولهای مستعد *E. coli* ۶۱
۲-۱۷-۲-۲- روش تهیه سلولهای مستعد *E. coli* ۶۲
۲-۱۸- ترانسفورماسیون پلاسمید ۶۲
۲-۱۸-۱- ترانسفورماسیون پلاسمید به باکتری *E. coli* ۶۲
۲-۱۸-۲- ترانسفورماسیون پلاسمید به استرپتومایسس گریزئوس ۶۳
۲-۱۹- استخراج DNA پلاسمیدی ۶۴
۲-۱۹-۱- استخراج DNA پلاسمیدی از باکتری*E. coli* ۶۴
۲-۱۹-۱-۱-مواد مورد نیاز برای استخراج پلاسمید ۶۴
۲-۱۹-۱-۲- روش استخراج پلاسمید ۶۶
۲_۱۹_۲_استخراج DNA پلاسمیدی از استرپتومایسس ۶۷
۲-۱۹-۲-۱- مواد مورد نیاز برای استخراج پلاسمید ۶۷
۲-۱۹-۲-۲- روش استخراج پلاسمید ۶۷
۲-۲۰- ترسیب DNA ۶۸
۲-۲۱- دستگاه‌های مورد استفاده ۶۹

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱- تهیه و کشت اسپور استرپتومایسس ۷۰
۳-۲- نتایج استخراج DNA از استرپتومایسس گریزئوس ۷۳
۳-۳- نتایج ترانسفورماسیون پلاسمید pMA::hyg ۷۳
۳-۴- استخراج پلاسمید pMA::hyg ۷۴
۳-۵- نتایج طراحی پرایمرها ۷۵
۳-۶- بهینه‌سازی شرایط PCR ۷۷
۳-۷- تکثیر ژن *strR* با کمک PCR ۷۸
۳-۸- تأیید ژن *strR* با استفاده ازتکنیک Nested-PCR ۷۹
۳-۹- تأیید ژن *strR* با تکنیک PCR-RFLP ۸۰
۳-۱۰- نتایج ایجاد جهش حذفی بر روی ژن *strR* ۸۱

عنوان | صفحه

۳-۱۱- خالص‌سازی نمونه‌های DNA از ژل ۸۲
۳-۱۲- واکنش الحاق ۸۴
۳-۱۳- پلاسمیدهای pSP*strR* ، pSM*strR* و pSPMΔ*strR* ۸۴
۳-۱۳-۱- ترانسفورماسیون پلاسمیدهای pSP*strR*، pSM*strR* و pSPMΔ*strR* ۸۵
۳-۱۳-۲- نتایج استخراج پلاسمیدهای pSP*strR*، pSM*strR* و pSPMΔ*strR* ۸۶
۳-۱۳- ۳- تأیید ساختار پلاسمیدها با استفاده از PCR ۹۰
۳-۱۴- استخراج وکتور pMT3206 از استرپتومایسس سیلیکالر pMT3206 ..... ۹۱
۳-۱۵- ترانسفورماسیون وکتور pMT3206 به استرپتومایسس گریزئوس ۹۱
۳-۱۶- استخراج وکتور pMT3206 از استرپتومایسس گریزئوس ترانسفورم شده با این وکتور ۹۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- بحث ۹۳
۴-۲- مقدمه ۹۳
۴-۳- طراحی پرایمر جهت PCR ژن *strR* و Soeing PCR ۹۴
۴-۴- ایجاد جهش زایی در جایگاه خاص با استفاده از روش Soeing PCR ۹۶
۴-۵- نواحی حفاظت شده در پروتئین StrR و پروتئین‌های مشابه آن ۹۷
۴-۶- بررسی نتایج حاصل از حذف ناحیه ۵۱ جفت بازی از ژن *strR* ۹۸
۴-۷- کلونینگ ژن *strR* و Δ*strR* ۹۸
۴-۸- وکتورهای pSP*strR* ، pSM*strR* و pSPMΔ*strR* ۱۰۰
۴-۹- دلایل موفقیت آمیز بودن انتقال وکتور pMT3206 با اشاره به سدهای محدودیتی موجود در استرپتومایسس گریزئوس ۱۰۰
۴-۱۰- نتایج کلی ۱۰۱
۴-۱۱- پیشنهادات ۱۰۲
پیوست شماره ۱: توالی ناحیه پروموتری ژن *strR* ۱۰۴
پیوست شماره ۲: شماره دسترسی و توالی نوکلئوتیدی ژن *strR* با طول ۱۰۵۳ جفت باز به همراه توالی اسیدآمینه پروتئین StrR ۱۰۴
منابع و مآخذ ۱۰۶

