Jundishapur
Scientific Medical Journal

June, July 2021. Volume 20. Number 2

Research Paper:

Cloning and Expression of Serratia Marcescens Prodigiosin Gene in Ecoli XL1blue

Maryam Akbari[1], ***Kumarss Amini**[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Akbari M, Amini K. Cloning and Expression of Serratia Marcescens Prodigiosin Gene in Ecoli XL1blue. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2021; 20(2):102-111. https://doi.org/10.32598/JSMJ.20.2.1

https://doi.org/10.32598/JSMJ.20.2.1

Received: 22 Jun 2020
Accepted: 08 Nov 2020
Available Online: 01 Jun 2021

Keywords:
Serratia marcescens, Prodigiosin, Cloning, Bacterial pigments, Real Time PCR

ABSTRACT

Background and Objectives: Serratia is a gram-negative bacterium. The pigmentation property of Serratia Marcescens is used as a marker of dust particles in the environment and in the hospital. Today biopigments are also widely used in the manufacture and production of pharmaceutical products. Prodigiosin is a promising drug due to its reported properties of antifungal immunosuppressive and antiproliferative activities. In the present study, cloning of pig gene- isolated from Serratia Marcescens in Ecoli XL1blue was performed.

Subjects and Methods 60 Samples were taken from clinical sources of patients hospitalized with urinary tract infections in Saveh Hospitals. Serratia Marcescens were identified and isolated by different tests. The pig gene was cloned by T-A cloning using PTG-19 vector into the Escherichia coli XL1blue as host. Expression of cloned gene in recombinant colonies was evaluated by Real time PCR. The phylogenetic tree was plotted using clustalX and Mega5 software

Results Screening of samples identified 12 isolates of Serratia Marcescens from then 4 isolates had pig gene. Expression of Pig gene in Escherichia coli XL1blue was confirmed by Real-Tima PCR. As a result of phylogenetic studies, some close relatives of serratia have been identified as candidates for further studies

Conclusion Serratia Marcescens can be considered as a rich source of pigments with many applications and can be used as indigenous strains to produce Prodigiosin.

Corresponding Author:
Kumarss Amini, PhD.
Address: Department of Microbiology, Faculty of Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Tel: +98 (912) 54524074
E-Mail: kamini@iau.saveh.ac.ir

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور
خرداد و تیر ۱۴۰۰ . دوره ۲۰ . شماره ۲

مقاله پژوهشی

کلونینگ و بیان ژن پرودی جیوسین استخراج‌شده از سراشیا مارسنس در باکتری Ecoli XL1blue

مریم اکبری[۱]، *کیومرث امینی[۱]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۲ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۱۸ آبان ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۱ خرداد ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف سراشیا مارسنس باکتری‌های گرم منفی هستند. امروزه رنگدانه زیستی پرودی جیوسین در تهیه و تولید محصولات دارویی به‌وفور مورد استفاده قرار گرفته است و به دلیل ویژگی‌های گزارش‌شده از فعالیت‌های ضدقارچی، سرکوب‌کننده‌های ایمنی بدن و ضدپرولیفراسیون، یک داروی امیدوارکننده محسوب می‌شود. با تولید این رنگیزه در مقیاس وسیع توسط روش‌های مبتنی بر کلونینگ، می‌توان به کاربرد آن در داروسازی با هزینه کم و در مقیاس صنعتی امیدوار بود. در مطالعه حاضر کلونینگ ژن تولیدکننده پرودی جیوسین جداشده از سراشیا مارسنس (pig) در باکتری اشرشیاکلی XL1blue انجام و بیان ژن کلون‌شده در میزبان تأیید شد. همچنین خویشاوندان نزدیک باکتری مذکور جهت مطالعات آینده معرفی شدند.

روش بررسی شصت نمونه از منابع بالینی بیمارستان‌های ساوه جداسازی شد. پس از تعیین هویت جدایه‌های سراشیا مارسنس، ژن pig این باکتری‌ها توسط روش کلونینگ T-A با استفاده از وکتور PTG-19 در درون میزبان اشرشیاکلی XL1blue کلون شد. بیان ژن کلون‌شده در کلونی‌های نوترکیب توسط روش Real time PCR بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزارهای clustalX و Mega 5 درخت فیلوژنی رسم شد.

یافته‌ها دوازده ایزوله سراشیا مارسنس شناسایی شد که از بین آن‌ها چهار ایزوله، ژن pig را دارا بودند. بیان ژن pig در Escherichia coli XL1blue نوترکیب تولیدشده، قابل ردیابی بود و اثبات شد. برخی خویشاوندان نزدیک سراشیا شناسایی شدند تا در مطالعات آینده کاندیدای بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری سراشیا مارسنس می‌تواند منبعی غنی از رنگدانه‌ها و ردهای بومی به منظور تولید پرودی جیوسین باشد.

