کلونینگ و تعیین توالی ژن انتقال‌دهنده هگزوز ۲ (HXT2) از مخمر ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی

صالح امیری [۱*] (M.Sc)، علیرضا تاری‌نژاد [۲] (Ph.D)، غلامرضا شریفی سیرچی [۱] (Ph.D)

۱- دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

۲- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

چکیده

سابقه و هدف: ساکارومایسس سرویزیه دارای ۲۰ ژن کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده هگزوز شامل HXT1، HXT17، GAL2، SNF3 و RGT2 می‌باشد. از میان این خانواده ژنی، هفت ژن (HXT7-HXT1) نقش مهمی در فرآیند تولید الکل دارند. هدف این مطالعه شناسایی و جداسازی ژن HXT2 از ژنوم مخمر ساکارومایسس سرویزیه از طریق PCR و کلونینگ آن در وکتور دارای پروموتور بیانی مناسب به منظور پایه‌ای برای طراحی پلاسمید بیانی و نهایتاً مخمر نوترکیب در ایران بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق پس از تهیه پرایمرهای اختصاصی، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر یافت و به پلاسمید pTZ57R/T با کمک آنزیم‌های برشی EcoRI و HindIII منتقل گردید. پس از ترانسفورم pTZ57R/THXT2 به درون باکتری حد واسط اشیرشیاکلی، پلاسمید نوترکیب با روش هضم آنزیمی و نرم‌افزاری مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ژن HXT2 که به وسیله Restriction Enzyme از پلاسمید pTZ57R/THXT2 جدا شده بود دارای اندازه صحیح در الکتروفروز ژل آگاروز می‌باشد. بررسی نرم‌افزاری نشان داد که این ژن پروتئین با وزن مولکولی ۵۹/۸۴۰ کیلو دالتون را کد کرده و دارای ۵۴۱ اسیدآمینه و نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۳ می‌باشد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ژن HXT2 از طریق بهینه‌سازی PCR از ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی جدا و در یک میزبان پروکاریوتیک، کلون شد. این اولین گزارش از جداسازی و کلونینگ این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است که می‌تواند برای کلونینگ در وکتور بیانی به منظور افزایش راندمان تولید الکل طی فرآیند تخمیر الکلی به کار برده شود.

واژه‌های کلیدی: کلونینگ، ساکارومایسس سرویزیه، ژن HXT2، پلاسمید نوترکیب pTZ57R/THXT2

مقدمه

با ظهور علم ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک تغییرات گسترده در بیوتکنولوژی صورت گرفت که یکی از پیامدهای آن بهبود صنعتی تخمیر الکلی توسط ساکارومایسس سرویزیه می‌باشد. تخمیر یک فرآیند بیولوژیکی است که طی آن مخمر به‌عنوان یک کاتالیزور زنده باعث تبدیل کربوهیدرات‌ها به اتانول می‌شود. هر چند امروزه مخمر ساکارومایسس سرویزیه به عنوان میکروارگانیسم برتر برای تولید الکل شناخته شده است ولی برای تولید الکل در مقیاس صنعتی اطلاعات جامعی در دست نیست، به همین دلیل در سال‌های اخیر پژوهش‌های گسترده‌ای در مورد کاربرد مخمرها برای تولید الکل شروع شده است. امروزه از روش‌های مختلف ملکولی نظیر تکنیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۸۹۸۹۷۳۵ نمابر: ۰۹۱۴۸۹۸۹۷۳۵

Email: salehamiriii@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۵/۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