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱: طبقه‌بندی اکتینومیست‌ها ۲

جدول ۱-۲: گونه‌های مهم تولید کننده استرپتومایسین و مقاوم به استرپتومایسین ۲۱

جدول ۱-۲: فرمول محیط کشتGYM ۳۲

جدول ۲-۲: فرمول محیط کشت YEME ۳۳

جدول ۲-۳: فرمول محیط کشت LB ۳۴

جدول ۲-۴: فرمول محیط کشت SPMR ۳۴

جدول ۲-۵: غلظت آنتی‌بیوتیک برای انتخاب سویه‌های مقاوم ۳۵

جدول ۲-۶: پرایمرها و مشخصات آن‌ها ۴۲

جدول ۲-۷: مواد و مقدار مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از آنزیم*SmarTaq* پلیمراز ۴۶

جدول ۲-۸: مواد و مقدار مورد نیاز برای یک PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از آنزیم *pfu* پلیمراز . ۴۷

جدول ۲-۹: مواد و مقدار مورد نیاز برای Soeing PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از آنزیم *pfu* پلیمراز ۴۹

جدول۲-۱۰: بافر P ۵۹

جدول۲-۱۱: Trace element solution ۵۹

جدول ۲-۱۲: دستگاه‌های مورد استفاده ۶۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: طبقه‌بندی خانواده استرپتومایسس ۳
شکل ۱-۲: چرخه زندگی استرپتومایسس گریزئوس ۴
شکل ۱-۳: ساختار شماتیک کروموزوم استرپتومایسس گریزئوس ۱۰
شکل ۱-۴: تلومر استرپتومایسس گریزئوس ۱۲
شکل ۱-۵: مدل آبشار تنظیمی فاکتورA که منجر به آغاز بیوسنتز استرپتومایسین می شود ۱۵
شکل ۱-۶: جایگاه های اتصال AdpA به نواحی ۲۷۰- و ۵۰- فرادست ژن *strR* ۱۵
شکل ۱-۸: ساختار شیمیایی استرپتومایسین ۲۱
شکل ۱-۹: مسیر بیوسنتز استرپتومایسین ۲۲
شکل ۲-۱: نقشه ژنتیکی وکتورpMT3206 ..... ۳۰
شکل ۲-۲: نقشه ژنتیکی وکتور pMA::hyg ۳۱
شکل ۲-۳: دستگاه فیلتر تیوب برای تهیه ذخیره اسپور ۳۶
شکل ۲-۴: قسمتی از توالی ژن *strR* به همراه پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و جایگاه‌های برش آنزیمی تعبیه شده در این پرایمرها ۴۴
شکل ۲-۵: جایگاه پرایمرهای Soeing به همراه موقعیت ناحیه حذف شده؛ در قسمت پایین ناحیه همپوشان پرایمرهای داخلی نشان داده شده است ۴۵
شکل ۲-۶: مراحل Soeing PCR ۵۰
شکل ۲-۷: Restriction Map بخشی از توالی ژن *strR* تکثیر شده توسط جفت پرایمرهای SP_1F وSP_2R با ۲ جایگاه برش برای آنزیم *Nla*III ۵۲
شکل ۲-۸: Restriction Map بخشی ازتوالی ژن *strR* دچار حذف توسط پرایمرهای SP_1F وSP_2R با یک جایگاه برش برای آنزیم *Nla*III ۵۳
شکل ۳-۱: اسپورهای استرپتومایسس روی محیط کشت GYM ۷۱
شکل ۳-۲: کشت حاصل از سوسپانسیون اسپور استرپتومایسس بر روی محیط کشت GYM ۷۲
شکل ۳-۳: DNA ژنومی استخراج شده از استرپتومایسس گریزئوس با روش CTAB ۷۳

