



استخراج و تعیین توالی ژن های کولین دهیدروژناز و pepX از باکتری های هالوفیل و انتقال روی T-vector

علی کنشلو^۱، علیرضا عاقلی^۲، سعیده طوافی^۳، سمیرا حیدری^۴، امیر رضیان^۵

^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، سازمان سیما منظر و فضای سبز شهری شهرداری کرج
^۲ کارشناس ارشد مهندسی عمران، سازمان سیما منظر و فضای سبز شهری شهرداری کرج
^۳ دکتری تخصصی علوم مراتع، سازمان سیما منظر و فضای سبز شهری شهرداری کرج
^۴ دکتری حشره شناسی، سازمان سیما منظر و فضای سبز شهری شهرداری کرج
^۵ کارشناس کشاورزی زراعت و اصلاح نباتات، سازمان سیما منظر و فضای سبز شهری شهرداری کرج

*ایمیل نویسنده مسئول:

چکیده

مشکلات ناشی از آلودگی هوا و زندگی شهری برای شهروندان شهرهای بزرگ و صنعتی بر کسی پوشیده نیست که با استفاده از فضاهای سبز شهری، می توان تا حدودی محدودیت های یاد شده را تعدیل نمود. در بسیاری از مناطق شهری به ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک، توسعه فضاهای سبز شهری به علت محدودیت منابع آب و شوری خاک با معضلی بسیار جدی مواجه است. بدین منظور انتخاب گونه های گیاهی مقاوم به شوری دارای اهمیت بوده و در پایداری پوشش های گیاهی ایجاد شده تاثیرگذار است. ژن های مقاوم به شوری کاربردهای فراوانی در صنعت و تولید گیاهان دارد و بر همین اساس باید بتوان آنها را شناسایی کرد. این ژن ها در باکتری هایی که در آب های شور زندگی می کنند و همچنین گیاهانی که در مناطق شور زندگی می کنند وجود دارند. در این بررسی دو ژن (کولین دهیدروژناز و pepX) مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مطالعه ۱۷ سوش باکتری هالوفیل استاندارد از مرکز ذخایر ژنی ایران تهیه شد، DNA آنها با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریایی استخراج شد و سپس با استفاده از نرم افزار oligo5 برای ژن های کولین دهیدروژناز و pepX، طراحی پرایمر انجام شد. واکنش PCR طبق پروتکل مربوطه انجام شد و سپس محصول PCR الکتروفورز و تعیین توالی شدند. در این مطالعه سه سویه باکتری حاوی ژن کولین دهیدروژناز (*Alloactinosynnemairanicum*، *Aliicocuspersicus*) و *Oceanobacilluspersicus* و چهار سویه باکتری حاوی ژن pepX (*Salinivibrioprotocolyticus*، *Salinivibrioprotocolyticus*، *Salinithrixhalophila* و *Lentibacilluspersicus*) می باشند.

واژگان کلیدی: باکتری های هالوفیل، واکنش زنجیره ای پلیمرز، ژن کولین دهیدروژناز، ژن pepX، گیاهان مقاوم به شوری

۱- مقدمه

امروزه یکی از مشکلات بشری، نبودن آب شرب و قابل استفاده برای گیاهان است و تنش های محیطی ناشی از شوری، یکی از جدی ترین عواملی است که بازدهی گیاهان را محدود می سازد. اکثر گیاهان نسبت به حضور مقادیر زیادی نمک در خاک حساس هستند. توسعه و استفاده از گیاهانی که بتوانند میزان بالای شوری خاک را تحمل نمایند، یک راه حل عملی خواهد بود. اپستین^۱ و همکارانش (۱۹۸۰) محدودیت های تکنیکی و بیولوژیکی مربوط به مشکل شوری را تشریح نمودند. کشور ما با داشتن

¹ Epstein

مناطق شور، دارای تنوع موجودات شورپسند فراوانی است که مخازن ژنتیکی مفید و ارزشمندی به حساب می آیند. میکروارگانیسم هایی که به جهت سازگاری با شرایط سخت زیستی به عنوان منابع ارزشمندی برای جداسازی ژن های مفید و کاربردی مطرح می باشند.

لذا در آینده باید بتوان گیاهانی را تولید کرد که نسبت به شوری مقاوم باشند بر همین اساس و برای رسیدن به این هدف باید ژن هایی را جدا کرد تا نسبت به شوری مقاوم هستند که این ژن ها در میکروارگانیسم های موجود در آب های شور وجود دارند و لازمه انجام این عمل شناسایی میکروارگانیسم ها و ژن های مقاوم به شوری در آنها می باشد که دو مورد از این ژن ها کولین دهیدروژناز^۱ و pepX^۲ خواهند بود که در این تحقیق به حضور آنها در هفده گونه میکروارگانیسم هالوفیل^۳ بومی ایران پرداخته می شود. تحقیق فوق از آن جهت حائز اهمیت و نوآوری است که تاکنون در خصوص شناسایی ژن های کولین دهیدروژناز و pepX در این هفده گونه باکتریایی تحقیقی صورت نگرفته بر همین اساس و برای رسیدن به این هدف باید ژن های فوق را شناسایی و جداسازی نمود که این ژن ها در میکروارگانیسم های موجود در آب های شور وجود دارند. اهداف علمی این تحقیق شامل: شناسایی ژن کولین دهیدروژناز در باکتری های هالوفیل، شناسایی ژن pepX در باکتری های هالوفیل، تعیین سکانس، انتقال ژن به روی T- vector، ثبت توالی ژن های جداسازی شده در پایگاه های اطلاعاتی به عنوان بخشی از مخزن ژنی بومی، است. با شناسایی و جداسازی این ژنها از باکتری های هالوفیل و انتقال آنها به گیاهان می توان گیاهان مقاوم به شوری و کم آبی را تولید نمود، که این امر می تواند باعث کاهش مصرف آب شده و راندمان گیاهان را بالا ببرد که در حوزه کشاورزی و فضای سبز کاربرد دارد.

