مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

آنالیز پروتئوم سویه وحشی و موتانت کورینه باکتریوم گلوتامیکوم حاصل از پرتوتابی گاما با استفاده از الکتروفورز دوبعدی

زهرا خردمند[۱]، پروین شورنگ*[۲] و صابر گلکاری[۱]
۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، ۲- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای

چکیده: به منظور بررسی پروتئوم سویه وحشی و موتانت *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* نمونه‌های باکتریایی به دستگاه پرتوتابی گاما انتقال داده شد و در ۴ تکرار با دزهای ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ گری پرتوتابی شد. میزان جمعیت باکتری بعد از گذشت ۲۴ ساعت تخمیر با استفاده از نمودار استاندارد log cfu/ml در برابر دانسیته نوری به‌دست آمد. با استفاده از شاخصی که بر اساس تقسیم مقدار لیزین تولیدی (mg/ml) بر log cfu/ml به‌دست آمد (مقدار تولید لیزین به ازای جمعیت)، نمونه‌هایی که دارای شاخص بیشتر (دز ۲۰۰ گری) نسبت به شاهد بود انتخاب شد و جهت انجام آزمایش‌های مولکولی استفاده شد. باکتری وحشی ATCC13032 و موتانت آن در محیط مایع کشت داده شد، پروتئین آن‌ها استخراج شد و تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد انجام شد. بررسی الگوی پروتئینی در هر دو سویه با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی انجام شد. نتایج به‌دست آمده از مقایسه ژل الکتروفورز در دو سویه ، نشان دهنده تفاوت بیان پروتئین ها بود و تعداد پروتئین های بیان شده در سویه موتانت بیشتر از سویه وحشی بود. طبق نتایج، پرتوتابی با دز ۲۰۰ گری قادر به ایجاد جهش در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* و افزایش تولید لیزین در این باکتری است به طوری که سویه موتانت در مدت ۳ روز قادر به تولید ۳۸ گرم در لیتر لیزین بود درحالی‌که سویه وحشی در همین مدت ۱۳گرم در لیتر لیزین تولید کرد.

واژگان کلیدی: ***کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، پروتئوم، الکتروفورز دو بعدی**

Proteomicanalysis of wild type and mutant *Corynebacterium glutamicum* exposed to gamma radiation using two-dimensional gel electrophoresis

Zahra Kheradmand[1], Parvin Shawrang*[2] and Saber Golkari[1]
1. Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh, Iran;
2. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran

Abstract: In order to study the proteomic analysis of wild and mutant *Corynebacterium glutamicum*, pure bacteria samples in four replicates were subjected to the gamma radiation at doses of zero, 100, 200 and 300Gy. The population of bacteria after 24hours of fermentation was obtained using a standard curve log cfu/ml in the optical density. Using an index based on the division of lysine production(mg/ml) on log cfu/ml (lysine production rate per population), samples that had the higher index (obtained at dose of 200 Gy) as compared to the control were selected and used for molecular trials. The wild and mutant types of bacteria (ATCC 13032) were cultured in separate broth, then their protein extracted and protein concentration measured based on Bradford assay. The protein profile of both strains was performed using two-dimensional gel electrophoresis. Comparing the results of gel electrophoresis between two strains indicates differences in expressed proteins; expressed proteins in mutant strain were higher than the wild type. As a result, irradiation at dose of 200 Gy was effective to cause mutation in *Corynebacterium glutamicum* and increase in lysine production, accordingly, the mutant strain in three days produced 38 g/l L-lysine while the wild type at the same time produced only 13 g/l L-lysine.

