فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۴۰- ۲۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۰

شناسایی، همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های ژن انتقال‌دهنده هگزوز ٦ (*HXT6*) مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* سویه بومی *IBRC-M30069*

سولماز عزیزی: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، solmazazizi@ymail.com
علیرضا تاری‌نژاد *: دانشیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، atarinejad@yahoo.com
محمد پاژنگ: دانشیار زیست‌شناسی سلولی ملکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، mpazhang@yahoo.com

چکیده

مقدمه: مخمر *ساکارومایسس سروزیه* از جمله مهم‌ترین میکروارگانیسم‌ها برای تولید اتانول است که به‌دلیل کارایی بالای این موجود در جذب و تخمیر قندهای هگزوز است. این گونه مخمر دارای ۲۰ ژن کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده هگزوز است. از میان این خانواده ژنی، هفت ژن *HXT1-HXT7* نقش مهمی در فرایند تولید الکل دارند. پژوهشگران ثابت کردند که با افزایش میزان بیان این ژن‌ها سرعت تخمیر الکلی افزایش و در نتیجه آن میزان تولید اتانول افزایش می‌یابد.

مواد و روش‌ها: جداسازی ژن *HXT6* با پرایمرهای اختصاصی ژن از طریق PCR از *ساکارومیسس سرویزیه* سویه بومی *IBRC-M30069* انجام شد. با انجام لیگاسیون قطعه تکثیریافته به پلاسمید *pGEM-T* کلون و به باکتری *اشرشیا کلای* ترانسفرم شد و تحلیل توالی انجام شد.

نتایج: توالی نوکلئوتیدی چارچوب بازخوانی این ژن به طول ۱۷۱۳ جفت باز است و یک پروتئین با ۵۷۰ اسیدآمینه را رمز می‌کند. براساس تجزیه و تحلیل‌های نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، وزن مولکولی تخمین‌زده‌شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی‌شده پروتئین به‌ترتیب ۶۲/۶۸ کیلودالتون و ۷/۸۹ بود.

بحث و نتیجه‌گیری: توالی پروتئینی به‌دست‌آمده شباهت زیادی با Hxt6p VL31(EGA76254.1) سویه دیگر *ساکارومیسس سرویزیه* موجود در NCBI دارد و از بین ژن‌های انتقال‌دهنده هگزوز، بیشترین شباهت و ارتباط را با *HXT7* دارد و به نظر می‌رسد این‌ها از یک ژن اجدادی در اثر موتاسیون در طی زمان با تغییر کارکرد دومین‌شان حاصل شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، *ساکارومیسس سرویزیه*، ژن *HXT6*، پلاسمید نوترکیب

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

بحران جهانی انرژی و این واقعیت که روزی سوخت‌های فسیلی تمام خواهد شد، از مهم‌ترین دغدغه‌های امروز بشر است. با توجه به رشد جمعیت جهان، مصرف زیاد انرژی، محدودیت منابع نفتی تأمین‌کننده انرژی و افزایش قیمت سوخت، جایگزینی یک منبع انرژی دیگر امری ضروری به شمار می‌رود. تولید اتانول از منابع ارزان‌قیمت به عنوان مکمل و یا حتی جایگزین سوخت‌های فسیلی، ضرورتی انکارناپذیر است. برخلاف سوخت‌های فسیلی، اتانول سوختی پاک و تجدیدپذیر است و به آن به‌عنوان یک سوخت سالم، ایمن و جایگزین توجه شده است (۱ و ۲).

بررسی‌ها نشان می‌دهد فراورده نهایی متابولیسم هگزوزها از جمله گلوکز، فروکتوز و مانوز در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*[1] در شرایط بی هوازی اتانول یا اسید لاکتیک است و اولین مرحله تنظیمی متابولیسم هگزوزها عبور آن‌ها از طریق انتشار تسهیل‌شده و وابسته به پروتئین های انتقال‌دهنده غشایی HXT[2] است. طبق اطلاعات موجود، خانواده انتقال‌دهنده هگزوزها در این گونه مخمر شامل پروتئین های Hxt1p-Hxt17p، Gal2p، Snf3p و Rgt2p است. با افزایش فعالیت این انتقال‌دهنده ها، تجمع اتانول یا اسید لاکتیک در سلول‌ها بیشتر می‌شود (۳). انتقال‌دهنده‌های Hxt1 تا Hxt17 در انتقال گلوکز نقش دارند، Gal2 برای انتقال گالاکتوز، Snf3 و Rgt2 به‌عنوان حسگر گلوکز عمل می‌کنند. این خانواده ژنی الگوی بیان متفاوتی دارند و تنظیم آن‌ها به‌شدت تحت ویژگی کینیتیک انتقال‌دهنده ها است و گلوکز اولین فاکتور کنترل‌کننده بیان است (۴). HXT1- HXT7 جزو مهم‌ترین ناقلین هستند و از نظر متابولیسمی به هم شباهت دارند و با هم در ارتباط هستند (۵). اثر بیان بیشینه این ژن‌ها در مخمرها مطالعه شده است و تولید اتانول را در سویه وحشی مخمر با سویه مهندسی‌شده مقایسه کردند. داده‌های به‌دست‌آمده نشان دادند که تظاهر بیش‌ازحد انتقال‌دهنده‌های هگزوز منجر به افزایش دریافت گلوکز شود. پژوهشگران نشان دادند که با تنظیم‌کردن اولین مرحله مسیر بیوسنتز گلوکز می توان منجر به تجمع اسیدلاکتیک شد، که افزایشی در حدود ۱۵درصد در تولید اتانول در مقایسه با سویه وحشی مشاهده کردند (۶ و ۷).

