فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۳۷- ۴۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

افزایش تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید با ایجاد گونه‌های *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تراریخت واجد ژن *claR*

مریم کی: دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، ایران، maryam_kay2001@yahoo.com
زهره حجتی*: استادیار ژنتیک، دانشگاه اصفهان، ایران، z.hojati@sci.ui.ac.ir
مجید متولی باشی: دانشیار ژنتیک، دانشگاه اصفهان، ایران، mbashi@sci.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: کلاولانیک‌اسید از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مهار کننده‌ی β لاکتاماز بوده که توسط *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تولید می‌شود. کلاولانیک‌اسید در ترکیب با سایر آنتی‌بیوتیک‌های قوی و حساس به β لاکتاماز مورد استفاده بالینی قرار می‌گیرد. ژن *CalR* از جمله ژن‌هایی بوده که نقش مهمی در تنظیم تولید کلاولانیک‌اسید ایفا نموده و به منظور بیان ژن‌های اواخر مسیر بیوسنتز کلاولانیک‌اسید مورد نیاز است.

مواد و روش‌ها: کانسترک نوترکیب pMTclaR حاوی ژن تنظیمی *claR* از دانشگاه اصفهان تهیه و به منظور استفاده، از سویه *استرپتومایسس لیویدنس* با استفاده از روش لیز قلیایی استخراج شد. به منظور انجام ترانسفورماسیون پروتوپلاست از باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تهیه و در مرحله بعد با استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول در سویه *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* ترانسفورم شد. با استفاده از استخراج پلاسمید و انجام PCR ترانسفورماسیون تأیید شد. در نهایت به منظور بررسی نحوه تأثیر ژن *claR* اضافه شده از روش بایواسی استفاده شد.

نتایج: کلونی‌های گچی حاصل از رشد *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* ترانسفورم شده بر روی محیط GYME حاوی آنتی‌بیوتیک مشاهده شد که تأیید انجام ترانسفورماسیون است. از سویه ترانسفورم شده پلاسمید استخراج و ساختار آن توسط ژل الکتروفورز تأیید شد. با استفاده از پلاسمید استخراج شده و پرایمرهای اختصاصی *claR* واکنش PCR انجام و باند ۱۳۳۴ جفت‌بازی مشاهده شد. در نهایت با انجام روش بایواسی و مشاهده‌ی هاله عدم رشد در نمونه ترانسفورم شده و مقایسه آن با نمونه کنترل مشخص شد که حضور پلاسمید نوترکیب سبب افزایش ۳/۳ برابری تولید کلاولانیک‌اسید در سویه *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* شده است.

بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، با انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن*claR* میزان تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید تا ۲/۵ برابر افزایش یافت. با توجه به اهمیت دارویی کلاولانیک‌اسید ایجاد سویه‌هایی که توانایی تولید بیشتر کلاولانیک‌اسید را داشته باشند می‌توانند به بومی‌سازی تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید با صرفه اقتصادی بیشتر درمقیاس صنعتی کمک شایانی نماید.

واژه‌های کلیدی: *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*، کلاولانیک اسید، بایواسی، پلاسمید pMTclaR، ژن *claR*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