کلیدواژه‌ها:
سراشیا مارسنس، پرودی جیوسین، کلونینگ، رنگدانه‌های باکتریایی، Real Time PCR

مقدمه

سراشیا[۱] از خانواده آنتروباکتریاسه و یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، متحرک و اکسیداز مثبت دارای رنگدانه است که در آب‌های شیرین حضور دارد. این باکتری از عفونت‌های ریوی ـ ادراری و خونی قابل جداسازی است. کشت این باکتری بوی ماهی یا ادرار می‌دهد و در محیط‌های آزمایشگاهی به‌خوبی پرورش می‌یابد. سراشیا مارسسنس[۲] از گونه‌های معروف سراشیاست و و اهمیت بالایی دارد و در شرایط اتاق قادر به تولید رنگیزه است [۱]. از خصوصیت پیگمان‌زایی سراشیا مارسنس به عنوان مارکر ذرات غبار در محیط و در بیمارستان استفاده می‌شود. امروزه رنگدانه‌های زیستی[۳] در تهیه و تولید محصولات دارویی به‌وفور مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به اهمیت کاربردی رنگدانه‌های زیستی، بهینه‌سازی شرایط تولید آن‌ها در حد بالاتر پیشنهاد می‌شود [۲،۳]. یکی از مهم‌ترین آن‌ها رنگدانه قرمز تری پیرولی سراشیا مارسسنس به نام Prodigiosin است که به دلیل فعالیت‌های ضدقارچی، ضدسرطانی، ضدمالاریا، سرکوب‌کنندگی پاسخ ایمنی و فعالیت ضدپرولیفراسیون، ترکیبی امیدوارکننده در صنعت داروسازی است [۴،۵]. این ماده اخیراً به سبب توانایی آن در ماشه‌کشی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی، به روشی پیچیده شامل مهار فسفاتاز، برش ساختار دورشته‌ای DNA و یا ایجاد

1. Serratia
2. Serratia marcescens
3. Biopigments

* **نویسنده مسئول:**
دکتر کیومرث امینی
نشانی: ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.
تلفن: ۵۴۵۴۰۷۴ (۹۱۲) ۹۸+
رایانامه: kamini@iau.saveh.ac.ir

اختلال در شیب pH موجود در غشا، مورد توجه قرار گرفته است. همچنین به عنوان یک ماده رنگی و رنگ‌کننده کاربرد دارد [۶، ۷]. این رنگدانه یک متابولیت ثانویه ویژه محسوب می‌شود [۶] و تولید آن تنها در درصد کمی از ایزوله‌ها مشاهده می‌شود [۳، ۸]. در مطالعه حاضر از طریق روش T-A، کلونینگ تولید این رنگدانه در باکتری Ecoli XL1blue به انجام رسیده و تأیید انجام فرایند کلونینگ توسط سنجش میزان بیان ژن مورد نظر ارزیابی شده است. همچنین از طریق رسم درخت فیلوژنتیکی، خویشاوندان نزدیک باکتری سراشیا مارسنس جهت مطالعات آینده برای بهینه‌سازی فرایند تولید رنگیزه پرودی جیوسین معرفی شده‌اند.

روش بررسی

نمونه‌برداری

صد نمونه از منابع بالینی بیماران بستری دارای عفونت ادراری در بیمارستان‌های مختلف ساوه جداسازی و به صورت استریل به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل شد.

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به سراشیا از طریق روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی

بررسی‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز و استفاده از محیط‌های افتراقی مانند MRVP، SIM، TSI و سیمون سیترات، فینل آلانین آگار و اوره و نیز تست‌های تکمیلی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها، جهت شناسایی گونه سراشیا مارسنس انجام شد. همچنین توانایی تولید رنگدانه پرودی جیوسین که اختصاصی این‌گونه است، از طریق مشاهده رنگ قرمز در کلونی‌ها، تایید شد.

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به سراشیا از طریق روش‌های مولکولی

تأیید هویت مولکولی سراشیا مارسنس، توسط PCR ژن ۱۶sr-RNA با استفاده از پرایمرهای ارائه‌شده در جدول شماره ۱، به انجام رسید. سپس محصول PCR به منظور سکانس برای شرکت Bioneer ارسال شد و نتیجه سکانس در پایگاه داده NCBI، BLASTشد.

- کلون کردن ژن رنگدانه پرودی جیوسین در باکتری Ecoli XL1blue
- شناسایی ژن pig توسط واکنش PCR

استخراج DNA باکتری توسط کیت استخراج مرکز ملی ذخایر ژنتیکی انجام شد. محصولات استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شده سپس واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ژن پرودی جیوسین (جدول شماره ۱) انجام شد. سویه سراشیا مارسنس تولیدکننده ژن‌های موردنظر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

TA Cloning

به منظور کلون کردن محصول PCR، از کیت PCR TA-Cloning شرکت سینا ژن استفاده شد[4]. وکتور PTG19-T به عنوان ناقل، BamH1 به عنوان آنزیم محدودگر، و باکتری E.Coli سویه XL1blue به عنوان میزبان به کار گرفته شد. غربالگری ورود وکتور به میزبان توسط محیط دارای آمپی‌سیلین و شناسایی باکتری‌های نوترکیب توسط غربالگری سفید ـ آبی در محیط IPTG-XGAL انجام شد. تأیید حضور ژن Pig درون کلونی‌های سفید توسط انجام PCR با پرایمرهای M13 و سپس تعیین توالی ناحیه مذکور و همچنین مقایسه طول محصولات PCR قبل و بعد از انجام فرایند کلونینگ انجام شد.

تعیین میزان بیان ژن پرودی جیوسین در باکتری‌های نوترکیب حاصل با روش Real time PCR

به منظور تأیید کارایی فرایند کلونینگ، لازم است که بیان ژن کلون‌شده در کلونی‌های حاصل مورد ارزیابی قرار گیرد. بدین منظور استخراج RNA توسط میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) از سوسپانسیون باکتریایی کلونی‌های سفید در فاز نمایی رشد (در OD۶۰۰= ۰/۴-۰/۶) انجام گرفت. سنتز CDNA با استفاده از آنزیم AMV Reverse Transcriptase و واکنش Real Time PCR با استفاده از کیت شرکت Genet bio کره جنوبی به انجام رسید. ژن خانه‌دار ۱۶s به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با کنترل منفی که باکتری E.coli فاقد ژن پرودی جیوسین بود، انجام شد.