Hxt6p و Hxt7p یک جفت انتقال‌دهنده هگزوز هستند. شباهت این دو پروتئین به هم خیلی زیاد است و هر دوی آن ها شامل ۵۷۰ اسیدآمینه هستند این دو ژن پشت سر هم روی بازوی راست کروموزوم IV پایین دست HXT3 قرار دارند. شباهت بین آن ها ۹۶ جفت باز قبل از کدون آغاز شروع می‌شود و حضور آن‌ها بدین صورت در اکثر استرین‌های آزمایشگاهی گزارش شده است. Hxt6p میل ترکیبی زیادی با گلوکز دارد و دارای میل ترکیبی زیاد Km=1 Mm برای گلوکز است (۸-۱۰). بیان Hxt6p را همانند Hxt2p و Hxt4p غلظت زیاد گلوکز سرکوب می‌کند و تنها ژنی است که از بین این خانواده ژنی تنظیمات بیان آن را Snf3p کنترل می‌کند (۸).

هدف این پژوهش، کلون ژن *HXT6* با توالی صحیح در داخل وکتور pGEM-T و بررسی آن از نظر ترادف ژنی و آمینواسیدی است؛ همچنین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی توالی پروتئینی به‌دست‌آمده با استفاده از بررسی‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شد و بررسی‌های فیلوژنتیکی با سایر ژن‌های این خانواده انجام شد.

مواد و روش‌ها

مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* سویه بومی *IBRC-M30069* از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و تنوع زیستی ایران تهیه شده است. نژاد Top10 باکتری *اشرشیا کلای*[۳]، مارکر VC 1kb DNA Ladder و آنزیم و بافر T4 DNA لیگاز شرکت ویوانتس[۴]، PCR Master Mix شرکت سیناژن[۵]، سیستم pGEM-T وکتور شرکت پرومگا[۶]، آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین و آغازگرهای

F:5´ATGTCACAAGACGCTGCTAT3´
R:5´CAACTTTCCAGCGTTCTTGA -3'

استفاده شد. محیط کشت اختصاصی[۷] YPD حاوی دکستروز، پپتون و عصاره مخمر از شرکت مرک[۸] تهیه شده بود.

pGEM-T یک پلاسمید خطی با Tی منفرد آویزان انتهایی در انتهاهای ۳ است که به این شکل از حلقوی‌شدن پلاسمید جلوگیری می‌کند و کارایی واکنش لیگاسیون را با فراورده تکثیری PCR تولیدشده باDNA پلیمرازهای معین مقاوم به حرارت که یک A به انتهاهای ۵ آن‌ها اضافه می‌کنند افزایش می‌دهد. این وکتور، یک وکتور high-copy-number است و شامل پروموتورهای T7 و SP6RNA پلیمراز است که در طرفین ناحیه سایت‌های برشی[۹] آن قرار دارند. ناحیه سایت‌های برشی آن هم در داخل ناحیه کدکننده – αپپتید آنزیم β- گالاکتوزیداز واقع شده است.

کشت مخمر ساکارومایسیس سرویزیه: پس از کشت مخمر در محیط اختصاصی YPD حاوی ۱۰ گرم دکستروز، ۲۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم آگار و رشد کلونی‌ها، تک کلونی‌ها با استفاده از لوپ به محیط کشت مایع منتقل شد. سپس به‌مدت ۱ شبانه‌روز در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و از آن جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد.

جداسازی DNA: سوسپانسیون حاصل از کشت مخمرها در محیط کشت مایع YPD ابتدا توسط سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰rpm رسوب داده شد و بر روی رسوب حاصل بافر هارجو[۱۰] که حاوی 2% Triton X-100، 1%SDS، 100 mM NaCl، 10 mM Tris-Hcl(pH 8.0) ، 1 mM EDTA است اضافه شد (۱۱)، تیوب‌ها دو دقیقه در داخل اتانول مطلق سرد (یا منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد) و سپس در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه قرار گرفتند، این مرحله تکرار و ورتکس شد. در ادامه با افزودن کلروفرم، ورتکس و سانتریفیوژ، فاز بالایی به تیوب جدید منتقل شد و بر روی آن اتانول مطلق اضافه شد و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت، DNA مخمر با استفاده از روش‌های رسوب و خالص‌سازی اسیدنوکلئیک خالص شد و در ۵۰-۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و خالص سازی فراورده تکثیری: ابتدا آغازگرهای مناسب به منظور جداسازی ژن *HXT6* با استفاده از توالی موجود در NCBI با کد دسترسی (NM: 001180651.1) طراحی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن مورد نظر از روی DNA و اثبات حضور فیزیکی ژن در وکتور کلونینگ استفاده شد. برای تهیه ۲۰ میکرولیتر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۴ میکرولیتر Master mix ، ۲/۰ میکرولیتر آغازگر رفت، ۲/۰ میکرولیتر آغازگر برگشت و ۵۰ نانوگرم DNA به ۱۴/۶ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. برنامه استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در۹۴

درجه سانتی‌گراد و در ادامه مرحله تکثیر که شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۶۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و درنهایت یک مرحله پایانی شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نیمی از فراورده تکثیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱درصد بارگذاری شدند، تا باندهای تکثیرشده، جدا و تجزیه شوند. پس از آنکه باند مورد نظر مشاهده شد، باقی مانده فراورده تکثیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تاییدشده، خالص‌سازی و رسوب داده شد.