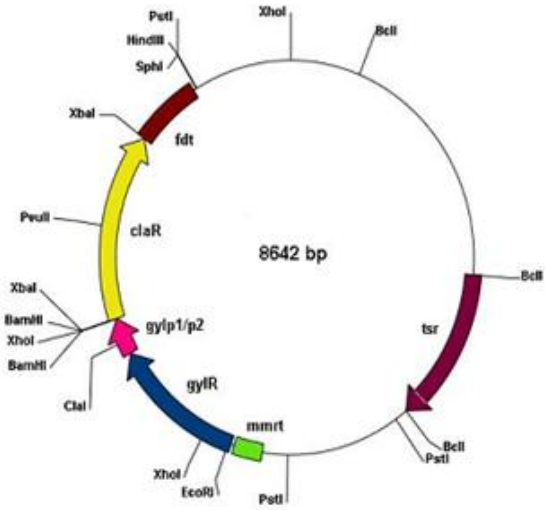
اکتینومیست‌ها از باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت بوده که تولید کننده دو سوم متابولیت‌های ثانویه با فعالیت زیستی گسترده هستند. در میان اکتینومیست‌ها اعضای جنس استرپتومایسس‌ها بیش از ۷۰ درصد متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند(۱). این دسته از باکتری‌ها قادرند با تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک خارج سلولی، بسیاری از ترکیبات از جمله قندها، الکل‌ها، اسیدهای آمینه و ترکیبات آروماتیک را متابولیزه کنند (۲). استرپتومایسس‌ها به علت داشتن کروموزوم خطی بزرگ در میان باکتری‌ها ساختار ژنتیکی غیر معمول را نشان می‌دهند (۳). استرپتومایسس‌ها واجد دسته‌ای از ژن‌های تنظیم کننده تولید آنتی‌بیوتیک و اسپورزایی هستند. در این بین *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*[1] تولیدکننده تعدادی از ترکیبات β لاکتام از قبیل سفامایسین C و کلاولانیک‌اسید است(۴). مهم‌ترین دسته آنتی‌بیوتیک‌ها، β لاکتام بوده که برای درمان انواع آلودگی‌های باکتریایی استفاده می‌شود. β لاکتام با آنزیم‌های دخیل در مراحل نهایی بیوسنتز دیواره سلولی واکنش داده و موجب مهار سنتز پپتیدوگلیکان می‌شود. با توجه به این موضوع که این واکنش در میان یوکاریوت‌ها جایی ندارد، سمیت این آنتی‌بیوتیک‌ها برای موجودات عالی مانند انسان به شدت پایین بوده، در نتیجه به طور وسیع استفاده می‌شوند (۵ و ۶). کلاولانیک‌اسید نخستین مهار کننده β لاکتاماز بوده که مورد استفاده بالینی قرار گرفته و مصرف آن از سال ۱۹۸۱ آغاز شده است (۴). این آنتی‌بیوتیک به طور گسترده توسط سویه *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* تولید می‌شود. اگرچه کلاولانیک‌اسید فعالیت ضد باکتریایی ضعیفی داشته ولی مهار کننده قوی طیف وسیعی از آنزیم‌های β لاکتاماز است. در نتیجه به همراه سایر آنتی‌بیوتیک‌های قوی و حساس به β لاکتاماز استفاده می‌شود. محصول تجاری آگمنتین (کوآموکسی کلاو) از تلفیق کلاولانیک‌اسید با آموکسی‌سیلین و محصول تجاری تیمنتین از تلفیق کلاولانیک‌اسید با تیکارسیلین به‌دست می‌آید (۴، ۶ و ۷). حدود ۲۳ ژن در مسیر بیوسنتز کلاولانیک‌اسید دخالت داشته و مسئول بیوسنتز، انتقال و تنظیم تولید کلاولانیک‌اسید هستند (۸). در این میان، ژن *CalR* از جمله ژن‌هایی است که نقش مهمی در تنظیم تولید کلاولانیک‌اسید ایفا می‌کند. ژن *ClaR* با طول ۱۲۹۹ جفت باز غنی از CG بوده و یک فعال کننده رونویسی مسیر بیوسنتز کلاولانیک‌اسید را تولید می‌کند. پروتئین تنظیمی ClaR مولکول فعال کننده اختصاصی مسیر بیوسنتز کلاولانیک‌اسید بوده که به منظور بیان ژن‌های اواخر مسیر بیوسنتز کلاولانیک‌اسید مورد نیاز است(۹). سویه وحشی توان تولید انبوه یک محصول که توجیه کننده منافع اقتصادی و تجاری باشد را ندارد. با اصلاح سویه و تولید سویه‌های بهبود یافته با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک می‌توان به هدف تولید اقتصادی یک محصول دست یافت(۴). در این راستا در ابتدا سازه نوترکیب ساخته شده حاوی ژن *ClaR* استفاده شد. به منظور انتقال سازه‌های نوترکیب می‌توان از روش‌های مختلفی استفاده کرد. ترانسفورماسیون یکی از روش‌های پرکاربرد در انتقال پلاسمید به سویه‌های باکتریایی است. کارایی ترانسفورماسیون با استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول[2] به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد. این مولکول موجب