کلونینگ در ایجاد استرین‌های نوترکیب ساکارومایسس سرویزیه جهت بهبود راندمان تولید الکل طی فرایند تخمیر الکلی توسط ساکارومایسس سرویزیه صورت گرفته است [۲،۱]. در انتهای قرن بیستم توجه ویژه‌ای به تولید مخمرهای صنعتی نوترکیب به کمک به نژادی و دست‌ورزی ژنتیکی صورت گرفته است. دست‌کاری ژنتیکی استرین‌های صنعتی با استفاده از تکنیک‌های کلاسیک (موتاسیون، هیبریداسیون، الحاق پروتوپلاست) منجر به بهبود صفات مانند ظرفیت تخمیری، تحمل به اتانول، تخمیر سریع نان، تحمل به فشار اسمزی و تحمل به اسیدهای آلی شده است. با توسعه بیولوژی مولکولی در بیست سال اخیر مطالعه گسترده‌ای روی ساکارومایسس سرویزیه، میکروارگانیسم اصلی در فرآیند تخمیر الکلی صورت گرفته است. یکی از مهم‌ترین روش‌های به نژادی، کاربرد تکنیک‌های DNA نوترکیب است که در سال ۱۹۹۳ توسط Barre و در سال ۱۹۹۸ توسط Dequin and Blonding معرفی و وارد عرصه رقابت با سایر روش‌های ژنتیک مولکولی شد [۲]. بررسی‌ها در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که جذب هگزوزهای نظیر گلوکز، فروکتوز، مانوز توسط سلول‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه (مخمر نانوایی) وابسته به پروتئین‌های انتقال‌دهنده‌های هگزوز غشایی می‌باشد. این پروتئین‌ها جزء پروتئین‌های انتگرال غشایی می‌باشد. پروتئین‌های انتگرال معمولاً کروی هستند و به خودی خود آمفی‌پاتیک هستند. انتقال قند از عرض غشای پلاسمایی اولین مرحله ضروری در متابولیسم قند در ساکارومایسس سرویزیه می‌باشد [۷،۴]. ساکارومایسس سرویزیه دارای چندین انتقال‌دهنده هگزوز هستند که انتقال گلوگز، فروکتوز و مانوز را از طریق انتشار تسهیل شده بر عهده دارند. خانواده انتقال‌دهنده هگزوز در مخمر شامل پروتئین‌های Gal2p، Snf3p، Rgt2p و Hxt1p-Hxt17p می‌باشند [۸،۳]. ژن‌های HXT الگوی بیان متفاوتی داشته و تنظیم آن‌ها به‌شدت تحت ویژگی کینتیک انتقال‌دهنده می‌باشد و گلوکز اولین فاکتور کنترل‌کننده بیان این ژن‌ها می‌باشد. حمل‌کننده Hxt2p الگوی بیان فوق‌العاده‌ای دارد. این حمل‌کننده دارای میل ترکیبی متوسط Km=10 mM برای گلوکز می‌باشد. این ژن در سلول‌های مخمر رشد یافته در غیاب گلوکز یا در غلظت پایین گلوکز، بیان می‌شود. تنظیم بیان این ژن تحت کنترل ژن‌های MigI و Rgt1 می‌باشند. علاوه بر این فاکتور، عواملی مثل فشار اسمتیک، گرسنگی حالت فیزیولوژیکی سلول‌های مخمر نیز در بیان این ژن تاثیر دارد [۶،۵]. Fillion و همکاران در سال ۱۹۸۹ این ژن را از طریق تشکیل کتاب‌خانه ژنومی و cDNA، از سویه ساکارومایسس سروزیه جدا و کلون کردند [۹]. آرتور و همکاران در سال ۱۹۹۰ با آزمون ساترن‌بلاتینگ نشان دادند که ژن HXT2 در سمت راست بازوی کروموزوم شماره XIII نزدیک سانترومر قرار دارد هم‌چنین این ژن همولوژی بالایی را با ژن‌های RHO1 و GAL2 نشان می‌دهد [۶]. در این تحقیق هدف این است که ژن HXT2 با توالی صحیح کلون و از نظر ترادف ژنی بررسی گردد تا بتوان آن را در مطالعات بعدی از نظر ساختاری، فیزیولوژیکی و ایمنی شناختی مورد بررسی قرار داد. اما قبل از هر کاری باید با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک سیستمی طراحی شود تا ژن مورد نظر با طول ۱۶۲۱ جفت بازی جداسازی و در داخل وکتور مناسب کلون گردد و با طراحی پلاسمید حاوی پروموتور الکل دهیدروژناز امکان بیان بیش‌تر این ژن را فراهم کرد تا میزان تولید الکل بیش‌تری در طی تخمیر الکلی توسط ساکارومایسس سروزیه به‌دست آید. با انجام موفقیت‌آمیز این هم‌سانه‌سازی می‌توان سیستمی را جهت ساخت پلاسمیدهای حاوی سایر ژن‌های این خانواده معرفی و در جهت بیان این ژن‌ها به‌کار برد.