همسانه‌سازی در پلاسمید pGEM-T: برای اتصال دو قطعه DNA، مواد لازم برای ۱۰ میکرولیتر واکنش لیگاسیون شامل ۳۰۰-۱۰۰ نانوگرم (۵/۰ میکرولیتر) پلاسمید pGEM -T، ژن *HXT6* (فراورده تکثیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز خالص‌سازی‌شده) به نسبت ۳ برابر پلاسمید (۹۰۰ نانوگرم یا ۱/۵ میکرولیتر)، بافر-T4× DNA ۲ لیگاز (۵ میکرولیتر) ، ۵ واحد آنزیم T4-DNA لیگاز (۵/۰ میکرولیتر) و ۲/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در تیوب استریل ۵/۰میلی لیتری ریخته شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق و سپس به‌مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

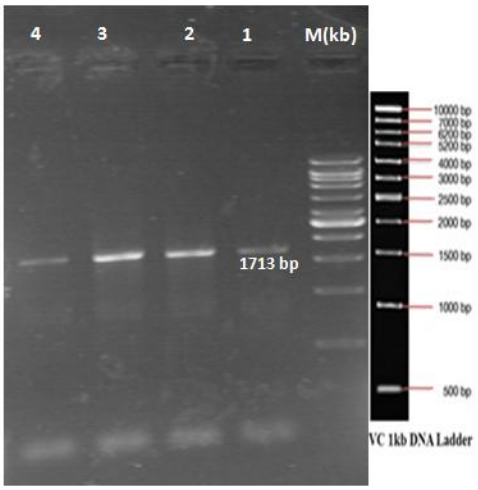
استحاله سلول‌های باکتریایی به‌روش شوک حرارتی: برای استحاله به‌روش شوک حرارتی، ابتدا سلول‌های مستعد باکتری از فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد و محصول واکنش لیگاسیون از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شدند و به‌مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند، سپس نصف محصول واکنش لیگاسیون (۵ میکرولیتر) به ۵۰ میکرولیتر سلول مستعد اشرشیا کلای اضافه شد و به‌آرامی مخلوط شدند و به‌مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها ۴۲ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و به‌سرعت ۲ دقیقه به روی یخ منتقل شدند. در ادامه ۸۵۰ میکرولیتر محیط کشت LBی مایع بدون آنتی‌بیوتیک به نمونه‌ها اضافه شد و به‌مدت یک ساعت با سرعت۱۸۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرارگرفتند. درنهایت حدود ۲۰-۲۰۰ میکرولیتر از سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شد و روی محیط LBی جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب وX-Gal (۵برمو-۴کلرو-۳اینـدول-β-D-گالاکتوپیرانوزید) [11] و IPTG (ایزوپروپیل-β-۱-D-تیوگالاکتوپیرانوز) [12] کشت شدند و به‌مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس کلونی‌های سفیدرنگ با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی آن‌ها تایید شدند و با استفاده از روش استخراج پلاسمید که بیرنبویم و دالی[13] پیشنهاد کردند، استخراج پلاسمید شدند (۱۲). با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دیگری روی پلاسمیدهای استخراج‌شده و تایید آن‌ها، برای توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره‌جنوبی (شرکت ماکروژن) [14] ارسال شدند.

بررسی توالی: ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست‌آمده با استفاده از برنامه‌هایProtParam و ProtScale و ساختار دوم پروتئین به‌وسیله برنامه PSIpred تعیین شد. توالی اسیدآمینه‌ای به‌دست‌آمده به‌منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه بلاست[15] مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) جستجو شد و تعدادی توالی پروتئینی از سویه‌های دیگر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* که بیشترین شباهت را با توالی مد نظر داشتند، انتخاب شدند و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه استفاده

شدند. همچنین بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف Hxt6p و انواع ژن‌های *HXT* با استفاده از نرم‌افزار مگا۴ [۱۶] انجام شد. توالی‌های پروتئینی از سویه‌های دیگر مخمر *ساکاروما یسس سرویزیه* که برای تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه استفاده شدند به همراه شماره دستیابی در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

نتایج

تکثیر DNA ژن *HXT6*: پس از استخراج DNA ژنومی، ژن *HXT6* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در دستگاهPCR تکثیر شد. محصول PCR یک باند ۱۷۱۳ جفت بازی روی ژل آگارز بود که با ژن *HXT6* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مطابقت داشت (شکل ۱).



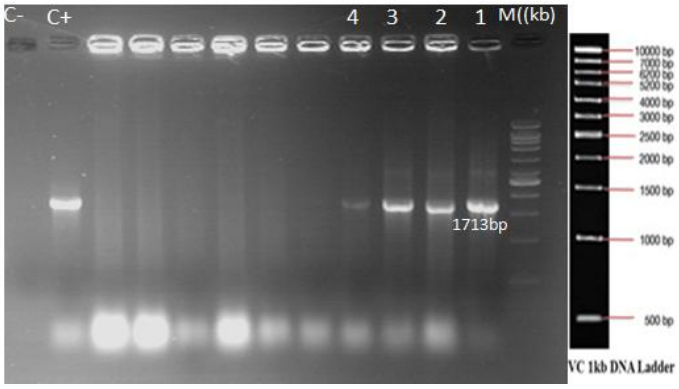
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNAی ژن *HXT6* با آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده، باند ۱۷۱۳ جفت بازی که با اندازه مورد انتظار مطابقت داشت. ۱ ، ۲، ۳ و ۴ چهار تکرار مستقل هستند.M(Kb): مارکر ۱kb.

جدول ۱- میزان یکسانی و شباهت توالی اسیدآمینه‌ای Hxt6p با سایر توالی‌های اسیدآمینه‌ای سویه‌های دیگر مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* استفاده‌شده در تهیه هم‌ردیف‌سازی مقایسه‌ای و ساخت درخت فیلوژنتیکی.