الحاق غشاهای سلولی برای انتقال DNA به سلول می‌شود (۱۰). به علت حضور سیستم‌های محدود کننده، کارایی ترانسفورماسیون در استرپتومایسس به شدت کاهش می‌یابد. به این منظور در ابتدا پلاسمیدهای نوترکیب به سویه حد واسط *استرپتومایسس لیویدنس*[۳] منتقل شده تا شرایط به منظور ترانسفورماسیون در سویه اصلی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* فراهم شود. در این پژوهش سعی شده است که کانسترکت نوترکیب حاوی ژن *ClaR* به سویه اصلی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* ترانسفورم شده و میزان تأثیر آن در تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید با روش بایواسی[۴] بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه سازه نوترکیب: پلاسمید pMT3206 حاوی ژن *ClaR* کلون شده در دانشگاه اصفهان تهیه شد. این پلاسمید در سویه باکتریای *استرپتومایسس لیویدنس* ترانسفورم شده تا بتوان برای ترانسفورماسیون در *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* استفاده کرد. این سازه یک ناقل بیانی ویژه استرپتومایسس است که از یک پروموتر القایی قوی GylP1/P2 و همچنین، رپرسور آن تشکیل شده است. به منظور استفاده، پلاسمید مورد نظر از باکتری *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج و استفاده شد.

تهیه پروتوپلاست: به منظور تهیه پروتوپلاست از روشی که توسط اوکانیشی[۵] و همکارانش در سال ۱۹۷۴ ارئه شد استفاده شد. به این منظور ۱ سی‌سی از اسپور استرپتومایسس درون محیط YEMEG کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت رشد ساکارز ۱۰/۳ به باکتری‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ انجام شد. مرحله شستشوی باکتری‌ها با ساکارز ۱۰/۳ درصد دو بار تکرار شد. به رسوب حاصله ۴ میلی‌لیتر محلول لیزوزیم اضافه شده و در حمام بن ماری ۳۰ درجه سانتی‌گرادی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. پس از این مدت، ۵ میلی‌لیتر بافر P به محلول اضافه کرده و برای ۱۵ دقیقه دیگر در شرایط قبل انکوبه شد. پروتوپلاست‌ها با استفاده از فیلتر کتانی، فیلتر و به مدت ۷ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. رسوب حاصله به آرامی در ۱ میلی‌لیتر بافر P حل و مجدد سانتریفوژ شد. در پایان رسوب در ۵ میلی‌لیتر بافر P حل شد.



شکل۱- ساختار شماتیک وکتور نوترکیب pMTclaR حاوی ژن *claR*

ترانسفورماسیون: به منظور تسهیل در انجام ترانسفورماسیون از پلی‌اتیلن گلایکول استفاده شد. از آنجایی که غلظت، وزن مولکولی و زمان مجاورت پروتوپلاست‌ها با پلی‌اتیلن گلایکول مهم است، پس از بهینه‌سازی‌های متعدد غلظت ۴۰ درصد از پلی‌اتیلن گلایکول ۱۰۰۰ به کار رفته و هنگام استفاده ۲/۵ میلی‌لیتر بافر P به آن افزوده شد. به منظور انجام ترانسفورماسیون در صورت استفاده از پروتوپلاست‌های