۲- مروری بر تحقیقات انجام شده

۱- بهار ۱۳۹۱ مطهره محسن پور، مسعود توحیدفر، محدثه محسن پور طراحی سازه های اگروباکتریومی به منظور تولید گیاهان تراریخته مقاوم به شوری، خشکی و سرما فاقد نشانگر آنتی بیوتیکی در این تحقیق ژن بتائن آلدئید دهیدروژناز به عنوان یک نشانگر غیر آنتی بیوتیکی ایمن و با ارزش در ساخت وکتورهای اگروباکتریومی مناسب برای تراریزش گیاهان مورد استفاده قرار گرفت.

۲- Epstein (۱۹۸۰) و همکارانش محدودیت های تکنیکی و بیولوژیکی مربوط به مشکل شوری را تشریح نمودند. اگر چه به نظر می رسد که پیشرفت هایی در زمینه ی راه حل هایی برای مشکلات تکنیکی صورت گرفته باشد، ولی توسعه ی راه کارهای زیستی، مشکل تر بوده اند.

۳- Flowers و Yeo (۱۹۹۵) شواهد مربوط به نادر بودن اقلام زراعی مقاوم به شوری را بررسی کردند و نتیجه گیری نمودند که تعداد این گیاهان احتمالاً کم تر از ۳۰ مورد است. Flowers (۲۰۰۴) بیان کرده است که از سال ۱۹۹۳ میلادی تا کنون، فقط ۳ مورد گیاه زراعی مقاوم به شوری در علوم زراعی ثبت گردیده است.

۴- در سال ۱۳۹۳ پریسا زرپرور، محمدعلی آموزگار بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون از آب، خاک و نمک ۴ منطقه تالاب نمونه برداری شد ۴۰۰ جدایه خالص سازی و ۵۵ سویه PCR گردید.

۵- سال ۱۳۸۶ فرشید کفیل زاده، حسین جاوید و محمد کارگر جداسازی میکروارگانیسم های هالوفیل و هالوتولرنت از دریاچه بختگان و اثر فاکتورهای فیزیکی - شیمیایی بر فراوانی آنها.

¹ - Choline dehydrogenase

² - X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase

³ - Halophil



۶- در سال ۱۳۹۱ ملیحه مهرشاد و محمد علی آموزگار تنوع زیستی باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه را مورد بررسی قرار دادند.

۷- بهار ۱۳۹۲ آزاده شاهین پی، محمد علی آموزگار جداسازی و شناسایی باکتری های پلی اکستریموفیل قلیادوست، نمک دوست و تحمل کننده نمک تالاب قلیایی شور-دریایی گمیشان بررسی رفتارهای نمک دوستی و تحمل کنندگی نمک و همچنین محدوده رشد بهینه در اسیدیته و دماهای مختلف، بررسی شدند. نمونه برداری از سه موقعیت جغرافیایی مختلف، در دو نوبت فصل خشک و بارش، منجر به جداسازی ۱۱۰ جدایه ها، ۳۹ سویه برای بررسی رفتارهای نمک دوستی و تحمل کنندگی نمک و همچنین، بهینه و محدوده رشد در اسیدیته و دماهای مختلف، بررسی شدند.

۸- نشریه پژوهشهای خاک (علوم خاک و آب)، سال بیست و هفتم، شماره ۱، (بهار ۱۳۹۲ ص ۹۷) که توسط مریم طالبی اتوبی، احمدعلی پوربابایی، مهدی شرفاء به نتیجه رسید تاثیر باکتری های شورزی مولد پلی ساکارید بر رشدگندم در تنش های خشکی و شوری. این دو عامل از مهمترین تنش هایی هستند که باعث کاهش قابلیت تولید محصولات زراعی مانند گندم در خاک های مناطق خشک و نیمه خشک می شوند. در این مطالعه به منظور بررسی تاثیر جدایه های باکتری های نمک دوست مولد پلیمر (پلی ساکارید) بر کاهش اثرات شوری و خشکی، ابتدا باکتری های برتر نمک دوست مولد پلی ساکارید از خاک های شور اشتهارد جداسازی شدند.

۹- فصلنامه زیست شناسی میکروارگانیسم ها، شماره ۲، (تابستان ۱۳۹۱) که توسط ملیحه مهرشاد، محمد علی آموزگار، باقر یخچالی، ابوالحسن شهزاده فاضلی به نتیجه رسید تنوع زیستی باکتری های نمک دوست و تحمل کننده نمک سواحل غربی دریاچه ارومیه که واقع در شمال غربی ایران و بزرگترین دریاچه دائمی ایران و یکی از سه دریاچه شور دائمی در سطح جهان است. از چهار منطقه غربی این دریاچه نمونه برداری انجام شد و تنوع میکروارگانیسم ها با روش های مبتنی بر کشت و مستقل از کشت بررسی شد. جدایه ها بر اساس تفاوت های کلونی، واکنش گرم، رنگ آمیزی اسپور و ویژگی های بیوشیمیایی اولیه تفکیک شدند. محتوای ژنومی نمونه های محیطی آب و خاک برای بررسی های مستقل از کشت استخراج شد. با استفاده از تکثیر ۱۶S rRNA و کلونینگ کتابخانه ژن ۱۶S rRNA تهیه و ۲۰ درصد کلون های نوترکیب حاصل تعیین ترادف شدند.

۱۰- مجله زیست شناسی کاربردی، سال بیست و دوم، شماره ۲، (پاییز و زمستان ۱۳۸۸ ص ۶۰) توسط مریم زنجیربند، روحا کسری کرمانشاهی، ناصر گلبانگ به نتیجه رسید جداسازی باکتری های نمک دوست نسبی و بررسی اثر غلظت های مختلف نمک سدیم کلراید و حضور املاح گوناگون بر رشد آن ها باکتری های نمک دوست نسبی گروه هتروژنی از میکروارگانیسم ها را تشکیل می دهند و قادر به رشد در دامنه ی نسبتاً وسیعی از غلظت نمک سدیم کلراید هستند. باکتری های مذکور با تجمع غلظت بالایی از ترکیبات آلی سازگاری دهنده اسمزی (Compatible Solute) یا اسمولیت ها، تعادل اسمزی را ایجاد می کنند. برای جداسازی باکتری های نمک دوست نسبی نمونه گیری از آب خلیج فارس و بخش های مختلف کارخانه ی چرم سازی انجام شد. نمونه ها در محیط کشت اختصاصی نمک دوست ها غنی سازی شد و باکتری ها به روش استریک پلیت جداسازی و خالص سازی شدند. برای بررسی اثر غلظت های مختلف نمک سدیم کلراید و حضور یا عدم حضور املاح گوناگون بر رشد آن ها، از روش کدورت سنجی و دستگاه خواننده ی الایزا استفاده شد.