رسم درخت فیلوژنی

با استفاده از پرایمرهای ارائه‌شده در جدول شماره ۱، PCR ژن‌های 16srRNA، در دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد و تعیین توالی در شرکت Bioneer انجام شد. توالی‌های حاصله پس از بررسی در نرم‌افزار BioEdit، توسط DNA Baser مکمل‌سازی شد. نتیجه با جدایه‌های ثبت‌شده در NCBI از طریق n Blast مقایسه شد و سپس در نرم‌افزار W Clustal هم‌ردیف شدند. سپس با استفاده از برنامه MEGA-۵ درخت‌های فیلوژنیک ترسیم شدند و با استفاده از روش الحاق ترسیم M در برنامه Neighbor Joining (روش پیوند همجوار NJ) همسایه شدند. پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به‌دست‌آمده با استفاده از نرم افزار Excel، نمودار مربوطه رسم شد [۹].

4. https://www.cinnagen.com

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تکثیر ژنهای ***pis*** و 16srRNA

Primer Name	Primer Sequence
PigA F	TCGGCATGTCCTTCTCGCTCT
Pig A R	CCTGGCATCCCTTTCTCGAGCA
16srRNA F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16srRNA R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

یافته‌ها

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به سراشیا از طریق روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی

نتایج کشت سلول‌های سراشیا مارسنس در تصویر شماره ۱ و نتایج مرتبط با ویژگی‌های مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و نتایج تست‌های بیوشیمیایی در جدول شماره ۲ ارائه شده است. این یافته‌ها در جداسازی باکتری مورد نظر به کار گرفته شد. به طور کلی از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده، بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی، دوازده ایزوله سراشیا مارسنس جداسازی شد.

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به سراشیا از طریق روش‌های مولکولی

فرایند BLAST انطباق توالی حاصل از تعیین توالی سنگر را با توالی رفرنس سراشیا مارسنس موجود در پایگاه داده NCBI تأیید کرد (تصویر شماره ۲).

- کلون کردن ژن رنگدانه پرودی جیوسین در باکتری Ecoli XL1blue
- شناسایی ژن pig توسط واکنش PCR

در این مرحله از دوازده ایزوله سراشیا مارسنس جداسازی‌شده چهار سویه واجد ژن pig شناسایی شد (تصویر شماره ۳). وجود محصول PCR در ناحیه ۳۳۴ جفت باز، نشان‌دهنده وجود ژن pig در باکتری مورد بررسی خواهد بود. در تصویر شماره ۳، چهار ریکشن، تولید باند مربوط به ژن pig را به همراه داشته‌اند.

- تولید کلون‌های نوترکیب در T-A Cloning

حضور کلونی‌های سفید و آبی در تصویر شماره ۴ نشان داده شده است که موید وجود کلونی‌های نوترکیب در محیط کشت IPTG-Xgal است. نتیجه الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR تولیدشده توسط پرایمرهای M13، قبل و بعد از فرایند کلونینگ در تصویر شماره ۵ ارائه شده است. اختلاف طول این محصولات نیز مؤید ورود قطعه ژنی موردنظر به درون سلول است. همچنین تعیین توالی ناحیه اتصال وکتور ـ Insert نیز نشان‌دهنده انجام نوترکیب در سلول است (تصویر شماره ۶).

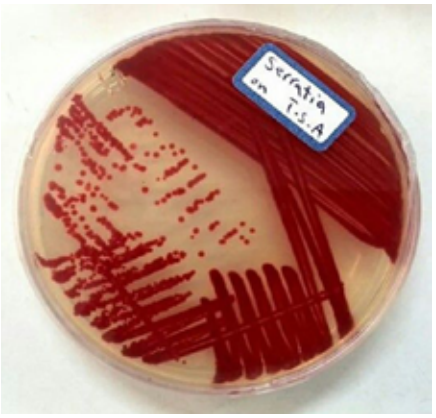
بررسی میزان بیان ژن pig کلون‌شده توسط PCR Real time

نتایج استخراج RNA در تصویر شماره ۷ نشان داده شده است. همچنین منحنی سنتز Real Time PCR نیز در تصویر شماره ۸ ارائه شده است. همان‌طور که در این تصویر مشخص است، میزان بیان ژن pig در دو منحنی ایجادشده توسط E.coli اولیه (زرد) و E.coli به‌کاررفته در کلونینگ ژن pig (سبز)، تفاوت

جدول ۲. ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های سراشیبا مارسنس حاصل از غربالگری

No.	Biochemical Tests	Results
۱.	Gram satin	Gram-negative Rod
۲.	Catalase Test	+
۳.	Motility test	+
۴.	DNase	+
۵.	Oxidase test	-
۶.	Methyl read test	-
۷.	Gelatin hydrolysis	+
۸.	Growth at 40 ºC	+