منجمد، آن‌ها را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا زود ذوب شوند. نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پلی‌اتیلن گلایکول ۴۰ درصد و ۲۰ میکرولیتر از نمونه DNA به شکل هم‌زمان به نمونه پروتوپلاست‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۱ دقیقه، ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر P به محلول اضافه شد. نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ و پروتوپلاست‌ها در ۱ میلی‌لیتر از بافر P حل شدند. به منظور بازیابی پروتوپلاست‌های استرپتومایسس کلاولی-جروس از محیط RSM فاقد آنتی‌بیوتیک استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه روی پلیت RSM کشت داده شد. پس از حدود ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و بازیابی کامل پروتوپلاست‌ها، پلیت‌ها به وسیله ۲/۵ میلی‌لیتر محیط سافت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک تایواسترپتون با غلظت ۱ ماکروگرم در هر میلی‌لیتر پوشانده شدند. انکوباسیون به مدت یک هفته دیگر در شرایط قبلی ادامه یافت.

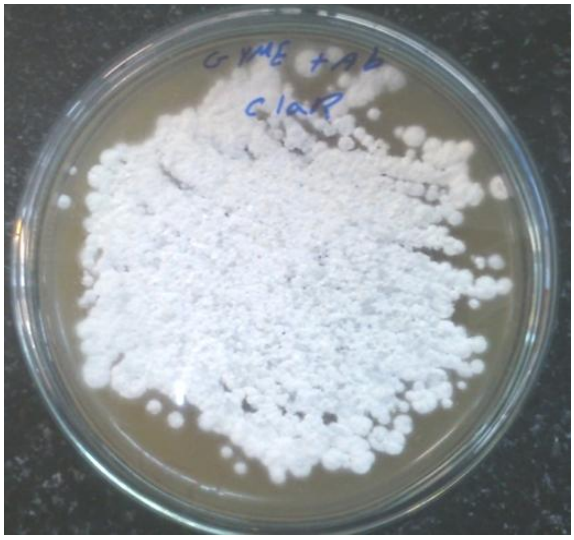
استخراج پلاسمید: به منظور استخراج پلاسمید از روش لیز قلیایی که توسط بیرن‌بویم[۶] و دالی[۷] در سال ۱۹۷۹ ارائه شده بود استفاده شد. به این منظور، اسپور باکتری در محیط YEME به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. محیط کشت حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و به رسوب حاصله ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ حاوی گلوکز، TrisHCl، EDTA و لیزوزیم اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در ادامه محلول حاوی SDS و NaOH اضافه و به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم به ترکیب موجود اضافه و مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل به محلول رویی اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در شرایط مرحله قبل سانتریفوژ شد. فاز آبی رویی برداشته، ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شد. به رسوب به دست آمده ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد. پس از گذشت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی کاملاً تخلیه شد. پس از خشک شدن کامل رسوب، ۲۰۰ میکرولیتر محلول TE حاوی RNase به رسوب اضافه شد.

روش بایواسی: به منظور مشاهده تأثیر *ClaR* در بیان کلاولانیک‌اسید از روش بایواسی استفاده شد. در این روش نمونه‌های اسپور وحشی و موتانت حاوی وکتور بر روی محیط GYME حاوی آنتی‌بیوتیک تایواسترپتون کشت داده می‌شود. به این منظور، در ابتدا رقت یکسانی از اسپورها تهیه و ۳۰ ماکرولیتر از استوک باکتریایی بر روی محیط GYME کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت باکتری کلبسیلا پنمونیا[۸] در محیط TSB کشت داده شد. زمانی که OD_{600} محیط به ۰/۹ تا ۱ رسید ۳/۳ میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری را با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط TSA مایع (دمای حدود ۴۷ درجه) و ۱۰۰ ماکرولیتر پنی‌سیلین G با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاملاً مخلوط و بلافاصله بر روی پلیت‌های حاوی باکتری ریخته شد. هاله عدم رشد باکتری‌های کلبسیلا پنمونیا پس از ۲۴ ساعت مشاهده شد.