۱۱- فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط زیست، شماره ۴۳، (زمستان ۱۳۸۸ ص ۴۷۹) که توسط محمدعلی آموزگار، نوشین سادات غضنفری به نتیجه رسید. بررسی جذب زیستی سرب و کادمیوم توسط باکتری نمک دوست نسبی. هدف از این مطالعه جداسازی باکتری های نمک دوست مقاوم، تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و بررسی حذف زیستی در سویه های با MIC بالا می باشد. از میان ۲۴ سویه که از مناطق نمکی ایران جدا شدند، ۳ سویه پس از آزمایش های MIC مقاومت چشمگیری را به این یون های فلزی نشان دادند.



۱-۲- نشریه تاکسونومی و بیوسیستماتیک، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۸ که توسط مریم زنجیربند، روحا کسری کرمانشاهی، ناصر گلبانگ به نتیجه رسید جداسازی و شناسایی باکتری های نمک دوست نسبی و بررسی اثر تغییرات دما و pH محیط کشت بر رشد آن ها. میکروارگانیسم هایی را که قادر به زندگی در زیستگاه هایی با دمای بالا و پایین، pH قلیایی و اسیدی، فشار هیدروستاتیک بالا و غلظت بالای نمک هستند، اصطلاحاً اکستروموفیل می نامند. میکروارگانیسم های نمک دوست یا تحمل کننده نمک گروهی از اکستروموفیل ها هستند که قادر به رشد در محیط واجد نمک سدیم کلراید هستند و برای زندگی در محیط های شور تطابق یافته اند. برای جداسازی باکتری های نمک دوست نسبی نمونه گیری از آب خلیج فارس و بخش های مختلف کارخانه چرم سازی (پوست نمک زده، روده نمک زده و پساب کارخانه) در شهریور ماه انجام شد. نمونه ها در محیط کشت اختصاصی نمک دوست ها غنی سازی شد و باکتری ها به روش کشت خطی روی پلیت خالص سازی و سپس شناسایی شدند. برای بررسی اثر تغییرات دما بر رشد آن ها، از روش قطره پلیت (Drop plate method)، و برای بررسی اثر تغییرات pH بر رشد آن ها، از روش کدورت سنجی و دستگاه قرائت گر الایزا استفاده شد. در این پژوهش ۸ باکتری از کارخانه و ۸ سویه از آب خلیج فارس جداسازی شد.

۳- روش تحقیق

باکتری های استاندارد هالوفیل عمدتاً بومی کشور که به صورت آمپول لیوفیلیزه و کشت فعال از مراکز معتبر تهیه شده و در محیط کشت مناسب آنها را کشت داده و بعد از کشت از میکروارگانیسم ها ماده وراثتی استخراج می شود و در نهایت با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمر، الکتروفورز و تعیین توالی حضور یا عدم حضور ژن کولین دهیدروژناز و PepX مورد بررسی قرار می گیرد و در نهایت به روی T-vector منتقل می گردد.

در این پژوهش دستگاه ها و وسایل ذیل مورد استفاده قرار گرفتند: هود بیولوژیک مجهز به لامپ uv (ندای فن)، هود شیمیایی آزمایشگاهی، دستگاه Eppendorf-Thermal Cycler، انکوباتور، بن ماری دیجیتالی قابل تنظیم، اسپکتروفتومتر با قدرت قرائت نمونه در طول موج های مختلف، شیکر معمولی آزمایشگاهی، انکوباتور، میکروسانتریفیوز، فور، هیتر، دستگاه ورتکس، سمپلر، سر سمپلر، میکروسکوپ، دستگاه اتوکلاو، یخچال، فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد، دستگاه pH متر، خط کش، پارافیل، پلیت یکبار مصرف استریل، دستکش یکبار مصرف، سیستم الکتروفورز، ترموسایکلر، ظروف رنگ آمیزی ژل، تیوپ، انس یا فیلدوپلاتین نوک تیز، لوپ کالیبره یک هزارم میلی لیتر، ارلن در اندازه های مختلف، بالن ژوژه در اندازه های مختلف، پیپت پاستور، لام، لامل، جا لوله ای، لوله نیم مک فارلند، شعله گاز به همراه سه پایه، دستکش نسوز و توری نسوز، لوله های شیشه ای سر پیچ دار استریل آزمایشگاهی، رک کوچک و بزرگ متناسب با میکروتیوب ها، جا لوله ای، فویل آلومینیومی، یونولیت، برجسب، ماژیک، پنبه، دستگاه ورتکس، مزور در اندازه های مختلف، کست و شانه (Comb)، Power Supply جهت برقرای جریان الکتریکی در تانک الکتروفورز، ترازو.

مواد مصرفی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند عبارتند از: آگاروز، بافر، TBE، اتیدیوم برماید، پودر EDTA، Boric acid، Tris base، مارکرهای 100bp، 1kb، PCR Master mix، پرایمر PCR، کیت استخراج DNA، کیت GEL recovery، 6x DNA Loading Dye، آب مقطر دیونیزه استریل، T-vector، محیط کشت مولر هینتون آگار، محیط کشت مولر هینتون براث، محیط کشت LB، آنتی بیوتیک (آمپی سیلین). نرم افزارها و پایگاههای اطلاعاتی Oligo 5، Mega 4، Sequence View 6 CLC و Fiench TV نیز در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند.