عنوان | صفحه

شکل ۳-۴: کلونی‌های *E. coli* XL1-Blue ترانسفورم شده با وکتور pMA::hyg ۷۴

شکل۳-۵: نمونه‌های I و II پلاسمید pMA::hyg استخراج شده از *E. coli* XL1-Blue می‌باشند ۷۴

شکل ۳-۶: طراحی پرایمرهای مناسب جهت تکثیر ژن *strR* با استفاده از نرم‌افزار Oligo ۷۵

شکل۳-۷: طراحی Soeing پرایمر جهت تکثیر قطعه ۳۰۸ جفت‌بازی سمت چپ ژن *strR* با استفاده از نرم‌افزار Oligo ۷۶

شکل۳-۸: طراحی Soeing پرایمر جهت تکثیر قطعه ۷۸۵ جفت‌بازی سمت راست ژن *strR* با استفاده از نرم‌افزار Oligo ۷۷

شکل۳-۹: تکثیر ژن *strR* از استرپتومایسس گریزئوس توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی SP_1F و SP_2R ۷۹

شکل۳-۱۰: تأیید ژن *strR* توسط Nested-PCR و با استفاده از پرایمرهای SP_1F و SP_2R ۸۰

شکل۳-۱۱: نتایج RFLP محصولات PCR ژن *strR* با آنزیم محدودکننده *Nla*III ۸۱

شکل۳-۱۲: محصولات Soeing PCR ژن *strR* سویه PTCC1127 ..... ۸۲

شکل۳-۱۳:خالص‌سازی محصولات PCR و پلاسمید pMA::hyg ۸۳

شکل۳-۱۴: خالص‌سازی محصولات Soeing PCR ۸۴

شکل۳-۱۵: کلونی‌های *E. coli* XL1-Blue ترانسفورم شده با پلاسمیدهای جدید ۸۵

شکل۳-۱۶: پلاسمیدهای جدید استخراج شده از باکتری *E. coli* XL1-Blue ۸۶

شکل۳-۱۷: نقشه ژنتیکی پلاسمید نوترکیب pSP*strR* ۸۷

شکل۳-۱۸: نقشه ژنتیکی پلاسمید نوترکیب pSM*strR* ۸۸

شکل۳-۱۹: نقشه ژنتیکی پلاسمید نوترکیب pSPM Δ*strR* ۸۹

شکل۳-۲۰: تأیید انجام کلونینگ ژن *strR* و Δ*strR* در وکتور pMA::hyg به وسیله PCR و با استفاده از پرایمرهای SP_1F و SP_2R پس از استخراج از باکتری *E. coli* XL1-Blue ۹۰

شکل۳-۲۱: وکتور pMT3206 استخراج شده از استرپتومایسس سیلیکالر pMT3206 ..... ۹۱

شکل۳-۲۲: کلونی‌های استرپتومایسس گریزئوس ترانسفورم شده با وکتور pMT3206 بر روی محیط کشت انتخابی SPMR ۹۲

شکل۳-۲۳: نتایج استخراج وکتور pMT3206 از استرپتومایسس گریزئوس PTCC1127 ..... ۹۲

شکل۴-۱: توالی اسید آمینه‌ای StrR و Spo0J که با clustal W ردیف شده اند ۹۸

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

۱-۱- اکتینومیست‌ها[1]