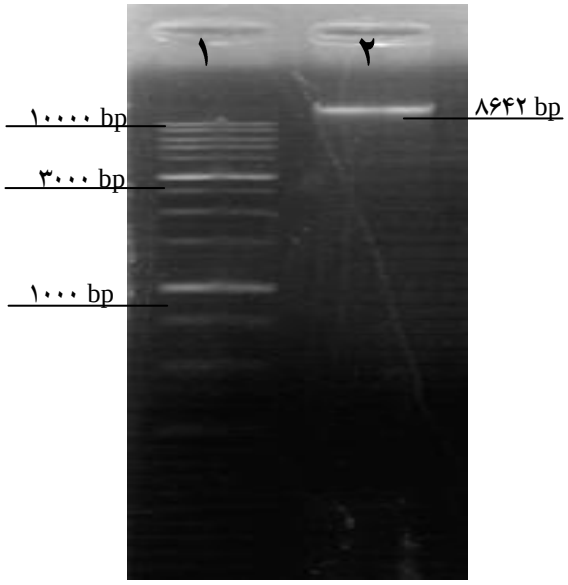
نتایج

سازه نوترکیب pMTClaR حاوی ژن *ClaR* از دانشگاه اصفهان تهیه و به منظور استفاده از سویه *استرپتومایسس لیویدنس* استخراج شد. پلاسمیدهای استخراج شده به منظور انجام ترانسفورماسیون به سویه اصلی *استرپتومایسس لیویدنس* استفاده شد. به منظور تهیه پروتوپلاست، باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* در محیط YEMEG که حاوی گلیسین و گلیسرول بوده و شرایط را به منظور رشد مناسب *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* فراهم آورده، کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت پروتوپلاست تهیه شد. پروتوپلاست‌های تهیه شده به منظور انجام ترانسفورماسیون استفاده شدند. ترانسفورماسیون سویه *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* با استفاده از PEG انجام شد، پس از ۷۲ ساعت آنتی‌بیوتیک به محیط RSM اضافه و به مدت یک هفته در شرایط مناسب انکوبه شد. کلونی‌های گچی *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* بر روی محیط مشاهده شد و بلافاصله بر روی محیط GYME حاوی آنتی‌بیوتیک تایواسترپتون کشت داده شد. کلونی‌ها بر روی محیط رشد کرده و پس از یک هفته اسپورهای خاکستری رنگ بر روی آن‌ها تشکیل شد.

رشد کلونی‌های باکتری در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک خود نشان از تأیید انجام ترانسفورماسیون دارد. اما به منظور تأیید نهایی فرآیند ترانسفورماسیون، استخراج پلاسمید از سویه ترانسفورم شده انجام شد. پلاسمید pMTClaR استخراج شده بر روی ژل ۰.۷ درصد آگاروز برده شده و باند پلاسمیدی با طول ۸۶۴۲ مشاهده شد.



شکل۲- کلونی‌های گچی *استرپتومایسس کلاولی جروس* تراریخت بر روی محیط GYME حاوی آنتی‌بیوتیک



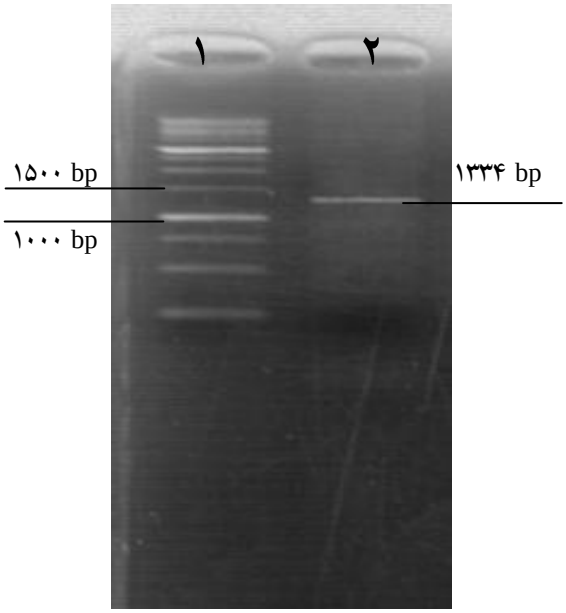
شکل۳- وکتور pMTclaR استخراج شده از استربتومایسس کلاولی‌جروس تراریخت
۱) نشانگر ۱ kb؛ ۲: پلاسمید استخراج شده