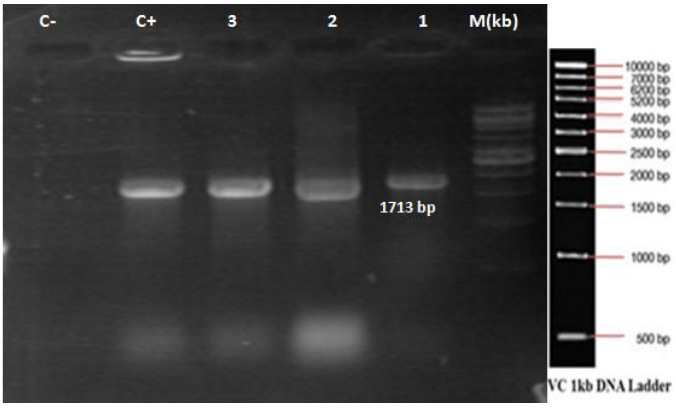
درصد یکسانی	درصد تشابه	نام سویه	نام اختصاصی ژن	شماره دستیابی
۱۰۰	۹۹	*S.c* ROO8	Hxt6p	EWG86690.1
۱۰۰	۹۹	P301 *S.c*	Hxt6p	EWG92005.1
۱۰۰	۹۹	*S.c* S288c	Hxt6p	NP 010630.1
۱۰۰	۹۹	YJM993 *S.c*	Hxt6p	AHY75315.1
۱۰۰	۹۹	*S.c* P283	Hxt6p	EWH19042.1
۱۰۰	۹۹	*S. c* EC118	Hxt6p	CAY78843.1
۱۰۰	۹۹	*S. c* EC118	Hxt7p	CAY78842.1
۱۰۰	۹۹	*S.c* S288c	Hxt7p	NP 010629.3
۱۰۰	۹۹	*S.c* R103	Hxt6p	EWG96635.1
۸۳	۹۹	S.c VL3	Hxt6p	EGA76254.1
۱۰۰	۸۳	*S. c* S288c	Hxt4p	NP 011960.2
۹۹	۷۳	*S. c* S288c	Gal2p	NP 013182.1
۹۸	۷۲	*S. c* S288c	Hxt9p	NP 012316. 1
۹۸	۷۱	*S. c* S288c	Hxt11p	NP 014486.1
۹۸	۷۶	*S. c* S288c	Hxt3p	NP 010632.1

همسانه‌سازی DNA تکثیرشده در پلاسمید pGEM-T: DNA تکثیرشده از واکنش PCR برای ژن *HXT6* پس از خالص‌سازی از روی باقی‌مانده محصول PCR در وکتور pGEM-T کلون شد. در این وکتور غیرفعال‌شدن α-پپتید با واردشدن DNA الحاقی، اجازه شناسایی نوترکیب‌ها (کلونی‌های سفید) را از طریق غربال‌گری سفید-آبی می دهد با استناد به این ویژگی پلاسمید، تعدادی از کلونی های نوترکیب (سفید) انتخاب شد و درستی واکنش لیگاسیون با PCR روی آن کلونی‌ها تایید شد (شکل ۲).

مراحل تایید کلونی‌ها برای حضور ژن پس از استحاله *اشرشیا کلای* با پلاسمید pGEM-T+ HXT6: با توجه به اینکه توالی‌یابی قطعه DNA کلون‌شده برای ژن *HXT6* هنوز مشخص نشده بود، بنابراین تعدادی از کلونی های رشدکرده پس از واکنش استحاله با پلاسمید pGEM-T+ HXT6 برای تایید وجود قطعه کلون‌شده در سه مرحله آزمایش شدند. بدین ترتیب که ابتدا کلونی‌های انتخاب شده به‌روش PCR و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده‌شده در کلونینگ، ارزیابی شدند (شکل ۲). در مرحله دوم، تعدادی از کلونی‌هایی که در PCR مثبت بودند(باند مورد نظر را نشان دادند) برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند. پس از استخراج پلاسمید PCR دیگری روی DNA پلاسمید استخراج شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در کلونینگ انجام شد (شکل ۳).



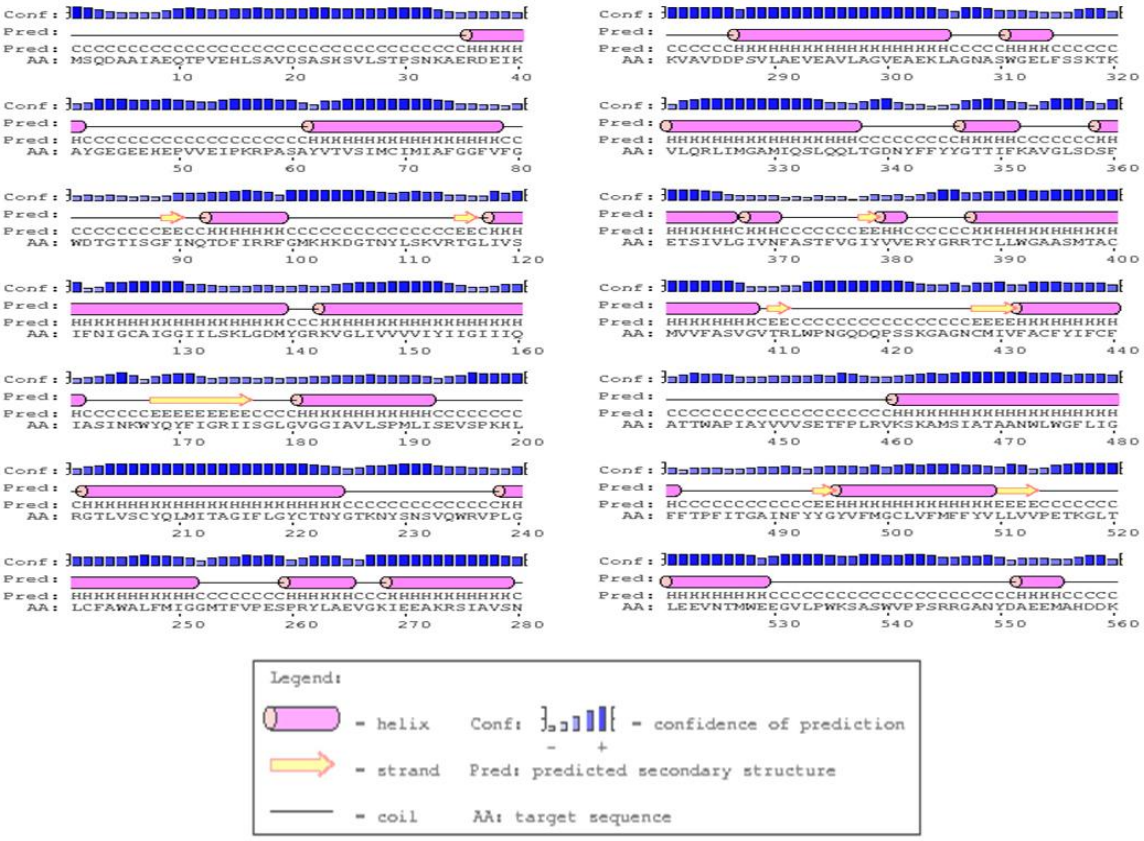
شکل ۲- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از کلونی های نوترکیب رشدکرده روی محیط انتخابی پس از استحاله با محصول لیگاسیون با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *HXT6*، مشاهده باند ۱۷۱۳bp حضور فیزیکی قطعه کلون‌شده در برخی کلونی‌ها را تایید می‌کند. ۱، ۲، ۳ و۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb): مارکر. +C: کنترل مثبت. -C: کنترل منفی.