Keywords: ***Corynebacterium glutamicum*, Proteome, Two-dimensional electrophoresis.**

مقدمه

کورینه باکتریوم گلوتامیکوم یکی از میکروارگانیسم‌های مهم در صنعت محسوب می‌شود و اولین بار در ژاپن برای تولید گلوتامیک اسید مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اهمیت بارز اسید آمینه لیزین و باکتری تولید کننده این اسید آمینه در صنعت، آنالیز پروتئوم این باکتری به منظور شناخت ساختار و عملکرد پروتئوم آن امری ضروری است. در سویه وحشی به‌دلیل وجود مکانیسم‌های تنظیم متابولیکی مختلف، اسیدآمینه لیزین به میزان کمی سنتز می‌شود و نمی‌تواند برای تولید صنعتی مورد استفاده قرار گیرد؛ اما با دست‌کاری متابولیسم می‌توان تولید آن را افزایش داد [۱]. موتاسیون از جمله روش‌های موفق برای به دست آوردن سویه‌های پرتولید است. هدف از این مطالعه بررسی نقشه پروتئینی سویه وحشی و موتانت باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* با استفاده از الکتروفورز دوبعدی است؛ الکتروفورز دوبعدی یکی از رایج‌ترین و قدرتمندترین روش‌های جداسازی پروتئین‌ها است که پروتئین‌ها را بر اساس دو عامل متفاوت یعنی بار الکتریکی و جرم مولکولی از یکدیگر جدا می‌کند.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در محیط کشت مایع: در ابتدا محیط کشت مایع تهیه و در اتوکلاو استریل شد پس از آن در ابتدا میزان ۲۰۰ ماکرولیتر از محلول باکتریایی ذخیره شده به ۵ میلی لیتر محیط کشت استریل افزوده شد (۳۰ گرم در لیتر Tryptic Soy Broth) و به مدت ۲۰ ساعت در انکوباتور شیکر با دور ۱۵۰ انکوبه شد.

استخراج پروتئین باکتری: نمونه باکتری از شیکر انکوباتور خارج شد و نمونه‌ها از لوله‌ها به میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد،چند مرتبه میکروتیوپ‌ها با سرعت g × ۷۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. طی هر بار سانتریفیوژ، سوپرناتانت (محلول بالایی) دور ریخته شد و پلت (محلول زیرین) جمع آوری شد. پلت جمع آوری شده با محلول بافر فسفات سالین که ترکیبی از ۴ نمک شامل KH_2PO_4, NaCl, KCl و Na_2HPO_4 است، ۴ مرتبه شستشو داده شد و سانتریفیوژ شد طی هر بار سانتریفیوژ سوپرناتانت دور ریخته شد و پلت درون میکروتیوپ باقی ماند.

لیز سلولی: این مرحله به منظور شکستن دیواره سلولی و استخراج پروتئین به کمک روش‌های شیمیایی و فیزیکی انجام شد. در ابتدا به مقدار ۱ میلی‌لیتر بافر لیز کننده[1] (جدول۱) به هر میکروتیوپ حاوی پلت نمونه باکتریایی اضافه شد. محلول حاصل درون لوله های آزمایش استریل ریخته شد و تعداد ۴ بید شیشه‌ای درون هر لوله قرار داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن آزمایشگاهی هم زده شد. بعد از آن، مرحله شکستن دیواره باکتری‌ها به‌وسیله دستگاه سونیکاتور (امواج فراصوت) به مدت ۲۰ دقیقه و با استفاده از تکه‌های یخ انجام شد. در مرحله بعد به‌منظور شکستن دیواره سلول مرحله فریز- دفریز کردن با ۷-۵ مرتبه قرار دادن مکرر میکروتیوپ‌های حاوی نمونه در نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) و خارج کردن آن‌ها انجام شد؛ سپس

[1] Lysis Buffer

با انجام دادن سانتریفیوژ با دور g ×۲۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد سوپرناتانت را برداشته و پلت دورریخته شد. سوپرناتانت‌های موجود در چند میکروتیوپ مربوط به یک نمونه با هم یکی شد. بعد از اضافه کردن ۵ - میکرولیتراز آنزیم DnaseI و۱۰میکرولیتر از آنزیم RNase به سوپرناتانت‌ها، به مدت ۳۰ دقیقه درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ×۲۵۰۰۰ سانتریفیوژ در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پروتئین استخراج شده از مرحله قبل به مدت ۲۴ ساعت به دستگاه لیوفیلیزه منتقل شد پس از آن تعیین غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد [۲] انجام شد. مراحل الکتروفورز دوبعدی به‌منظور بررسی نقشه‌های پروتئینی در سویه وحشی و موتانت با استفاده از کیت استارتر الکتروفورز (Bio-Rad) انجام شد.