پلاسمید استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ClaR*، PCR شد تا حضور ژن *ClaR* درون پلاسمید تأیید شود (جدول ۱). محصول PCR بر روی ژل ۱ درصد برده شد. باند ۱۳۳۴ جفت‌بازی مربوط به ژن *ClaR* مشاهده شد که تأیید کننده حضور ژن در پلاسمید استخراج شده است.

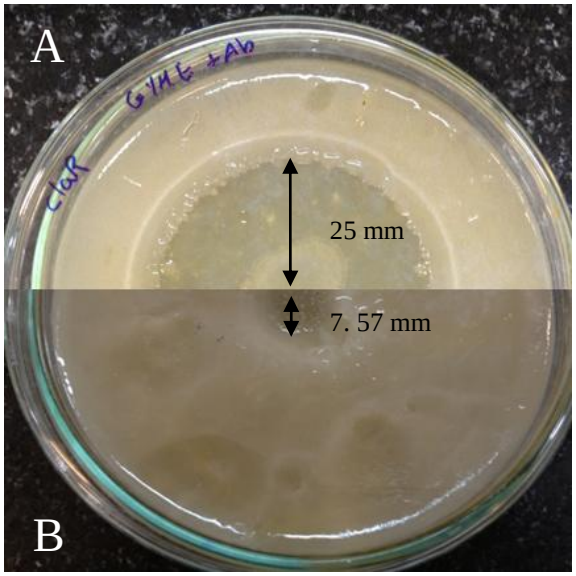
جدول ۱-توالی پرایمرهای مورد استفاده به منظور تکثیر قطعه *claR*

نام پرایمر	توالی پرایمر	طول محصول
claR-F	□ACACGTCTAGATCAGCCGGACATCC3□۵	1334 bp
claR-R	□ACTAGTAGATCTTGCGGAGACCTCATGG3□۵	

به منظور مشاهده تأثیر سازه نوترکیب در میزان تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید روش بایواسی استفاده شد. در این روش، با توجه به انجام آزمون توانایی و میزان برابر اسپور توانمند در هر دو پلیت استفاده شد. ولی با توجه به برابر نبودن غلظت هر دو استوک باکتریایی، تفاوت در قطر رشد اولیه باکتری‌ها دیده شد. میزان هاله عدم رشد در نمونه کنترل و نمونه ترانسفورم شده بررسی شد. با مشاهده هاله عدم رشد و مقایسه آن با نمونه کنترل، مشخص شد که حضور سازه نوترکیب در سویه *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* سبب افزایش بیان و تولید آنتی‌بیوتیک شده است. مطالعات نشان داد که پلاسمید نوترکیب pMTClaR سبب افزایش ۳/۳ برابری تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید در سویه *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* شده است.