شکل ۳- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از پلاسمیدهای نوترکیب استخراج‌شده، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *HXT6*، مشاهده باند ۱۷۱۳bp حضور فیزیکی قطعه کلون‌شده در کلونی‌ها را تایید می‌کند. ۱، ۲، ۳ و۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر. -C: کنترل منفی.

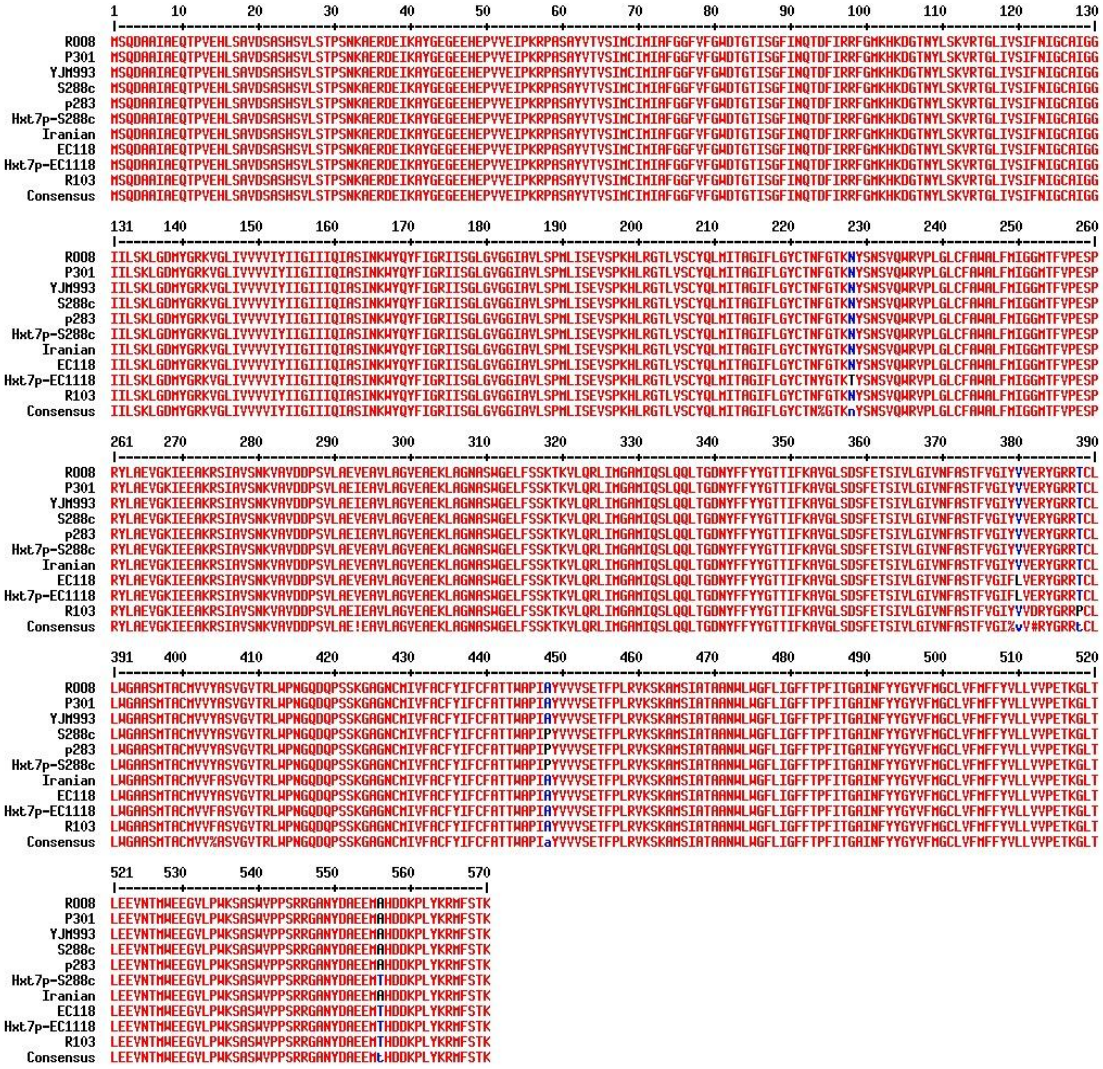
نتایج توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 برای ژن *HXT6* بر روی وکتور pGEM-T نشان دهنده این بود که موقعیت قرارگیری آن روی سایت برشی اختصاصی وکتور در جهت معمولی است و کدون آغاز ATG در سمت T7 قرار دارد و یک پروتئین با ۵۷۰ اسیدآمینه را رمز می‌کند. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی پروتئین به‌دست‌آمده براساس تجزیه و تحلیل‌های نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی و با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه‌شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی‌شده پروتئین Hxt6p با فرمول مولکولی $C_{2880}H_{4430}N_{712}O_{791}S_{31}$، به‌ترتیب برابر ۶۲/۶۸ کیلودالتون و ۷/۸۹ است و شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۷/۰۴ است که در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود. همچنین شاخص Aliphatic (به‌عنوان یک عامل مهم به‌منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه‌عمر این پروتئین در محیط درون‌شیشه‌ای به‌وسیله برنامه ProtParam محاسبه شد که به ترتیب ۹۵/۹۳ و در حدود ۲۰ ساعت بود؛ این مقدار بیانگر پایداری و مقاوم‌بودن پروتئین در برابر حرارت است (۱۳) و از کل اسیدهای آمینه، ۴۴ اسیدآمینه با بار منفی (Asp+Glu) دارد، درحالی‌که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۴۶ است.