برای ساخت محیط کشت اختصاصی باکتری های نمک دوست از نمک NaCl و محیط کشت مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث و آب مقطر استریل استفاده شد. برای فرآیند کشت باکتری های نمک دوست، محیط ها به صورت براث و آگاردار ساخته شد. غلظت نمک محیط بین ۰-۱۰ درصد بود. به این صورت که باکتری های نمک دوست در بهینه نمک کشت داده شدند سپس در دمای بهینه در انکوباتور قرار گرفتند. پس از کشت میکروبی آن ها شماره گذاری شدند و در



انکوباتور یخچال دار با دمای ۳۰ درجه قرار داده شد. بعد از رشد باکتری ها روی سطح پلیت ها از این باکتری ها بازهم کشت داده شد و پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی و خالص سازی برای فرایند استخراج DNA آماده شد. محیط کشت مایع حاوی مولر هینتون آگاردار به همراه نمک برای جدایه مورد نظر تهیه شد و باکتری بر روی آن کشت داده شدند سپس ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای استخراج DNA ژنومی از بیومس از کیت مخصوص استخراج DNA ژنومی شرکت سیناژن استفاده شد. به منظور انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز، ابتدا مراحل ساخت و آماده سازی ژل انجام شد و بعد از انجام الکتروفورز، باندهای بدست آمده مورد بررسی قرار گرفتند.

مراحل آماده سازی پرایمر: برای این منظور ابتدا توالی ژن های مورد نظر از پایگاه داده ها NCBI استخراج و سپس یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از نرم افزار آنلاین primer3 به آدرس سایت (<http://fordo.wi.mit.edu/primer3>) طراحی گردید در ادامه میزان اختصاصی بودن پرایمر ها با استفاده از primer-blast (<http://www.ncbi.gov/tools/primer-blast>) مورد ارزیابی قرار گرفت و برای آنالیز ساختار ثانویه از نرم افزار oligo استفاده شد و جهت تهیه به شرکت پیشگام سفارش داده شد و پس از دریافت پرایمرها برای تهیه محلول استوک پرایمر با غلظت ۱۰۰ μM انجام شد.

جدول ۱: مشخصات پرایمر

Target organism	Primer set	Sequence(5' to 3')	Product size(bp)
کولین دهیدروژناز در باکترها	F	GTTCTCGCTACCCGTCTGACT	162
	R	TTCAGGTTCCGTTTCATAGGC	
pepX در باکتری	F	CGAAGATTGGTCATTTAGCGA	307
	R	AGCGGAGATCAACTTATGGGT	

پروتکل خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت Source bio-science کشور انگلستان انجام شد. به منظور انجام تعیین توالی ژن، بعد از خالص سازی برای تمامی نمونه های مثبت OD هر یک از نمونه ها قرائت شد سپس، ارسال محصول PCR به کمپانی Bioneer کره جنوبی جهت تعیین توالی از طریق شرکت تکاپوزیست با حجم حدود 20 μl و غلظت (15 μl/ng) از هر نمونه ارسال گردید. که پس از ارسال سکانس ها بررسی سکانس ها با برنامه CLC Sequence Viewer با سکانس های اورجینال موجود در بانک اطلاعاتی NCBI که مربوط به این ژن و نرم افزار Finch Tv ورژن 1.4.0 بررسی شد. پس از اتمام و بررسی هایی که با نرم افزار Finch TV انجام شد سکانس های رشته Forward و Reverse هر یک از سکانس ها را در نرم افزار CLC Sequence Viewer ورژن 6.5 وارد گردید سپس سکانس ها با یکدیگر Align شد و بخش Consensus برای هر توالی بدست آمد. پس از این بررسی ها برای بررسی های فیلوژنتیکی تمامی سکانس های ثبت شده این ژن را از بانک اطلاعاتی NCBI دانلود و برای بررسی های فیلوژنتیکی با نرم افزار Mega 4 با فرمت FAST A ذخیره شده و تمامی سکانس ها وارد نرم افزار گردید. در ابتدا بایستی توالی های مورد آنالیز را به نرم افزار وارد کرد و سپس آنها را همردیف سازی نمود. شکل پائین پنجره اصلی نرم افزار را نشان می دهد. از گزینه Alignment Explorer استفاده و توالی های مورد نظر را به نرم افزار وارد کردیم.

سپس از گزینه Align by clustal W استفاده نموده تا نرم افزار کار همردیف سازی توالی ها را انجام دهد.

آنالیز توالی های DNA از جمله مشخص کردن نواحی متغیر (Variable sites) و ثابت (Conserved sites)، جایگاههایی که منحصرأ در یک سویه تغییر نوکلئوتیدی دیده می شود (Singleton sites)، جایگاههایی که در حداقل دو سویه یا بیشتر

تغییر نوکلئوتیدی دیده می شود (phylogenetically informative sites)، تفاوت تعداد نوکلئوتیدها بین سویه ها، تغییرات در سطح آمینواسید، ترسیم درخت (دندروگرام) ژنی و مشخص کردن تیپهای سکانس (Sequence type) با استفاده از نرم افزار MEGA 4 انجام گرفت.

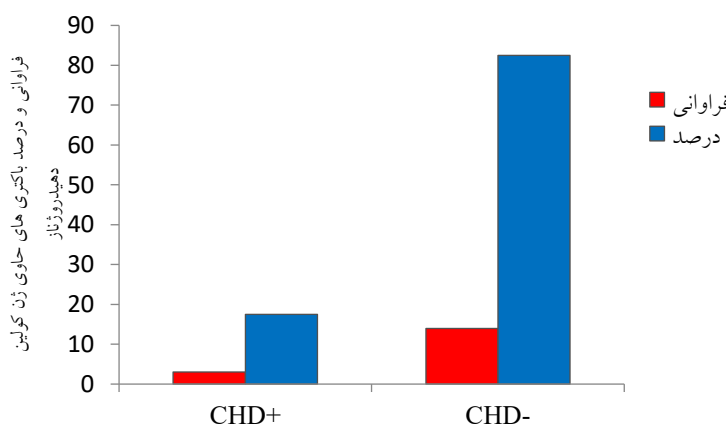
برای هر یک از ژن ها، توالی های نوکلئوتیدی توسط شرکت ارائه دهنده خدمات تعیین توالی به صورت یک فایل کامپیوتری به نام کروماتوگرم ارسال گردید. دو انتهای سکانس که کیفیت پیک ها پایین بود، حذف گردید و مابقی مورد آنالیز سکانس قرار گرفت.