شکل ۴-قطعه‌ی تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *claR*
۱: نشانگر kb۱؛ ۲: باند ژن *claR*



شکل ۵- نمایش افزایش میزان تولید کلاولانیک‌اسید در سویه تراریخت A: نمونه تراریخت؛ B: نمونه وحشی

بحث و نتیجه‌گیری

کلاولانیک‌اسید نخستین مهارکننده β لاکتاماز بوده که مورد استفاده بالینی قرار گرفته است. کلاولانیک‌اسید فعالیت ضد باکتریایی ضعیفی داشته اما با توجه به نقش آن در مهار آنزیم‌های β لاکتاماز به همراه سایر آنتی‌بیوتیک‌های قوی استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت دارویی کلاولانیک‌اسید ایجاد سویه‌هایی با قابلیت تولید مقادیر بالای این آنتی‌بیوتیک بسیار حائز اهمیت است. یکی از راه‌های افزایش تولید آنتی‌بیوتیک شناسایی و تکثیر ژن‌های تنظیمی این ترکیب و افزایش تعداد کپی آن‌ها بوده که می‌تواند به افزایش بیان آنتی‌بیوتیک منجر شود. ژن *claR* یکی از ژن‌های کنترل کننده مسیر بیوسنتز کلاولانیک‌اسید بوده که تأثیر آن در افزایش بیان کلاولانیک‌اسید در

مطالعات پیشین نشان داده شده است. در سال ۲۰۰۶ هانگ[۹] و همکارانش با ایجاد کتابخانه ژنومی از DNA *استرپتومایسس کلاولی‌جروس*، به کلون نمودن ژن‌های تنظیمی *claR*، *ccaR* و *afsR* در پلاسمید pIBR25 اقدام و به استرپتومایسس منتقل کردند. به ترتیب میزان تولید کلاولانیک‌اسید توسط پلاسمیدهای تولید شده ۲/۵، ۱/۵ و ۱/۶ برابر افزایش یافت (۱۱). در این تحقیق، به منظور کلون نمودن ژن *claR* برای نخستین بار از وکتور pMT3206 استفاده شد. این وکتور یک وکتور بیانی چند کپی ویژه استرپتومایسس است که واجد پروموتر القایی gylP1/p2 تحت تنظیم گلیسرول و ژن مهار کننده *GylR* است. ژن *GylR* یک رپرسور را می‌سازد که در صورت نبودن گلیسرول از بیان پروموتر القایی gylP1/P2 ممانعت می‌کند. به این ترتیب می‌توان با اضافه کردن گلیسرول، میزان بیان ژن *claR* را افزایش داد. مک‌نیل[۱۰] و همکارانش در سال ۱۹۸۷ از روش الکتروپوریشن به منظور ترانسفورماسیون استفاده کردند (۱۲). روش الکتروپوریشن گرچه ساده و سریع بوده اما کارایی آن نسبت به استفاده از پلی‌اتیلن گلایکول کمتر است. بنابراین، در این تحقیق از پلی‌اتیلن گلایکول استفاده شد. میانکش پلی‌اتیلن گلایکول با پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های سطح غشا سبب تسهیل انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *استرپتومایسس کلاولی‌جروس* می‌شود. در مطالعه حاضر، با انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *claR* میزان تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید تا ۳/۳ برابر افزایش یافت. این نتیجه می‌تواند به بومی‌سازی تولید آنتی‌بیوتیک کلاولانیک‌اسید با صرفه اقتصادی بیشتر درمقیاس صنعتی کمک شایانی نماید.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان برای حمایت مالی (طرح ۹۰/۲۵۶۹۵) تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Dyson P. Streptomyces. *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. UK: Swansea University; 2009.

(2) Hopwood, DA. *Streptomyces in nature and medicine the antibiotic maker*. 1rd ed. USA: Oxford University press; 2007.

(3) Inoue S, Higashiyama K, Uchida T, Hiratsu K, Kinashi, H. Cromosomal circularization in Streptomyces griseus by nonhomologus recombination of deletion ends. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2003; 67(5): 1101-08.

(4) Saudagar PS, Survase SA, and Singhal RS. Clavulanic acid: A review. *Biotechnology Advances* 2008; 26(4): 335-51.

(5) Baggaley KH, Brown AG, Schofield CJ. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. *Natural product reports* 1997; 14(4): 309-33.