اکتینومیست‌ها باکتری‌های گرم مثبت، غیرمتحرک، فاقد کپسول و رشته‌ای هستند که به شکل عناصر کوکوئید و باسیلی تفکیک می‌شوند، از این جهت «باکتری‌های شبه قارچ» یا «باکتری‌های پیشرفته» نیز نامیده می‌شوند. بر مبنای یک دیدگاه قدیمی این گروه حالت واسطه بین باکتری و قارچ هستند. اما چندین ویژگی این باکتری ها را از قارچ‌ها متمایز می‌کند. از جمله این ویژگی‌ها، نداشتن غشای هسته،وجود ترکیب مورامیک اسید[2] و نداشتن کیتین و گلوکان در دیواره سلولی، مهار رشدتوسط داروهای ضد باکتریایی معمول و عدم تأثیر داروهای ضد قارچی بر علیه آن‌ها، آلوده شدن آنها با فاژها(اکتینوفاژها)، داشتن کلونی‌های باکتریایی و داشتن میسلیوم‌های نازک و رشته‌هایی مشابه سایر رشته‌های باکتریایی می‌باشد(۱، ۲).

---

1. *Actinomycets*
2. Muramic acid

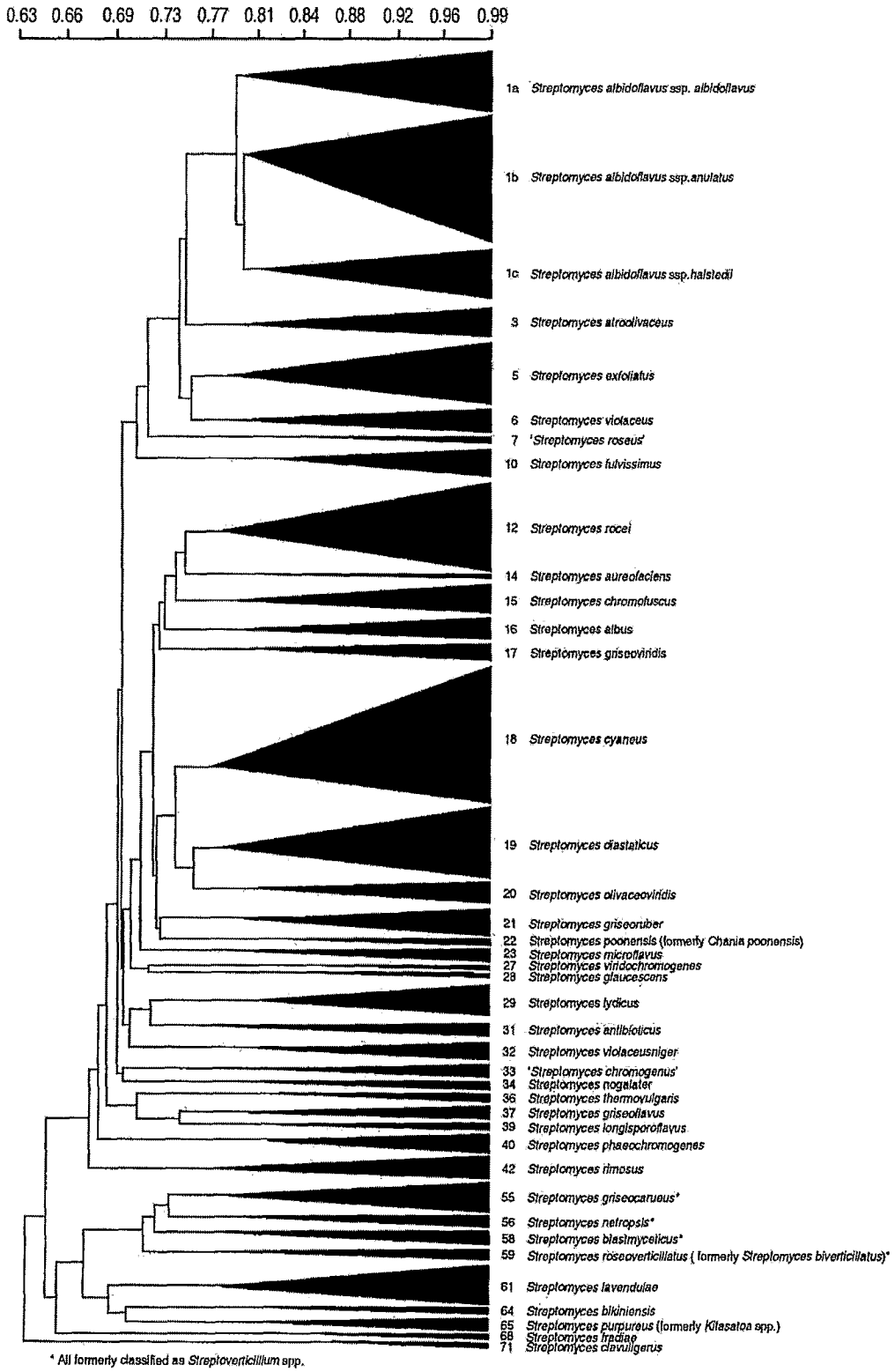
جدول۱-۱: طبقه‌بندی اکتینومیست‌ها

اکتینومیست‌ها	هوازی	نوکاردیا
		استرپتومایسس
	غیر هوازی	اکتینومایسس