بررسی ساختار دوم پروتئین Hxt6p با استفاده از PSIpred نشان داد که این پروتئین حاوی ۸ رشته بتا و ۲۴ مارپیچ آلفا است (شکل ۴).

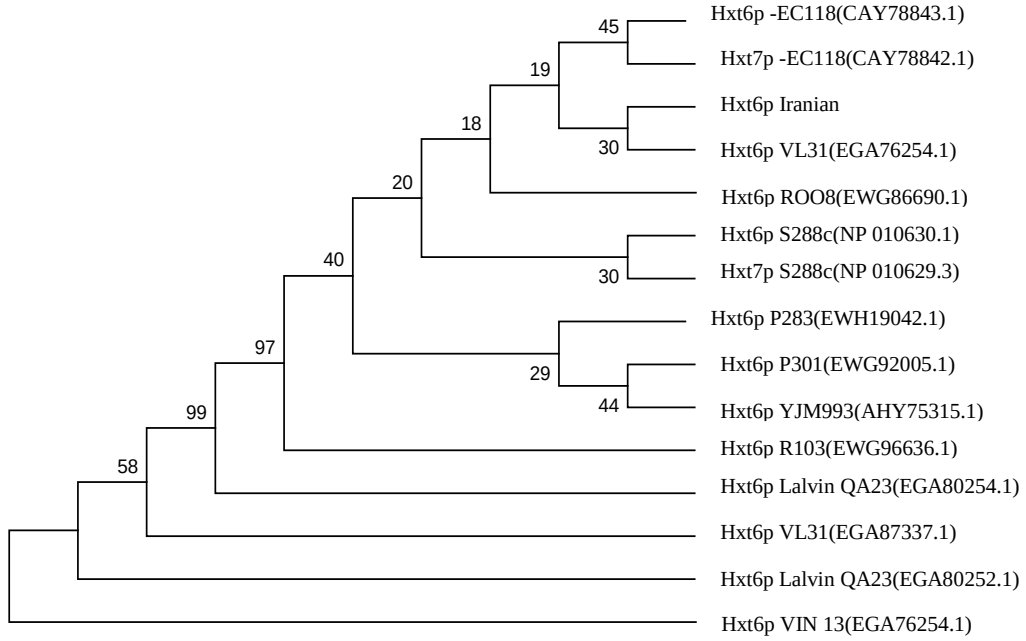


شکل ۴- ساختار دوبعدی Hxt6p با استفاده از برنامه PSIpred.

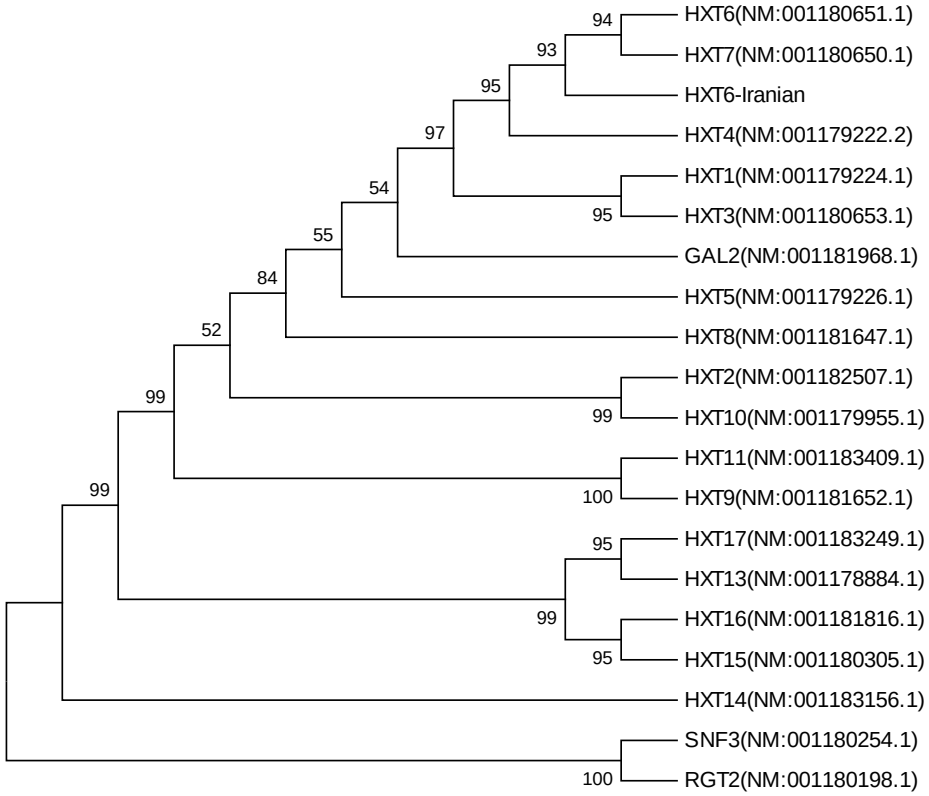
توالی پروتئینی به‌دست‌آمده از Hxt6p با سایر Hxt6p از سویه‌های دیگر مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* که بیشترین شباهت را داشتند انتخاب شدند و با استفاده از برنامه Multialinge مقایسه شدند (جدول ۱) و مشاهده شد که پروتئین به‌دست‌آمده با سویه‌های *S. c ROO8* و *S. c P301* هیچ تفاوتی از نظر توالی اسیدآمینه‌ای ندارد و با سویه‌های *S. c P283* و *S. c S288c* در اسیدآمینه ۴۴۸(Ala/Pro) متفاوت است. همچنین با سویه‌های *S. c EC1118* و *S. c R103* در ۲ اسیدآمینه تفاوت دارد و با Hxt7p از مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* سویه *S. c S288c* و سویه *S. c EC1118* به ترتیب در دو و سه اسیدآمینه تفاوت دارد (شکل ۵). درخت فیلوژنتیکی نیز که با استفاده از نرم‌افزار مگا۴ رسم شده است نشان می دهد پروتئین بررسی‌شده ارتباط بسیار نزدیکی با سایر پروتئین‌های همتای خود در سویه‌های دیگر مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* موجود در NCBI دارد (شکل ۶).