مواد و روش‌ها

سویه ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی بوده که در نانوایی و شیرینی‌پزی استفاده می‌شود و از شیرینی‌پزی و نانوایی تهیه شده است و یک سویه استاندارد جهانی می‌باشد. پلاسمیدها، آنزیم‌ها نظیر T4 DNA ligase، Taq DNA polymerase و آنزیم‌های محدودکننده از شرکت سیناژن خریداری شد KB ladder و Agarose gel DNA extraction

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

kit محصول شرکت (Roch) و PCR product cloning kit Ins T/AclonTm شامل پلاسمید pTZ57R فرآورده شرکت Fermentase بود. محیط کشت اختصاصی YPD حاوی دکستروز، پپتون و عصاره مخمر از شرکت Merck تهیه شده بود.

کشت مخمر ساکارومایسس سرویزیه. پس از کشت مخمر در محیط اختصاصی YPD حاوی ۱۰gr دکستروز، ۲۰gr پپتون و ۱۰gr عصاره مخمر و رشد تک‌کلنی‌ها، با استفاده از لوپ به محیط کشت مایع تک‌کلنی را منتقل و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و از آن جهت استخراج DNA ژنومی استفاده می‌گردد.

جداسازی DNA. برای جداسازی DNA با وزن ملکولی بالا ابتدا یک کلونی از مخمر به ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع YPD افزوده می‌شود و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا رشد کند. سوسپانسیون حاصله را در داخل بافر استخراج (GTES) که حاوی (۵۰mM) Tris-Hcl، (۵۰mM) EDTA، (۱mM) SDS ریخته و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت قرار داده شد. با سانتریفیوژ ۴۰۰۰ rpm1 به‌مدت ۱۰ دقیقه دو تا فاز حاصل می‌شود فاز پایینی دور ریخته و فاز بالایی به میکروتیوب جدید منتقل و یک میکرولیتر RNase A به آن اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار داده شد. پس از آن، با کمک فنل-کلروفرم-ایزوامیل الکل و بعد استات سدیم (۳M)، DNA حاصل را رسوب داده و رسوب حاصله در اتانول نگه‌داری شد.

طراحی پرایمر و روش PCR. ابتدا پرایمرهای مناسب با سکانس زیر طراحی شدند. توالی 5′CCAAGCTT1CCATGGGCAACATAATGTCTG AATTCGC3′ به عنوان پرایمر جلوبر و توالی 5′GCTACGAATTC2TCTCTTATTCCTCGGAAAC TCT3′ به عنوان پرایمر معکوس در نظر گرفته شدند. برنامه انجام PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵°C و انجام ۳۷ سیکل متوالی (۹۵°C به مدت ۲ دقیقه، ۵۰°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه) بود.

آنزیم‌های محدودالاثر و تهیه پلاسمید نوترکیب. بعد از تکثیر ژن توسط پی‌سی‌آر، محصول کپی شده پس از خالص‌سازی توسط کیت کیاژن توسط دو آنزیم EcoRI و HindIII به صورت انتهاهای چسبان در آمد و پلاسمید pTZ57R/T (Novagen) به‌وسیله همین دو آنزیم محدودکننده برش داده شد و توسط آنزیم T4 ligase (Roche) وکتور و ژن به یک‌دیگر الحاق شدند. پلاسمید pTZ57R/T دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و پرموتور T7 می‌باشد. این وکتور حاوی ژن Lacبوده که توسط القاگر IPTG فعال می‌گردد. طراحی آغازگرها به گونه‌ای بوده است که در طرف ′۵ آن‌ها سکانس‌های برشی EcoRI و HindIII به ترتیب شماره (۲ و ۱) قرار داشت. هم‌چنین کدون آغازی ATG درست در محل HindIII قرار گرفت تا ژن مربوط به طور هم‌خوان در امتداد بر چسب هستیدینی (GxHis–Tag) و سکانس پایانی (T7 Terminator) قرار گیرد.