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور



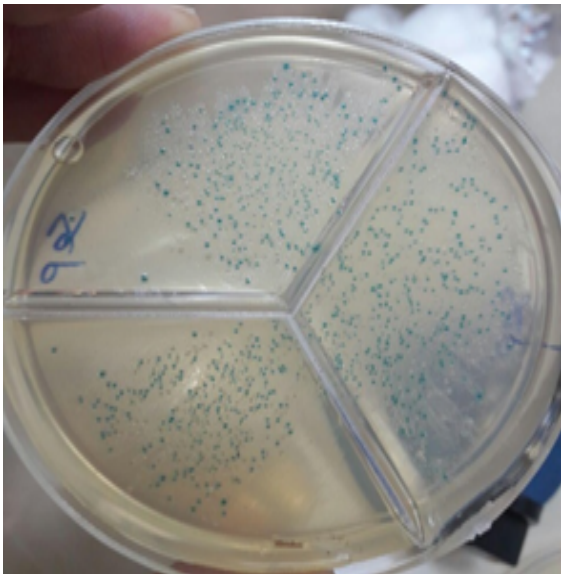
مجله علمی پزشکی جندی شاپور

تصویر ۱. کلونی‌های قرمز رنگ سراشیا مارسنس

چشمگیری نشان می‌دهد. به طوری که در نمودار زرد هیچ بیانی از ژن pig قابل مشاهده نیست و در عوض در نمودار سبزرنگ باکتری نوترکیب حاصل، میزان چشمگیری از پروتئین pig را تولید کرده است.

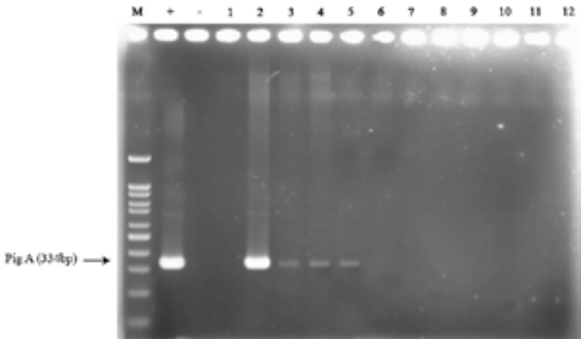
درخت فیلوژنی

نتایج الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای عمومی 16sr-RNA در تصویر شماره ۹ نشان داده شده است. همچنین نتایج رسم درخت فیلوژنتیکی در تصویر شماره ۹ ارائه شده است. نتایج درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که گونه‌های Se-ratia marcence با بوت استرپ ۱۰۰ درصد و Sera-tia palmy uthica با بوت استرپ ۱۰۰ درصد در یک کلاد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن‌ها با هم است (تصویر شماره ۱۰). این گونه‌ها قادر



مجله علمی پزشکی جندی شاپور

تصویر ۳. کلونی‌های آبی و سفید حاصل از کلون سازی ژن Pig



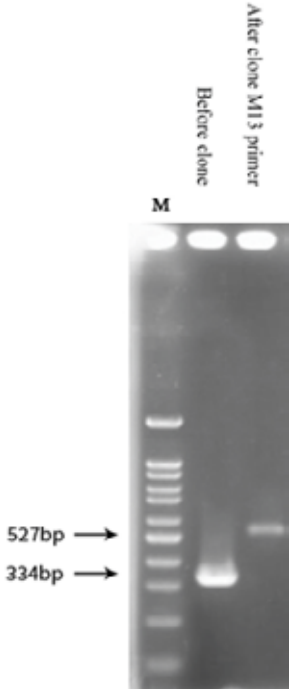
مجله علمی پزشکی جندی شاپور

تصویر ۲. نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه‌های pig مثبت از نمونه ۱ تا ۱۲، به ترتیب از چپ به راست: DNA Ladder، + کنترل مثبت، - کنترل منفی

هستند که به منظور تولید رنگدانه پرودی جیوسین در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرند.