شکل ۵- هم‌ردیفی مقایسه‌ای توالی اسیدآمینه‌ای HXT6 کلون‌شده در وکتور pGEM-T با توالی اسیدآمینه‌ای سایر HXTهای سویه‌های دیگر مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* موجود در NCBI با استفاده از برنامه Multialign. ردیف آخر توالی‌های توافق‌شده را پس از مقایسه نشان می‌دهد.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی به‌روش Neighbor joining، توالی اسیدآمینه‌ای Hxt6p مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* سویه IBRC-M30069 با سایر ژن‌های همتای خود در سویه‌های دیگر ساکارومیسس سرویزیه موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار مگا۴ رسم شد کد دسترسی هر پروتئین در داخل پرانتز آورده شده است.



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی به‌روش Neighbor joining، توالی نوکلئوتیدی ژن *HXT6* مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* سویه IBRC-M30069 با سایر ژن‌های انتقال‌دهنده هگزوز مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار مگا۴ رسم شد. کد دسترسی هر ژن داخل پرانتز آورده شده است.

همچنین به‌منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی آنالیز کلاستر توالی نوکلئوتیدی ژن *HXT6* از مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* IBRC-M30069 با سایر ژن‌های خانواده انتقال‌دهنده‌های هگزوز انجام شد. براین‌اساس مشخص شد ژن *HXT6* توالی‌یابی‌شده بیشترین شباهت و نزدیکی را با ژن‌های *Hxt6p* سویه VL31(EGA76254.1) و *HXT7* سویه *EC1118* دارد و کمترین تشابه را با حسگرهای گلوکز یعنی *SNF3* و *RGT2* دارد (شکل ۷). همچنین نتایج بلاست در سطح پروتئینی نشان داد پروتئین بررسی‌شده با Hxt3p،Hxt4p، Gal2p، Hxt9p و Hxt11p به ترتیب شباهت ۸۳درصد (یکسانی ۱۰۰درصد)، ۷۶درصد (یکسانی ۹۸درصد)، ۷۳درصد (یکسانی ۹۹درصد)، ۷۲درصد (یکسانی ۹۸درصد)، ۷۱درصد (یکسانی ۹۸درصد) دارد (جدول ۱).

بحث و نتیجه‌گیری

بارها این خانواده ژنی روی پلاسمیدهای مختلف کلون‌شده و افزایش تولید اتانول در سویه مهندسی‌شده در مقایسه با سویه وحشی مخمر مشاهده شده است. به‌طور مثال روسی[۱۷] و همکاران از بین انتقال‌دهنده هگزوز *ساکارومیسس سرویزیه* *HXT7* و *HXT1* را کلون و افزایش تولید اتانول را در سویه مهندسی شده مشاهده کردند. در سال ۲۰۱۲ نیز *HXT7*، *HXT1* و *GXS1*، *GXF1* (انتقال‌دهنده زایلوز) از کاندیدا اینترمدیا[۱۸] را به پلاسمید pUPG1 کلون کردند. درنهایت به مخمر MT8-1/XkdXI انتقال دادند و نتیجه کارشان را با پلاسمید کنترل مقایسه کردند. آن‌ها افزایش تولید اتانول را با تقویت برداشت گلوکز و زایلوز مشاهده کردند. این نتایج آشکارا نشان می‌دهند که افزایش بیان انتقال‌دهنده‌ها در مخمر می‌تواند توانایی تولید اتانول را به‌وسیله تسهیل مصرف گلوکز بهبود بخشد (۱۴). در ایران نیز ژن *HXT2* از طریق بهینه‌سازی PCR از *ساکارومایسس سرویزیه* IBRC-M30069 جدا و در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد. این ژن با شماره دسترسی JQ 323554.1 در بانک جهانی ژن ثبت شده است (۱۵).

توالی ژن *HXT6* ابتدا در وکتور پایه pGEM-T کلون شد تا محدوده استفاده ازآنزیم‌های برشی برای کلونینگ افزایش یابد. برای بیان این ژن نیاز به یک پروموتور قوی نظیر پروموتور ADH[۱۹] و پروموتور GAPDH[۲۰] است؛ این پروموتورها باعث افزایش میزان جذب قندهای هگزوز توسط سلول‌های مخمر می‌شود و درنهایت میزان تولید الکل طی فرایند تخمیری را افزایش می‌دهند .

براساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی (هم‌ردیفی مقایسه‌ای، بلاست، درخت فیلوژنتیکی) مشخص شد این پروتئین شباهت زیادی با Hxt6p *ساکارومیسس سرویزیه* سویه‌های دیگر ثبت‌شده در NCBI دارد و این نشان می‌دهد Hxt6p در اکثر سویه‌های *ساکارومیسس سرویزیه* حفظ شده است. همچنین بررسی‌های فیلوژنتیکی *HXT6* با سایر خانواده انتقال‌دهنده‌های هگزوز نشان از تشابه و ارتباط نزدیک *HXT6* با این خانواده ژنی است و از بین آن‌ها بیشترین تشابه را با *HXT7* دارد. این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب و بیان این ژن برای مطالعه آینده است. در این پژوهش با استفاده از روش مهندسی ژنتیک ژن *HXT6* جداسازی و کلون شد. امید است با بررسی بیشتر روی این ژن و سایر ژن‌های این خانواده احتمالاً در آینده مخمر نوترکیب به‌منظور افزایش راندمان تولید الکل طی تخمیر *ساکارومیسس سرویزیه* تهیه شود.

References

(1) Mohseni M., Ebrahimi H. Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from *Saccharomyces*-based fermentation process of alcohol industries in Iran. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (7): 15- 28.

(2) Ahi M., Azin M., Shojaosadati SA., Vasheghani Farahani E., Nosrati M. Optimization of media for bioethanol production by *Pichia stipitis* from sugarcane bagasse pretreated by dilute acid. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 3 (9): 11- 20.

(3) Guillaume C., Delobel P., Sablayrolles JM., Blondin B. Molecular basis of Fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Applied and environmental Microbiology* 2007; 73 (8): 2432- 39.

(4) Ozcan S., Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999; 63 (3): 554- 69.

(5) Perez M., Luyten K., Michel R., Riou CH., Blondin B. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 2005; 5 (4): 351- 361.

(6) Gutierrez-Lomeli M., Torres-Guzman JC., Gonzalez-Hernandez GA., Cira-Chavez LA., Pelayo-Ortiz C., Ramirez-Cordova Jde J. Overexpression of *ADH1* and *HXT1* genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. *Journal of Business.* 2008; 93 (4): 363- 71.

(7) Rossi G., Sauer M., Porro D., Branduardi P. Effect of *HXT1* and *HXT7* hexose transporter over expression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Microbial Cell Factories* 2010; 9 (1): 1- 10.

(8) Liang H., Gaber RF. A novel signal transduction pathway in *Saccaharomyces cerevisiae* defined by *SNF3*- regulated expression of *HXT6*. *Molecular Biology of the Cell* 1996; 7 (12): 1953- 66.

(9) Reifenberger E., Boles E., Ciriacy M. Kineticcharacterization of individual hexose transporters of *Saccaharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry* 1997; 245 (2): 324- 333.

(10) Reifenberger E., Freidel K., Ciriacy M. Identification of novel *HXT* genes in *Saccaharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Molecular Microbiology* 1995; 16 (1): 157- 67.

(11) Harju S., Fedosyuk H., Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Gab. *Bio Med Central Biotechnology* 2004; 21 (4): 4- 8.

(12) Birnboim HC. Doly J. A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research.* 1979; 7 (6): 1513–1523.

(13) Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins MR., Appel RD., Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: John M., Walker, editor. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, NJ: Humana Press. 2005: 571- 607

(14) Takanori T., Tomonori I., Chiaki O., Naoto O., Takayuki O., Akihiko K. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xyloseisomerase pathway. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2012; 114 (2): 209- 11.

(15) Amiri S., Tarinejad A., Sharifi Sirchi Gh. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose transporter gene2 from Iranian *Saccharomyces cerevisiae. Koomesh* 2011; 14 (2):138- 43.

[1]- *Saccharomyces cerevisiae*
[2]- Hexose Transporter
[3]- *Escherichia coli*
[4]- Vivantis
[5]- Cinnagen
[6]- Promega
[7]- Yeast Extra Pepton Dextrose
[8]- Meark
[9]- Multiple Cloning Region
[10]- Harju
[11]-5-bromo-4-chloro-3-indolylβ-D-galactopyranoside
[12]- Iopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
[13]- Birnboim and. Doly
[14]- Macrogen korea
[15]- Pblast
[16]- MEGA4
[17]- Rossi
[18]- *Condida intermedi*a
[19]- Alcohol dehydrogenase
[20]- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Isolation, cloning and analysis of the hexose transporter 6 gene (HXT6) in a native strain of *Saccharomyces cerevisiae* IBRC-M30069

Solmaz Azizi
M.Sc. student of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, solmazazizi@ymail.com
AliReza Tarinejad *
Associate Professor of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, atarinejad@yahoo.com
Mohammad Pazhang
Associate Professor of cell and molecular biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, mpazhang@yahoo.com

Abstract

Introduction: The *Saccharomyces cerevisiae* yeast is one of the most important microorganisms to produce ethanol. The *S. cerevisiae* has 20 genes that encode hexose transporter proteins. Among these gene families, seven genes *HXT7-HXT1* have important an role in alcohol production. The researchers proved that alcohol fermentation goes up by increasing the expression of these genes which results in increasing ethanol production.

Materials and methods: In this research, isolation of *HXT6* gene by specific primers via PCR technology was achieved. The amplified fragments were cloned into pGEM-T vector and transformed *to Escherichia coli* and sequence analysis was carried out.

Results: The nucleotide sequence of open reading frame of HXT6 gene revealed a 1713 bp long with a deduced amino acid of 570 residues. The estimated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 62.68 kDa and 7.89 respectively.

Discussion and conclusion: The deduced protein sequence showed a high similarity to *Hxt6p* VL31(EGA76254.1) sequences registered in NCBI and also the highest similarity of this gene with *HXT7* (one of the hexose transporter) was observed. This finding shows that this gene (HXT6) and also HXT7 gene resulted from one ancestor gene by mutation in their functional domain during years.

Key words: Cloning, *Saccharomyces cerevisiae*, *HXT6* gene, Recombinant plasmids

* Corresponding author
Received: November 15, 2014/ **Accepted:** May 31, 2015