در یک تعیین توالی خوب، کروماتوگرم دارای پیک های واضح، جدا از هم و نوک تیز می باشد و تعداد N (نوکلئوتید نا مشخص) در آن کم است. شکل اول قسمتی از n کروماتوگرم با کیفیت تعیین توالی خوب را نشان می دهد و شکل دوم کروماتوگرمی با کیفیت پایین را نشان می دهد. در حالت اخیر به دلیل زیاد بودن تعداد N ها، آنالیز قابل انجام نیست و باید تعیین توالی دوباره صورت گیرد. کار ویرایش نوکلئوتیدها بر روی کروماتوگرم های خام با توجه به مقایسه آنها با سایر سویه ها و با توالی سویه استاندارد که سکانس آن به طور کامل در دیتابیس NCBI در دسترس است و همچنین کنترل چشمی پیکهای توالی در کروماتوگرم صورت گرفت.

کلونینگ ژن در پلاسמיד pTG19: یکی از راههای کلونینگ ژن و انجام همسانه سازی، استفاده از پلاسמיד pGEM-T که از محتویات کیت شرکت Promega می باشد، جهت انجام کلونینگ است. واکنش پیوند (لیگاسیون) طبق پیشنهاد کیت مورد استفاده برای همسانه سازی، نسبت بهینه بین محصولات PCR به پلاسמיד ۳ به ۱ می باشد. به منظور برآورد تقریبی غلظت محصولات PCR از نشانگر وزنی 100bp Plus ساخت شرکت سیناکلون استفاده شد. با استفاده از روش تخمین مشاهده ای بر طبق دستورالعمل نشانگر وزنی مذکور غلظت محصولات PCR برآورد شد.

۴- یافته ها

۱- نتایج بررسی ژن کولین دهیدروژناز در باکتری های مورد بررسی



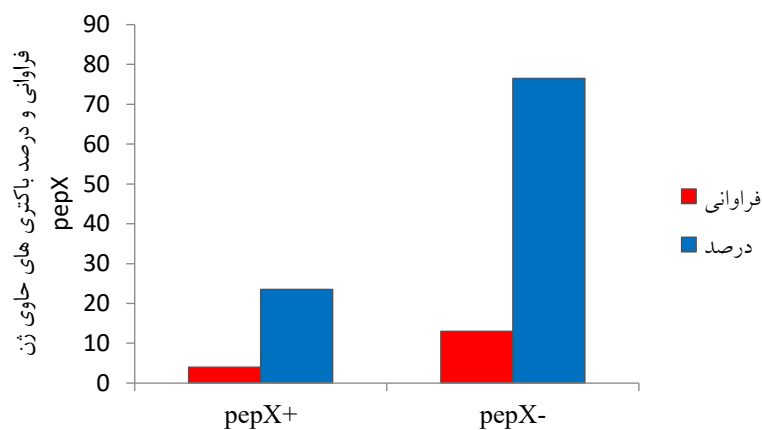
شکل ۱: فرآوانی و درصد ژن کولین دهیدروژناز

۲- نتایج بررسی ژن pepX در باکتری های مورد بررسی

۳- نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن کولین دهیدروژناز

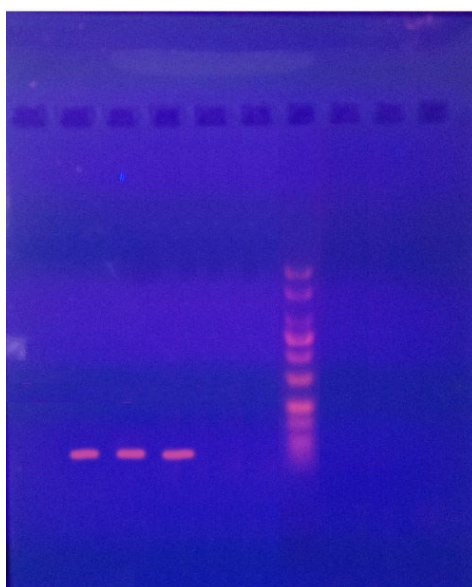


نتایج PCR به منظور تکثیر ژن کولین دهیدروژناز در تصویر الکتروفورز زیر نشان داده شده که به ترتیب از سمت راست شامل لدر ۱۰۰bp و تشکیل باند ژن مورد نظر در سه سویه باکتری می باشد.



شکل ۲: فرآوانی و درصد ژن pepX

Aliicoccus persicus , *Alloactinosynnemairanicum* , *Oceanobacillus persicus*

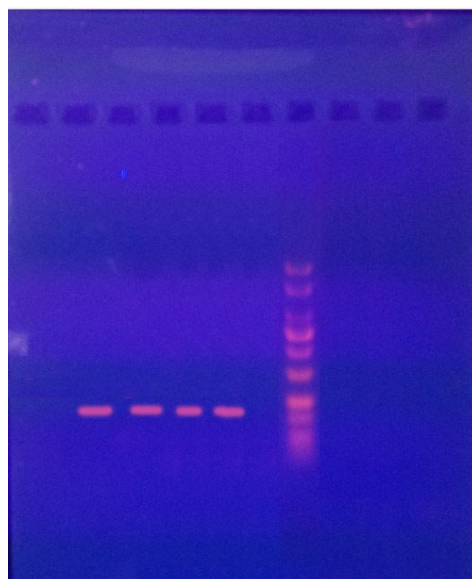


شکل ۳: مربوط به تایید PCR ژن کولین دهیدروژناز

۴- نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن pepX

نتایج PCR به منظور تکثیر ژن pepX در تصویر الکتروفورز زیر نشان داده شده که به ترتیب از سمت راست شامل لدر ۱۰۰bp و تشکیل باند ژن مورد نظر در چهار سویه باکتری می باشد

Salinithrixhalophila , *Salinivibrioprotcolyticus* , *Salinivibrioprotcolyticus* , *Lentibacillus persicus*