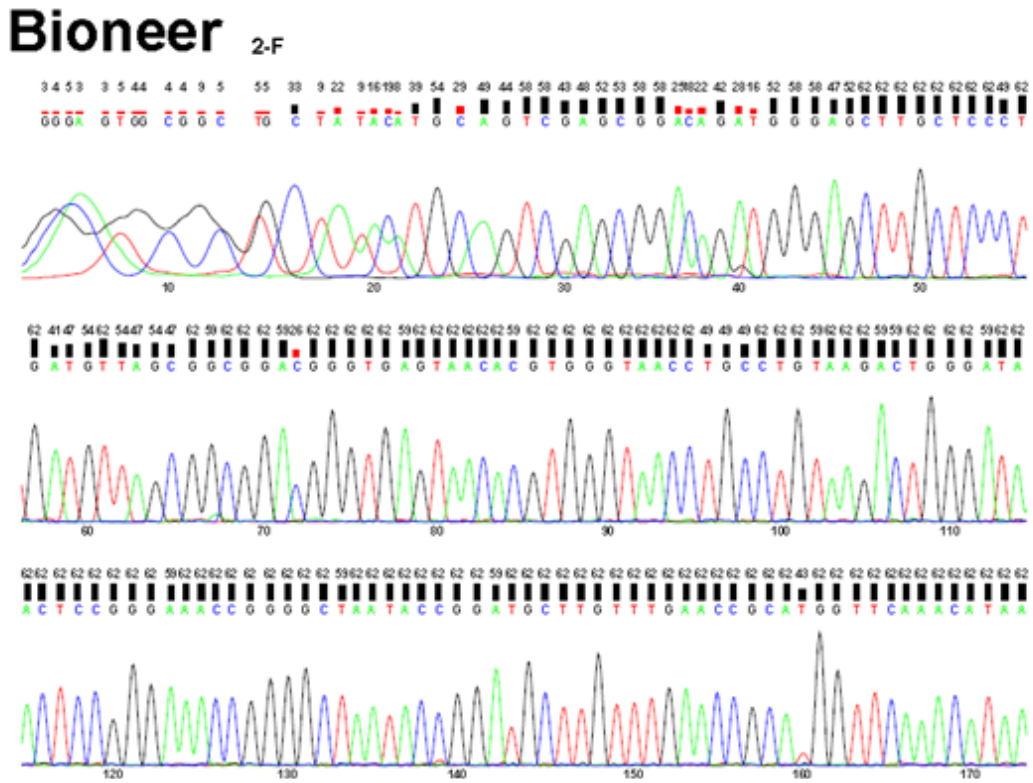
بحث

سراشیا، باکتری گرم منفی و متحرک و دارای کپسول کوچکی است و کلونی‌های آن دارای رنگیزه سفید-صورتی و یا قرمز هستند. سراشیا مارسنس از گونه‌های معروف آن است و اهمیت بالایی دارد. پرودی جیوسین یک تری پیرول است و اولین بار در سراشیا ما ر سنس



مجله علمی پزشکی جندی شاپور

تصویر ۴. الکتروفورز محصول PCR انجام شده توسط پرایمرهای M۱۳ بر روی کلون‌های نوترکیب و غیر نوترکیب و تایید وجود قطعه‌ی insert درون وکتور نوترکیب (ژل اگارز ۲ درصد)



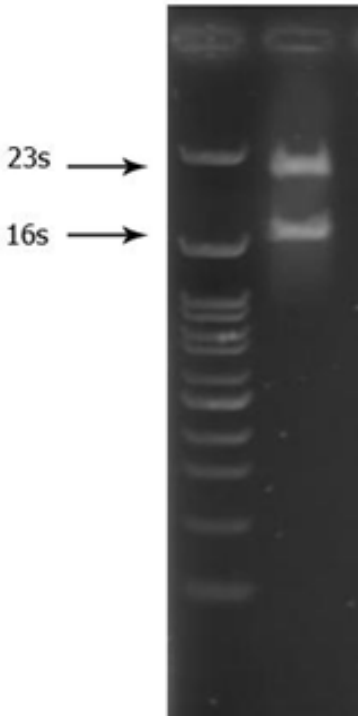
تصویر ۵. نتیجه سکانس و بلاست جهت تعیین هویت مولکولی گونه سراشیا مارسنس

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

شناسایی شد که کلونی‌های قرمز صندوقی شکل زیبایی را ایجاد می‌کند [۱۰]. تولید رنگدانه‌ها در درصد کمی از ایزوله‌ها دیده می‌شود. مطالعات اخیر خواص ضدقارچی و ضدسرطانی این رنگدانه و اهمیت آن را در صنایع داروسازی نشان داده است. رنگدانه‌های تولیدشده توسط باکتری‌ها کارایی زیادی به عنوان فراورده‌های مهم دارویی دارند. به منظور افزایش توانایی باکتری در سنتز مقادیر زیادی رنگدانه، محیط‌های مختلف، نقش دما، رشد میکروارگانیسم در محیط‌های مختلف و تولید رنگدانه مورد مطالعه قرار گرفته است [۸، ۱۰]. یک محیط می‌تواند رشد باکتری را حمایت و تقویت کند و در زمان‌های مشابه موجب افزایش سطح تولید رنگدانه شود. خنافری و همکاران، شرایط بهینه تولید رنگدانه پرودی جیوسین توسط سراشیا مارسنس را با روش اسپکتروفتومتری ماورای بنفش در طول موج ۵۳۵ نانومتر بررسی کردند. به منظور خالص‌سازی رنگیزه‌های تولیدی از روش کروماتوگرافی ستونی استفاده شد. بهترین محیط کشت برای بیشترین میزان تولید این رنگدانه محیط‌های peanut broth و Sesame seed broth و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گزارش شد [۱۱]. حسینی‌دوست و همکاران باکتری‌های واجد فعالیت پروتئازی و رنگدانه پرودی جیوسین را از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده از شالیزارهای مازندران جداسازی کردند. سپس وزن مولکولی آنزیم‌های سراشیو پپتیداز تولیدشده در این باکتری‌ها را توسط روش SDS–PAGE سنجیدند و ایزوله‌های تولیدکننده رنگدانه پرودی جیوسین را تعیین هویت کردند. وزن ملکولی آنزیم تقریباً 52kda برآورد شده، و بهترین محیط کشت برای بیشترین میزان تولید این رنگدانه، محیط کشت Skim milk broth و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گزارش شد [۱۲]. حسینی و همکاران رنگدانه قرمز پرودی جیوسین را از باکتری سراشیا استخراج کرده و سپس خاصیت ضدباکتریایی این ترکیب را در غلظت‌های مختلف (۰/۰۷، ۰/۰۸ و ۰/۰۹ میلی‌لیتر) علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت آگار ارزیابی کردند. نتایج مطالعه خاصیت ضدباکتریایی این رنگدانه را تأیید کرد [۱۳].