جدول۱- ترکیبات سازنده بافر لیز کننده

اجزای بافر لیز کننده	مقادیر
Tris-Hcl.PH:7.4	0.01M
EDTA	1mM
Urea	8M
DTT	18mM
CHAPS	3%
Biolyteampholyte .PH:3-10	1.5%(v/v)
Glycerol	10%(v/v)

نتایج و بحث

با مقایسه ژل مربوط به باکتری وحشی و موتانت مشاهده شد که لکه‌ها در ژل مربوط به باکتری موتانت بیشتر در قسمت بازی ژل قرار دارند و در باکتری وحشی تعداد لکه‌ها در قسمت بازی کمتر بود به عبارت دیگر پروتئین‌هایی که در نوع وحشی بیان شده بودند در نوع موتانت بیان کمتر و برخی بیان بیشتری داشتند. برخی از لکه ها فقط در یک سویه مشاهده شد و به طور کلی تعداد پروتئین‌های بیان شده در سویه موتانت بیشتر از سویه وحشی بود.

والبوئنا وهمکاران [۳] یک سویه موتانت *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ایجاد کردند و پروتئوم سویه وحشی و موتانت را با استفاده از الکتروفورز دوبعدی آنالیز کردند. در سویه موتانت بیان حداقل ۲۰ پروتئین مختلف افزایش پیداکرده بود؛ که برخی از ژن‌ها مربوط به افزایش تولید لیزین در سویه مذکور بود. نتایج نقشه پروتئین دوبعدی در مطالعه هرمن و همکاران [۴] بیش از ۱۰۰۰ لکه پروتئینی از هم جدا شده براساس نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی برای پروتئین‌های سیتوپلاسمی و حدود ۷۰۰ لکه برای پروتئین‌های غشایی را نشان داد. در حال حاضر از کل سه Mbp ژنوم کامل *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* که ۳۰۰۰ پروتئین مختلف را کد می‌کند، بیش از نیمی از آن به‌صورت نقشه‌های پروتئینی در دسترس است.

لودکه و همکاران [۵] پروتئین‌های سیتوپلاسمی سویه موتانت و وحشی را با استفاده از الکتروفورزدوبعدی آنالیز کردند. در این مقایسه بیان ۶ پروتئین در سویه موتانت افزایش پیدا کرد؛ همچنین ۳۷ لکه پروتئینی دیگر در این سویه مشخص شد که نسبت به سویه وحشی بیان کمتری داشتند.

نتیجه گیری

پرتوتابی با دز ۲۰۰ گری قادر به ایجاد جهش در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* و افزایش تولید لیزین در این باکتری است به طوری که سویه موتانت در مدت ۳ روز قادر به تولید ۳۸ گرم در لیتر لیزین بود درحالی‌که سویه وحشی در همین مدت ۱۳گرم در لیتر لیزین تولیدکرد.

مراجع

۱. صفاری، ز. (۱۳۸۷). تولیدآزمایشگاهی اسیدآمینه لیزین با استفاده از روش کلون کردن برای تولیدغذای دام. گزارش طرح پژوهشی. انیستیتو پاستور ایران.

2. Bradford, M.M, "A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal.Biochem.72:248-254, (1976).
3. Valbuena, N., M.Letek, A.Ramos, J. Ayala, D. Nakunst, J. Kalinowski, L. Mateose., and J. Agill. "Morphological changes and proteome response of corynebacterium glutamicum to a partial depletion of FtsH".Department Microbiology.152:2491-2503, (2006).
4. Hermann,T., G. Wersch, E.M. Uhlemann, R. Schmid., and A. Burkovski. "Mapping and identification of *corynebacterium glutamicum* proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing". Electrophoresis.19:3217-3221, (1998).
5. Ludke, A., Kramer, R., Burkovski, A., Schluesener, D. and A. Poetsch, "A proteomic study of *Corynebacterium glutamicum* AAA+ protease FtsH". BMC Microbiol 7: 6(2007).