شکل ۴: مربوط به تایید PCR ژن pepX

۵- بحث

کولین دهیدروژناز با مسیر بتائین گلیسن در باکتری اشیرشیا کلی باعث افزایش تحمل فشار اسمزی بالا می شود (آرنر و همکاران، ۱۹۸۶). کلونینگ، بیان و تخلیص کولین دهیدروژناز از باکتری های نمک دوست متوسط، هالوموناس الانگتا (جیوانی و الیزابت، ۲۰۰۳). بررسی مسیر تبدیل کولین دهیدروژناز در *Staphylococcus xylosus* با استفاده از خصوصیات ژنتیکی و فیزیولوژیکی (رالف روزنشتاین و فردریش گوتز ۱۹۹۹) ارائه اولین مدل بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سوخت و ساز سلول یک باکتری نمک دوست *Chromohalobacter salexigens*، که به عنوان یک راهنمای مفید برای شناسایی شبکه سوخت و ساز باکتری های نمک دوست به شمار می رود (کاظم یاراگا و اوزلم اتس، ۲۰۱۱) بررسی رابطه مقاومت به نمک در باکتری های هالوفیل با پروتئین دیواره (جونز و لنی، ۱۹۷۴) خصوصیات عملکردی و آنالیز سکانس کولین دهیدروژناز از باکتری اشیرشیا کولی (لارنس و همکاران، ۲۰۱۰) بررسی اسید آمینه های باکتری های نمک دوست (ساتوشی و همکاران، ۲۰۰۳). کلونینگ و تعیین توالی ژن کد کننده (pepX) از سویه استرپتوکوک ترموفیلوس که در این تحقیق توالی ژن pepX از استرپتوکوکوس ترموفیلوس کلون شد، که نشان می دهد توالی پروتئین pepX شباهت قابل توجهی با آنزیم pepX نشان داد (آناستازیا و پاپلی، ۲۰۰۲)

بررسی خصوصیات pepX و pepN از لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در هیدرولیز پروتئین های مواد غذایی (ایزل و مایکل)، جداسازی و شناسایی باکترهای هالوفیل از دریاچه آب شور آران و بیدگل [۱۴]. بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک در تالاب شور اینچه برون (آموزگار، ۱۳۹۳). جداسازی و شناسایی باکتری های هالوفیل از دریاچه آب شور گمیشان [۱۴].

۵-۱ مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با سایر محققین

ژن های کولین دهیدروژناز و pepX باعث مقاومت برخی از باکتری های هالوفیل در مقابل شرایط تنش شوری می شوند در این تحقیق ۲۳/۵٪ نمونه ها حاوی ژن pepX و ۱۷/۵٪ نمونه ها حاوی ژن کولین دهیدروژناز می باشد که تاکنون در رابطه با ژن کولین دهیدروژناز مطالعات زیادی انجام نشده است و به گونه ای که در NCBI عنوان شده است این ژن در شرایط فشار اسمتیک در باکتری ها فعال می شود. بررسی مسیر تبدیل کولین دهیدروژناز در *Staphylococcus xylosus*



با استفاده از خصوصیات ژنتیکی و فیزیولوژیکی، در میان باکتریها غیر هالوفیل، جنس استافیلوکوکوس توانایی مقابله با طیف گسترده ای از فشار اسمزی در محیط دارد. به عنوان مثال، استافیلوکوکوس اورئوس قادر به زنده ماندن در محیط های شور با غلظت نمک متوسط و همچنین تحت نمک بالا است این نشان می دهد این باکتریها دارای یک مکانیزم موثر در تنظیم اثرات مخرب در شرایط اسمزی بالا می باشند که باعث محافظت از خود می شود (رالف روزنشتاین و فردریش گوتز ۱۹۹۹). خصوصیات عملکردی و آنالیز سکانس کولین دهیدروژناز از باکتری اشرشیا کولی کولین دهیدروژناز کاتالیزور واکنش اکسیداسیون کولین به گلایسین بتائین است که در این واکنش بتائین آلدئید به عنوان حد واسط می باشد. برنامه های کاربردی بیوتکنولوژی از گلایسین بتائین در بهبود تولید گیاه تراریخت می توان استفاده کرد که نشان داده شده که باعث افزایش تحمل نسبت به شوری و انجماد در باکتری ها می شود. در این مطالعه، کولین دهیدروژناز (بتا) از ژن *acpA* کولی کلون شد. (لارنس و همکاران، ۲۰۱۰). در رابطه با ژن *pepX* نیز مطالعات زیادی انجام نشده است و به گونه ای که در NCBI عنوان شده است که این ژن هنوز به طور کامل شناسایی نشده است. کلونینگ و تعیین توالی ژن *pepX* از سویه استریپتوکوک ترموفیلوس که در این تحقیق توالی ژن *pepX* از استریپتوکوکوس ترموفیلوس کلون شد، که نشان می دهد توالی پروتئین *PepX* شباهت قابل توجهی با آنزیم *pepX* نشان داد (آناستازیا و پاپلی، ۲۰۰۲).

۶- نتیجه گیری

۱. ژن های کولین دهیدروژناز و *pepX* باعث مقاومت برخی از باکتری های هالوفیل در مقابل شرایط تنش شوری می شوند در این تحقیق ۲۳/۵٪ نمونه ها حاوی ژن *pepX* و ۱۷/۵٪ نمونه ها حاوی ژن کولین دهیدروژناز می باشد که تاکنون در رابطه با ژن کولین دهیدروژناز و ژن *pepX* نیز مطالعات زیادی انجام نشده است و به گونه ای که در NCBI عنوان شده است که این ژن هنوز به طور کامل شناسایی نشده است.
۲. در این تحقیق سه سویه باکتری حاوی ژن کولین دهیدروژناز شناسایی شد.

Aliicoccus persicus
Alloactinosynnemairanicum
Oceanobacillus persicus

۳. در این تحقیق چهار سویه باکتری حاوی ژن *pepX* شناسایی شد.

Salinithrix halophila
Salinivibrioprotocolyticus
Salinivibrioprotocolyticus
Lentibacillus persicus

۷- پیشنهادها

- ۱- به دلیل نبود مطالعات و تحقیقات جامع در مورد ژن های کولین دهیدروژناز و *pepX* در دنیا و نیاز به تولید گیاهان تراریخته مقاوم به خشکی در مقابله با کمبود آب، باید مطالعات جامع تری در مورد این ژن ها صورت پذیرد.
- ۲- مطالعه بیشتر بر روی سایر میکروارگانیسم های هالوفیل
- ۳- مطالعه بر روی باکتری های هالوفیل جدا شده از سایر مناطق آب های شور کشور
- ۴- مطالعه بومی باکتری هالوفیل
- ۵- بررسی با استفاده از سایر تکنیک ها و بررسی بیان ژن های مربوطه با استفاده از Real Time PCR
- ۶- بررسی توالی ژن ها با نرم افزارهای بیوانفورماتیکی
- ۷- بررسی سایر ژن های مقاوم به شوری.