نورا[5] و همکاران به بررسی تأثیر شرایط مختلف در تولید بهینهی انواع پروتئین‌های باکتریایی از جمله رنگدانه مورد بحث پرداختند [۲]. هادیکس[6] و همکاران به مقایسه بازدهی هر دو روش کشت دسته‌ای و روش‌های رشد شیمیایی پرداخته و تأثیر رنگدانه‌های سراشیا را بر میزان تولید ATP در فازهای مختلف رشد باکتری بررسی کردند. نتایج حاصل از هر دو دسته کشت و chemo-stat نشان داد که سلول‌های رنگدانه به عنوان دوغاب باکتری S. marcescens تقریباً دو برابر عملکرد زیست توده رشد می‌کنند

5. Nora
6. Haddix



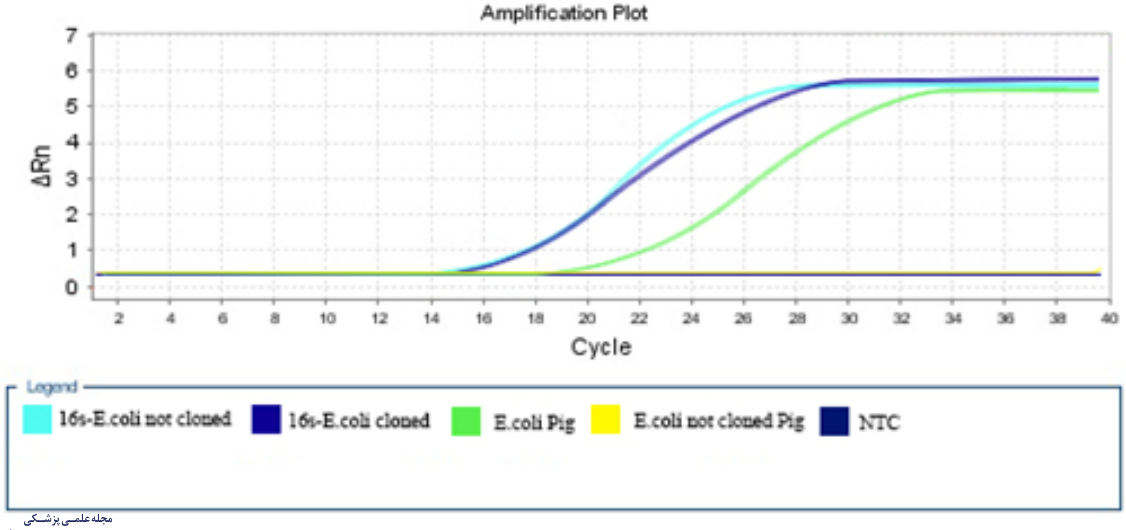
شکل ۶ الکتروفورز محصول استخراج RNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

و تولید پرودی جیوسین می‌تواند مزایای رشد را در دمای محیط فراهم کند [۸]. این مطالعات از آن جهت که در جستوجوی شرایط بهینه و ارزان در تولید رنگدانه پرودی جیوسین هستند، با مطالعه حاضر هم‌خوانی و انطباق دارند.

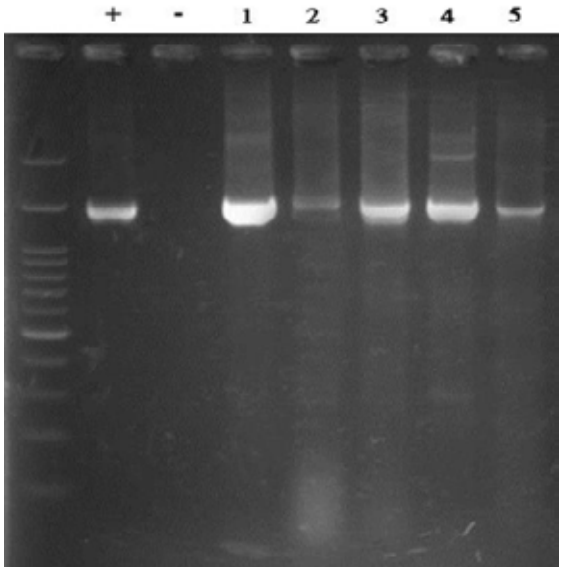
در مطالعهی انجام‌شده توسط داونهاور[۷] و همکاران، از روش کلون‌سازی T–A درون باکتری E.coli به منظور تولید رنگدانه پرودی جیوسین استفاده شد. در این مطالعه همانند آنچه در مطالعه حاضر انجام شد، میزان بیان ژن کدکننده رنگیزه مذکور به روش PCR مورد سنجش قرار گرفته است. نتایج این مطالعه به سبب آنکه میزان بیان ژن پرودی جیوسین را در باکتری‌های دریافت‌کننده پلاسمید نوترکیب بیش از باکتری‌های طبیعی اعلام کرده است، با مطالعه حاضر انطباق دارد. به عبارت دیگر محققان مذکور اعلام کرده‌اند که میزان بیان مناسبی از ژن پودی جیوسین توسط روش کلونیگ ژن آن در باکتری‌های مناسب میزبان، قابل

7. Dauenhauer



مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۷. منحنی تکثیر ژن pig توسط Real Time PCR



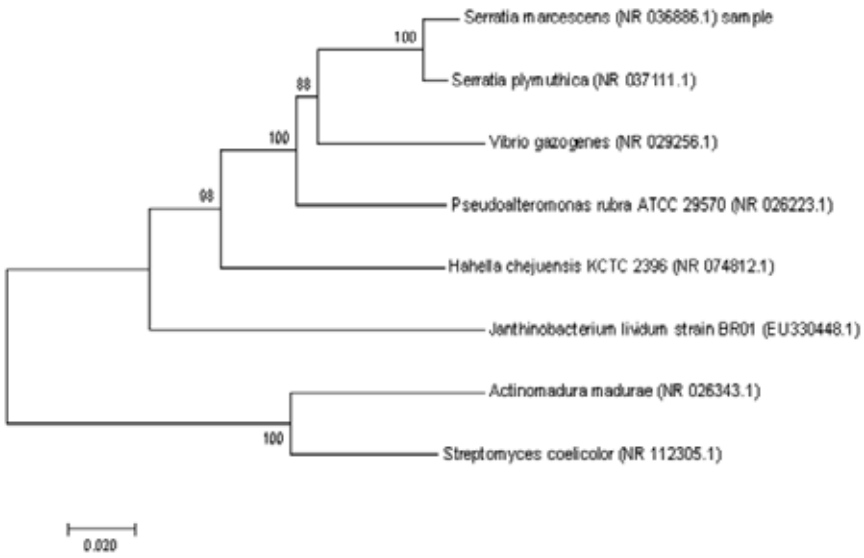
مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۸. الکتروفورز محصولات PCR ژن‌های 16srRNA سراشیامارسنس. چاهک اول مارکر ۵۰۰ جفت بازی، دوم کنترل مثبت و سوم کنترل منفی (ژل آگارز ۱/۵٪)