طبقه‌بندی اکتینومیست‌ها در جدول ۱-۱ آمده است. جنس‌های مهم اکتینومیست‌ها از جنبه پزشکی شامل نوکاردیا، استرپتومایسس و اکتینومایسس هستند. برخی از اکتینومیست‌ها اسیدفاست[1] بوده و اغلب آن‌ها دارای زندگی آزاد هستند و در خاک زندگی می‌کنند.گونه‌های غیرهوازی اکتینومیست‌ها، فلور طبیعی دهان هستند. برخی از گونه‌های هوازی یافت شده در خاک ، در انسان و حیوانات ایجاد بیماری می‌کنند مثل اکتینومایسس بوویس[2] (ایجاد اکتینومایکوز[3])، نوکاردیا کاویا[4] (ایجاد نوکاردیوز[5])، استرپتومایسس سومالینسیس (ایجاد اکتینومایکوتیک میستوما[6])(۱).

اکتینومیست‌ها بسیاری از ترکیبات فعال زیستی به‌ویژه متابولیت‌های ثانویه از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، داروهای ضدسرطان، علف‌کش‌های طبیعی و عوامل سرکوب‌کننده سیستم ایمنی را تولید می‌کنند(۳، ۴). به علاوه این گروه از باکتری‌ها به دلیل فعالیت پایین پروتئازهای خود، بیان سریع و بالا، داشتن ظرفیت بالا برای ترشح پروتئین و مزایای محصولات تولید شده توسط آن‌ها از قبیل محلول بودن پروتئین و امکان ایجاد پیوندهای دی‌سولفیدی صحیح به عنوان میزبانی مناسب برای تولید و ترشح پروتئین‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند(۵).