مراجع

- [1] امیرخانی، ح، عسگرانی، ع، خدابنده، م، ۱۳۹۱، تعیین شرایط بهینه رشد هالوارکولای جدا شده از دریاچه ارومیه (درجه حرارات، نوع محیط کشت، مقدار pH، درصد NaCl) با استفاده از روش تاگوچی، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۵، شماره ۱، ۱۵۶-۱۴۸.
- [2] بابولیان، ح، آموزگار، م.ع.، پوربائی، ا.ع، ۱۳۸۸، شناسایی و تعیین خصوصیات باکتریهای نمک دوست تولید کننده آنزیم های هیدرولیتیک جدا شده از دریاچه نمک آران و بیدگل، مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، شماره ۱، ۴۶-۲۴.
- [3] باقری، مریم . (۱۳۸۸) بررسی تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی هتروتروف ، هوازی وقابل کشت در دریاچه آران وبیدگل ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تهران، ایران
- [4] بهروزی راد، بهروز. (۱۳۸۷) تالابهای ایران . انتشارات سازمان جغرافیایی نیروهای مسلح، تهران
- [5] جاوید، حسین. (۱۳۸۳) جداسازی میکروارگانسیم های هالوفیل و هالو تولرنت از دریاچه بختگان و اثر فاکتورهای فیزیکی - شیمیایی بر فراوانی آنها. ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، ایران
- [6] دیدری خمسه مطلق ، مریم . (۱۳۸۸) بررسی تنوع زیستی باکتریهای تحمل کننده نمک هتروتروف ، هوازی وقابل کشت در دریاچه آران وبیدگل ، پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تهران ، ایران
- [7] رهبان، ر، آموزگار، م.ع.، ۱۳۸۸، بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست تولیدکننده آنزیم های هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان، علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره ۱۱، شماره ۴، ۲۶۷-۲۵۱.
- [8] رهبان ، رخساره. (۱۳۸۷) بررسی تنوع زیستی باکتری های نمک دوست تولید کننده آنزیمهای هیدرولیتیک ساکن در دریاچه حوض سلطان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ، تهران ، ایران
- [9] زهرایی ، شیرین.(۱۳۸۶) تنوع میکروارگانسیم های نمک دوست تولید کننده آنزیمهای خارج سلولی در دریاچه ارومیه. ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران ، ایران
- [10] هلاکو، ا، امیر مظفری، ن، فروهش تهرانی، ه، ۱۳۸۴، انتشار گونه های وبیریو در آب های دریای خزر، مجله افق دانش، دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی گناباد، دوره ۱۱، شماره ۳، ۲۰-۱۶.
- [11] مهرشاد، ملیحه . (۱۳۹۰) مطالعه تنوع باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک هتروتروف هوازی سواحل غربی دریاچه ارومیه باروش وابسته به کشت و غیر وابسته به کشت پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه تهران ، ایران
- [12] Adolphe D. 1980. Canola rapeseed corn. Agriculture Canada CPS Food, Ltd.
- [13] Amoozegar M.A., University of Saskatchewan.MAlekzade F., Malik K.A., 2006 ;purification and biochemnaical characterization of a protease secreted by the Salinivibrio sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents, Extremophiles.4:36-46.
- [14] Amoozegar MA, Bagheri M, Makhdoumi-Kakhki A, Didari M, Schumann P, Nikou MM, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2014. Aliicoccus persicus gen. nov., sp. nov., a halophilic member of the Firmicutes isolated from a hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol.;64(Pt 6):1964-9.
- [15] Amoozegar MA¹, Bagheri M, Didari M, Shahzede Fazeli SA, Schumann P, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2013. Saliterribacillus persicus gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol.;63(Pt 1):345-51.
- [16] Amoozegar MA¹, Didari M, Bagheri M, Fazeli SA, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2013. Bacillus salsus sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol.;63(Pt 9):3324-9.



- [17] Amoozegar MA¹, Sánchez-Porro C, Rohban R, Hajighasemi M, Ventosa A. 2009. *Piscibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline Iranian lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;59(Pt 12):3095-9.
- [18] Amoozegar MA¹, Sánchez-Porro C, Rohban R, Hajighasemi M, Ventosa A. 2009. *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;59(Pt 9):2352-8.
- [19] Amoozegar MA¹, Schumann P, Hajighasemi M, Ashengroph M, Razavi MR. 2008. *Salinicoccus iranensis* sp. nov., a novel moderate halophile. *Int J Syst Evol Microbiol.*;58(Pt 1):178-83.
- [20] Bagheri M¹, Amoozegar MA, Didari M, Makhdoumi-Kakhki A, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2013. *Marinobacter persicus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a saline lake in Iran. *Antonie Van Leeuwenhoek.*;104(1):47-54.
- [21] Bagheri M¹, Amoozegar MA, Schumann P, Didari M, Mehrshad M, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2013. *Ornithinibacillus halophilus* sp. nov., a moderately halophilic, Gram-stain-positive, endospore-forming bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;63(Pt 3):844-8.
- [22] Bagheri M¹, Didari M, Amoozegar MA, Schumann P, Sánchez-Porro C, Mehrshad M, Ventosa A. 2012. *Bacillus iranensis* sp. nov., a moderate halophile from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;62(Pt 4):811-6.
- [23] Blatt H., Middleton G., Murray R., 1980 ;Evaporites and native sulfur origin of sedimentary rocks. Prentice-Hall, Englewood, New Jersey, 634 pp.by dehydration in Arabidopsis. *Plant Cell.* 8: 1323-133.
- [24] De Ronde, W.A. Cress, G.H.J. Kruger , R.J. Strasser,J. Van Staden ,Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene,during heat and drought stress, *Journal of Plant Physiology* 161 (2004) 1211–1224.
- [25] Dekker De.P., 1983 ;Austalian salt lake: Their history, chemistry and biota-a review. *Hydrobiologia.* 105:223-234.
- [26] Delauney A.J. and D.P.S Verma.1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant J.* 4: 215-223.
- [27] Didari M¹, Amoozegar MA, Bagheri M, Mehrshad M, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2013. *Bacillus persicus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;63(Pt 4):1229-34.
- [28] Didari M¹, Amoozegar MA, Bagheri M, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2012 . *Alteribacillus bidgolensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake, and reclassification of *Bacillus persepolensis* as *Alteribacillus persepolensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*;62(Pt 11):2691-7.
- [29] Fao Corporate Document Repositry, THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE 2005. P:45- 46.
- [30] Ginzberg, I., H. Stein and Y. Kapuling. 1998. Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ - pyrroline- carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Mol. Biol.* 38: 755-764.
- [31] Hansjory K., 2006 ;Osmoregulation in bacteria, compatible solute accumulation and osmosensing, *Environ chem*, 3:94-99.