دستیابی است [۳]. در مطالعه انجام‌شده توسط ژو[8] و همکاران با استفاده از روش‌های مولکولی و با ارزیابی 16SrDNA و 23SrDNA سویه‌های مختلف باکتری سراشیا مارسنس به لحاظ خویشاوندی ارزیابی شد [۱۴]. این مطالعه به لحاظ آنکه در جست‌وجوی روابط خویشاوندی باکتری سراشیا مارسنس از طریق روش‌های دقیق مولکولی ارزیابی ژن‌های کدکننده rRNA ها بوده است، با مطالعه حاضر انطباق دارد. در مطالعه انجام‌شده توسط هریس[9] و همکاران خوشه‌های ژنی درگیر در تولید رنگدانه پرودی جیوسین، که تحت عنوان pig cluster نامیده شده بودند، از دو سویه متفاوت سراشیا کلون شده، تعیین توالی و نیز ارزیابی بیان شدند. در این مطالعه مانند مطالعه حاضر به بررسی و ارزیابی میزان بیان ژن پرودی جیسوسین پرداخته شده است و واریانت‌های توالی مشاهده‌شده در دو باکتری موردبررسی، جهت ارزیابی روابط تکاملی آن‌ها و

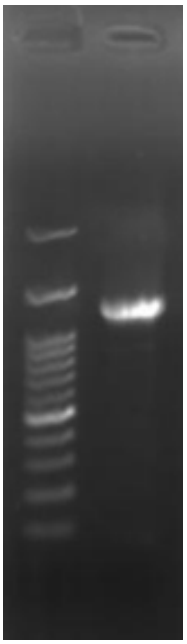
8. Zhu

9. Harris



مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۹. درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن 16S r DNA سراشیا مارسنس



مجله علمی پزشکی جنـــدی شـــاپور

تصویر ۱۰. نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی 16SrRNA به منظور تعیین هویت مولکولی جنس سراشیا

میزان خویشاوندی مورد استفاده قرار گرفته است [۱۵]. در مطالعه انجام‌شده توسط خان[10] و همکاران، پس از بررسی تمام ژنوم سراشیا مارسنس و ترسیم درخت فیلوژنیک، خویشاوندی نزدیک باکتری مذکور با باکتری سراشیا پالمیوتیکا به اثبات رسید. نتایج این مطالعه با نتایج ارزیابی خویشاوندی انجام‌شده در مطالعه حاضر انطباق دارد [۱۶]. رنگدانه‌های پرودی جیوسین مواد شیمیایی آلی را جذب کرده و متخصصان داروساز نقش آن را در درمان بیماری‌های عفونی مانند مالاریا به عنوان عوامل ایمنی یک دلیل عمده برای بررسی بیشتر کلونی‌های باکتریایی سراشیا مارسنس می‌دانند. این بررسی‌ها ویژگی‌ها و قابلیت‌های بالقوه پرودی جیوسین را برجسته خواهد کرد. همچنین نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی انجام‌شده در مطالعه حاضر قادر است تعدادی از خویشاوندان نزدیک باکتری سراشیا مارسنس را به عنون کاندیدای مطالعات بعدی و نیز منبعی از رنگیزه مفید مورد بحث، معرفی کند. با انجام مطالعات بیشتر بر روی سایر سویه‌های تولیدکننده رنگیزه پرودی جیوسین و نیز به کار بردن میزبان‌های کلونینگ پرتوان‌تر، می‌توان تحقیق انجام‌شده در مطالعه حاضر را تکمیل کرد و نقاط ضعف آن را که ممکن است در انتخاب میزبان یا سویه تولیدکننده رنگیزه و یا روش کلونینگ به کار رفته باشد، جبران کرد. همچنین لازم است که در مطالعات آتی، پروتئین پرودی جیوسین تولیدشده به روش کلونینگ، مورد ارزیابی ساختاری و عملکردی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