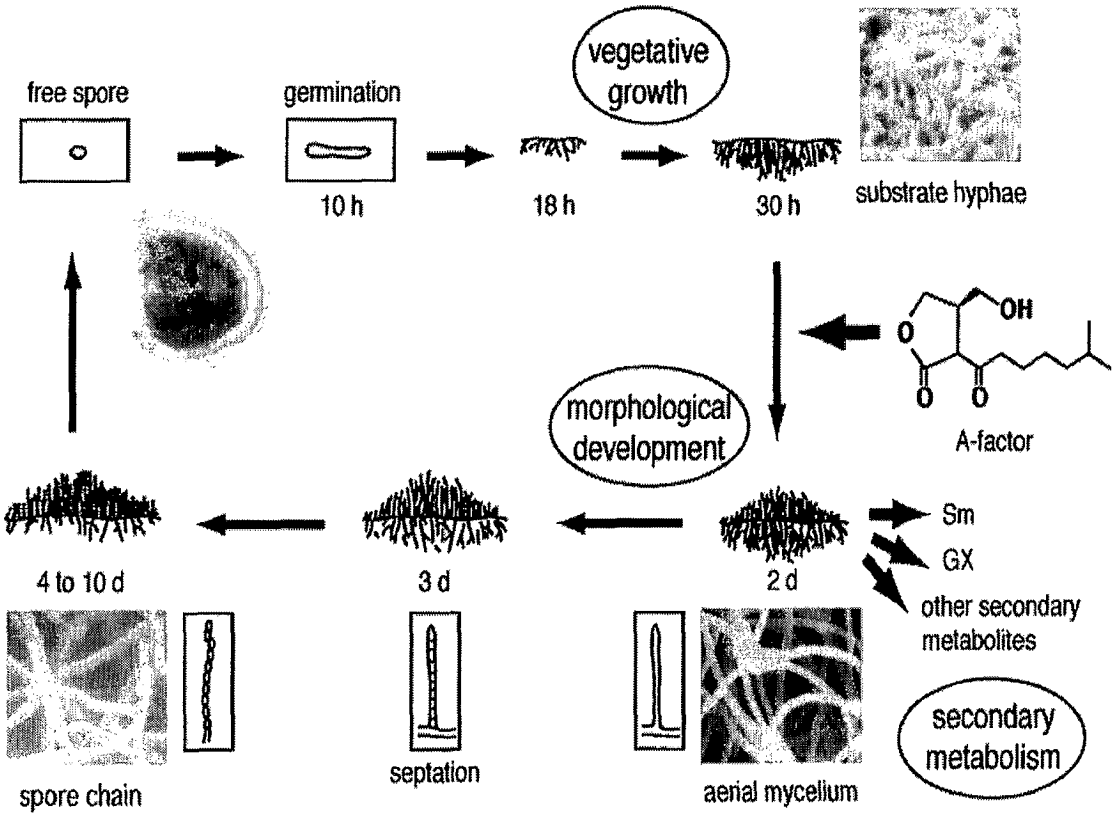
1. Acid fast
2. *Actinomyces bovis*
3. Actinomycosis
4. *Nocardia caviae*
5. Nocardiosis
6. *Actinomycotic mycetoma*



شکل ۱-۱: طبقه‌بندی خانواده استرپتومایسس(٦)

۱-۲- خانواده استرپتومایسس

استرپتومایسس‌ها باکتری‌های هوازی گرم مثبت و خاکزی هستند. این باکتری‌ها به صورت رشته‌های چند سلولی و شاخه‌دار رشد کرده و در پاسخ به عوامل محیطی متحمل تغییرات فیزیولوژکی و مورفولوژیکی می‌شوند. به این‌ترتیب که بر روی محیط آگار، ابتدا یک یا چند هیف سوبسترا از یک اسپور زاینده به‌وجود آمده واز نوک هیف با گسترش دیواره سلولی به سرعت رشد می‌کنند. رشد نمایی از طریق شاخه‌دار شدن هیف‌ها شروع شده و منجر به ایجاد یک شبکه پیچ در پیچ ازهیف‌ها می‌شود. اولین مرحله از تمایز مورفولوژیکی پدیدار شدن هیف‌های هوایی است که مواد مورد نیاز خود از قبیل پروتئین، اسیدهای نوکلئیک و ترکیبات ذخیره‌ای را از هیف سوبسترا گرفته و در این هنگام هیف سوبسترا از بین می‌رود. سپس دیواره‌سازی در هیف‌های هوایی همزمان با هم ادامه یافته تا زنجیره‌هایی از بخش‌های واحد از نظر ژنتیکی[1] ایجاد کنند. این اجزا بوسیله دیواره‌های ضخیم از یکدیگر جدا می‌شوند(شکل ۱-۲) (۷، ۸).



شکل ۱-۲: چرخه زندگی استرپتومایسس گریزئوس[2](۷)

1. Unigenomic compartments
2. *Streptomyces griseus*