- [32] Jacob G.S., Gabrow J.R., Hallas L.E., Kimack N.M., Kishore G.M., Schaefer J., 1988 ; Metabolism of Glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr.Appl. Environ. Microbiol. 54: 2953-2958.
- [33] Javor BJ. 1989 ; Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.
- [34] Jones B.E., Grant W.D., 1999 ; Microbial diversity and ecology of the Soda lake of East Africa, Ecology and Diversity of Extremophiles, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- [35] Kafilzadeh F., Javid H., Kargar M., 2007 ; Isolation of Halophilic and Halotolerant Microorganisms from the Bakhtegan Lake and the Effect of Physicochemical Factors on Their Frequency, Water and Wastewater, 63:81-87.
- [36] Kerkar S., 2002 ;Ecology of hypersaline microorganisms, Department of Biotechnology Goa university, Goa.India.
- [37] Kiyosue,T., Y.Yoshiba, K.Yamaguchi- Shinozald and K. Shinozaki. 1996 A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated
- [38] Krueger R, Jager H-J, Hintz M, Pahlich E (1986) Purification to homogeneity of pyrroline-5-carboxylate reductase of barley. Plant Physiol 80: 142-144.
- [39] Kushner, D. J. & Kamekura, M. 1988. Physiology of halophilic eubacteria. In Halophilic Bacteria, vol. 1, pp. 109–140. Edited by F. Rodriguez-Valera. Boca Raton, FL: CRC Press.
- [40] LaRosa PC, Rhodes D, Rhodes JC, Bressan RA, Csonka LN (1991) Elevated accumulation of proline in NaCl-adapted tobacco cells is not due to altered.
- [41] Lifshitz R., Kloepper J.W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E.M., and Zaleska I. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Can. J. Microbiol. 33: 390-395.
- [42] Mehrshad M¹, Amoozgar MA, Didari M, Bagheri M, Fazeli SA, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2013. *Bacillus halosaccharovorans* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. Int J Syst Evol Microbiol.;63(Pt 8):2776-81.
- [43] Moshe Sagi, Olga Davydov, Saltanat Orazova, Zhazira Yesbergenova, Ron Ophir, Johannes W. Stratmann, and Robert Fluhr (2003). Plant Respiratory Burst Oxidase Homologs Impinge on Wound Responsiveness and Development in *Lycopersicon esculentum*. Plant Cell. 2004 Mar; 16(3): 616–628.
- [44] Nikou MM¹, Ramezani M, Amoozgar MA, Fazeli SA, Schumann P, Spröer C, Sánchez-Porro C, Ventosa A. 2014 . *Alloactinosynnema iranicum* sp. nov., a rare actinomycete isolated from a hypersaline wetland, and emended description of the genus *Alloactinosynnema*. Int J Syst Evol Microbiol.;64(Pt 4):1173-9.
- [45] Oncescu.T, Oancea.P Enache.M, Popescu.G Dumitru.L, Kamekur.M., 2007; Halophilic bacteria are able to decontaminate dichlorvos, a pesticide, from saline environments, central European Journal of Biology 2(4):563-573
- [46] Orcutt,D.M. and E.T. Nilsen. 2000. The Physiology of Plants Under Stress, Soil and Biotic Factors. John Wiley, New York.
- [47] Oren A., 2003 ;Halophilic Microorganisms and their environments, Int Microbial, 6:151-152. Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis*



- [48] Penrose D.M., and Glick B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Physiol.* 118:10-15.
- [49] Pipke B.W., Glorslie D.S., Casey. 1997 ;Laboratory exercises in oceanography.W.S. free man, San Francisco.
- [50] Quesada E., Bejar V., Valderrama M.J & Ramos-comezana A., 1987 ;Growts characterisrics and salt requirement of *Deleya halophila* in a defined medium. *Curr. Microbial.* 16:21-25.
- [51] Roehrdanz, R. L. and Flanders, R.V. 1993. Detection of DNA polymorphisms in predatory Coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD- PCR) . *Entomophaga* 38(4):479-491
- [52] Sánchez-Porro C¹, Amoozegar MA, Fernandez AB, Babavalian H, Ramezani M, Ventosa A. 2010 . *Lentibacillus persicus* sp. nov., a moderately halophilic species isolated from a saline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;60(Pt 6):1407-12.
- [53] Sanchez-Porro C¹, Amoozegar MA, Rohban R, Hajighasemi M, Ventosa A., 2009 *Thalassobacillus cyri* sp. nov., a moderately halophilic Gram-positive bacterium from a hypersaline lake. *Int J Syst Evol Microbiol.*;59(Pt 10):2565-70.
- [54] Shahinpei A¹, Amoozegar MA, Sepahy AA, Schumann P, Ventosa A., 2014 *Cyclobacterium halophilum* sp. nov., a marine bacterium isolated from a coastal-marine wetland. *Int J Syst Evol Microbiol*; 64(Pt 3):1000-5.
- [55] Thaliana. Verbruggen, N., Villarroel, R., Van Montagu, M. *Plant Physiol.* (1993).
Ventosa M.A., Nieto Y.J., Oren A., 1998 ;Biology of holophilic aerobic bacterium. *Microbial. Rev.* 62:504-544.
- [56] Vreeland R.H., Hochstein L., 1993 ;The Biology of Holophilic bacteria, Boca Raton, FL: CRC press vol. 6:450-456.