پرودی جیوسین به دلیل ویژگی‌های گزارش‌شده از قبیل فعالیت‌های ضدقارچی، سرکوب‌کننده‌های ایمنی بدن و ضدپرولیفراسیون، یک داروی امیدوارکننده به نظر می‌رسد. همچنین مطالعات اخیر خواص ضدباکتریایی و ضدسرطانی این رنگدانه و اهمیت آن را در صنایع داروسازی نشان داده است و تولید گسترده آن به صورت تجاری، برای ساخت دارو مورد نیاز است. فرایند تولید این رنگدانه به صورت پیش‌سازهای منو و بی‌پیرول است که به صورت جداگانه سنتز شده و سپس به شکل نهایی پرودی جیوسین ترکیب می‌شوند. تولید رنگدانه‌ها تنها در درصد کمی از ایزوله‌های میکروبی دیده می‌شود. سراشیا مارسنس از جمله منابع میکروبی تولیدکننده پرودی جیوسین شناخته شده است. بنابراین نیاز به تکثیر ژن این رنگدانه از منابع باکتریایی تولیدکننده آن، حائز اهمیت ویژه است. به همین دلیل در این پژوهش ژن pig از باکتری سراشیا مارسنس ایزوله شده از ادرار بیماران استخراج و با موفقیت به باکتری E.coli منتقل شد تا این آنزیم با توان بالاتر و صرفه اقتصادی بیشتر در E.coli به صورت نوترکیب تولید شود. بررسی‌های بیشتر برای پیدا کردن سویه‌های جدید تولیدکننده پرودی جیوسین می‌تواند منجر به پیدا کردن منابع توانمندتر شود. ضمن آنکه یافتن باکتری سراشیا مارسنس در منابع مختلف و فراوان، می‌تواند ذخیره‌ای غنی برای کارخانجات تولیدکننده مواد مفید زیستی باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

اصول اخلاقی تماماً در این مقاله رعایت شده است.

حامی مالی

ایـن تحقیـق هیـچ گونـه کمـک مالـی از سـازمان‌های تأمیـن مالـی در بخش‌هـای عمومـی ، تجـاری یـا غیرانتفاعـی دریافـت نکـرد.

مشارکت نویسندگان

هر دو نویسنده در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

10. Khan

Refrence

[1] Mahlen SD. Serratia infections: From military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(4):755-91. [DOI:10.1128/CMR.00017-11] [PMID] [PMCID]

[2] Elkenawy NM, Yassin AS, Elhifnawy HN, Amin MA. Optimization of prodigiosin production by Serratia marcescens using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. Biotechnol Rep. 2017; 14:47-53. [DOI:10.1016/j.btre.2017.04.001] [PMID] [PMCID]

[3] Dauenhauer SA, Hull R, Williams RP. Cloning and expression in Escherichia coli of Serratia marcescens genes encoding prodigiosin biosynthesis. J Bacteriol. 1984; 158(3):1128-32. [DOI:10.1128/jb.158.3.1128-1132.1984] [PMID]

[4] Faraag AH, El-Batal AI, El-Hendawy HH. Characterization of prodigiosin produced by Serratia marcescens strain isolated from irrigation water in Egypt. Nat Sci. 2017; 15(5):55-68. [DOI:10.7537/marsnsj150517.08]

[5] Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P. An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. Electron J Biol. 2009; 5(3):49-61. https://ejbio.imedpub.com/an-insightful-overview-on-microbial-pigment-prodigiosin.php?aid=5945

[6] Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. Int J Syst Evol Microbiol. 2001; 51(3):915-24. [DOI:10.1099/00207713-51-3-915] [PMID]

[7] Saha S, Thavasi R, Jayalakshmi S. Phenazine pigments from Pseudomonas aeruginosa and their application as antibacterial agent and food colourants. Res J Microbiol. 2008; 3(3):122-8. [DOI:10.3923/jm.2008.122.128]

[8] Haddix PL, Shanks RMQ. Prodigiosin pigment of Serratia marcescens is associated with increased biomass production. Arch Microbiol. 2018; 200(7):989-99. [DOI:10.1007/s00203-018-1508-0] [PMID] [PMCID]

[9] Priya KA, Satheesh S, Ashokkumar B, Varalakshmi P, Selvakumar G, Sivakumar N. Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of Serratia marcescens CMST 07. In: Velu R, editor. Microbiological Research in Agroecosystem Management. New Delhi: Springer; 2013. pp. 11-21. [DOI:10.1007/978-81-322-1087-0_2]

[10] Ghaith DM, Zafer MM, Ismail DK, Al-Agamy MH, Bohol MFF, Al-Qahtani A, et al. First reported nosocomial outbreak of Serratia marcescens harboring bla_{IMP-4} and bla_{VIM-2} in a neonatal intensive care unit in Cairo, Egypt. Infect Drug Resist. 2018; 11:2211-7. [DOI:10.2147/IDR.S174869] [PMID] [PMCID]

[11] Giri AV, Anandkumar N, Muthukumaran G, Pennathur G. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil. BMC Microbiol. 2004; 4:11. [DOI:10.1186/1471-2180-4-11] [PMID] [PMCID]

[12] Al-Ansari M, Alkubaisi N, Vijayaragavan P, Murugan K. Antimicrobial potential of Streptomyces sp. to the Gram positive and Gram negative pathogens. J Infect Public Health. 2019; 12(6):861-6. [DOI:10.1016/j.jiph.2019.05.016] [PMID]

[13] de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by Streptomyces. Braz J Infect Dis. 2012; 16(5):466-71. [DOI:10.1016/j.bjid.2012.08.014] [PMID]

[14] Zhu H, Zhou WY, Xu M, Shen YL, Wei DZ. Molecular characterization of Serratia marcescens strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. Lett Appl Microbiol. 2007; 45(2):174-8. [DOI:10.1111/j.1472-765X.2007.02166.x] [PMID]

[15] Harris AKP, Williamson NR, Slater H, Cox A, Abbasi S, Foulds I, et al. The Serratia gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species-and strain-dependent genome context variation. Microbiology. 2004; 150(11):3547-60. [DOI:10.1099/mic.0.27222-0] [PMID]

[16] Khan AR, Park GS, Asaf S, Hong SJ, Jung BK, Shin JH. Complete genome analysis of Serratia marcescens RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. PloS One. 2017; 12(2):e0171534. [DOI:10.1371/journal.pone.0171534] [PMID] [PMCID]