(6) Livermore DM. β-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41 (suppl 4): 25-41.

(7) Santos VC, Pereira JB, Haga RB. Stability of clavulanic acid under variable PH, ionic strength and temperature conditions a new kinetic approach. *Biochemical Engineering Journal* 2004; 45(2): 89-93.

(8) Song YJ, Jensen SE, Lee KJ. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 88(3): 659-69.

(9) Perez-Redondo R, Rodriguez-Garcia A, Martin JF, Liras P. The claR gene of Streptomyces clavuligerus encoding a lys R-type regulatory protein controlling clavulanic acid biosynthesis, in linked to the clavulanate-9-aldehyde reductase (car) gene. *Gene* 1998; 12; 211(2): 311-21.

(10) Kuwano T, Shirataki C, Itoh Y. Comparison between polyethylene glycol and polyethylenimine mediated transformation of aspergillus nidulans. *Current Genetics* 2008; 54(2): 95-103 .

(11) Hung TV, Ishida K, Parajuli N. Enhanced clavulanic acid production in Streptomyces clavuligerus NRRL3585 by overexpression of regulatory genes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2006; 11(2): 116-20 .

(12) Macneil DJ. Introduction of plasmid DNA into Streptomyces lividans by electroporation. *FEMS Microbiology letter* 1987; 42(2-3): 239-44.

[1]- *Streptomyces clavuligerus*
[2]- Polyethylene glycol (PEG)
[3]- *Streptomyces lividans*
[4]- Bioassay
[5]- Okanishi
[6]- Birnboim
[7]- Doly
[8]- Klebsiella pneumoniae
[9]- Hung
[10]- Macneil

Increase of Clavulanic acid production by using recombinant *Streptomyces clavuligerus* strain including *claR* gene

Maryam Kay
M.Sc. Student of Genetic, Isfahan University, Iran, maryam_kay2001@yahoo.com
Zohreh Hojati *
Assistant professor of Genetic, Isfahan University, Isfahan, Iran, z.hojati@sci.ui.ac.ir
Majid Motovali-Bashi
Associate professor of Genetic, Isfahan University, Isfahan, Iran, mbashi@sci.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: Clavulanic acid is a major β-lactam antibiotic which is produced by *Streptomyces clavuligerus*. Clavulanic acid is used in combination of strong but sensitive to β-lactamase antibiotics. The *claR* gene has an important role in regulation of clavulanic acid production and is needed for the expression of the genes in final step of clavulanic acid biosynthesis.

Materials and methods: The recombinant construct pMTclaR which contains *claR* gene is obtained from Isfahan University and plasmid extraction was done from *Streptomyces lividans* for next steps. The *Streptomyces clavuligerus* protoplast was prepared and transformation was done by using polyethylene glycol. Transformation was confirmed by plasmid extraction and PCR. Finally, bioassay method was used to survey the effect of extra copy of claR on clavulanic acid production.

Results: The typical chalky white colony of *Streptomyces clavuligerus* was seen on GYME plates containing thiostrepton antibiotic. Plasmid extraction was initially carried out. Furthermore, PCR reaction was done by claR specific primers and the 1334 bp band which was belonging to claR was detected. Finally, the bioassay was done and the diameters of zone of inhibition in control and sample were compared. The results of the bioassay show that amplification of the *claR* gene in multicopy plasmids resulted in a 2.5 fold increase in clavulanic acid production.

Discussion and conclusion: In this study the 3.3 fold increase in clavulanic acid production was obtained by using an expression vector containing *claR*. According to the clinical use of clavulanic acid, production of bacterial strains which are able to produce high level of antibiotic can help significantly in customization of antibiotic production.

Key words: *Streptomyces clavuligerus*, Clavulanic acid, Bioassay, pMTclaR plasmid, *ClaR* gene

* Corresponding author
Received: August 6, 2013 / **Accepted:** November 6, 2013