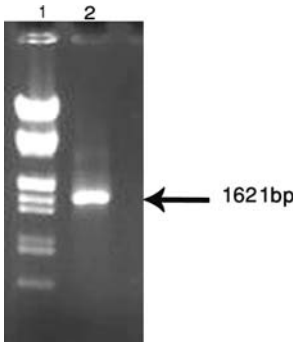
ترانسفورماسیون. محصول تخلیص شده‌ی PCR حاوی ژنHXT2 با استفاده از InsT/A Clon "product cloning kit" به داخل پلاسمید PTZ57R/T کلون شد. ترانسفورماسیون به وسیله شوک حرارتی به این ترتیب بود: قرار دادن باکتری مستعد شده بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل این باکتری، قرار دادن باکتری DH5α حاوی وکتور بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۵ ثانیه، اضافه کردن محیط کشتLB مایع به ویال حاوی باکتری به میزان ۱۰۰ µl، شیکر کردن به مدت یک ساعت، سپس کشت دادن باکتری نوترکیب بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، انکوبه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول شب.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

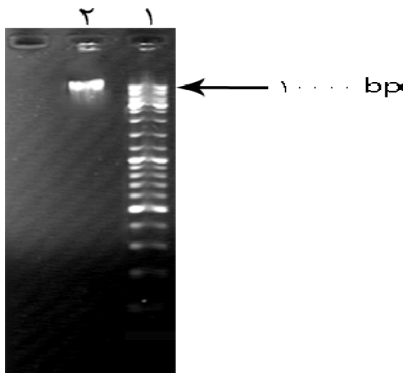
آنالیز پلاسمید. استخراج پلاسمید در مقیاس کم با استفاده از روش لیز قلیایی از اکولای سویه DH5α انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید در مقایسه با پلاسمید کنترل (وکتور pTZ57R/T بدون قطعه درجی) روی ژل آگارز ۱٪ اندازه سنگین‌تری داشتند. سپس وکتور حاوی ژن با توجه به جایگاه‌های برش با آنزیم‌های EcoRI و HindIII بریده شدند و از بین آن‌ها پلاسمیدی که الگوی هضم آنزیمی مورد انتظار را نشان می‌داد، به عنوان کلونی مورد نظر انتخاب گردید.

نتایج

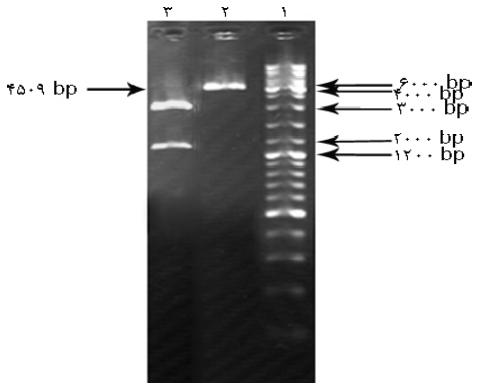
PCR، کلونینگ و آنالیز پلاسمید: پس از استخراج DNA ژنومی مخمر، پی‌سی‌آر به منظور تکثیر ژن HXT2 (کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده H2AF و H2AR اجرا گردید. محصول PCR یک باند ۱۶۲۱ جفت بازی روی ژل آگارز نشان داد که مطابقت با ژن HXT2 موجود در NCBI داشت. بنابراین آغازگرهای طراحی شده با نرم‌افزارهای Primer preming و Fast PCR برای تکثیر ژن HXT2 صحیح عمل کرده است (شکل ۲). هم‌چنین هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-HXT2 با آنزیم‌های برشی EcoRI و HindIII نشان داد که ژن HXT2 به طور صحیح در کاست بیانی مورد نظر قرار گرفته است (شکل ۳).



شکل۱. DNA ژنومی استخراج شده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه



شکل۲. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولPCR بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱ :مارکر λ . ستون ۲: محصول تکثیر شده ژن HXT2



شکل۳: باند حاصل از الکتروفورز محصول به دست آمده از عمل هضم آنزیمی با آنزیم های EcoRI وHind III روی پلاسمید نوترکیب استخراج شده از پرگنه سفید بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون۱: مارکر. ستون۲: پلاسمید حاوی قطعه درجی هضم نشده. ستون۳: پلاسمید نوترکیب برش داده شده با آنزیمهای برشی مربوط به ژنHXT2

آماده‌سازی نمونه‌ها برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی: نمونه کلون شده بعد از الکتروفورز و اطمینان از تشکیل باند مورد نظر، تعیین ترادف شد. بدین منظور ۹۰µl از پلاسمیدی که با کیت استخراج شده بود، به مدت دو ساعت در دستگاه Concentrator قرار داده شد تا فاز مایع حذف گردد. آن‌گاه نمونه مورد نظر نام‌گذاری و برای تعیین ترادف نوکلئوتیدی به کمپانی ماکروژن، کشور کره جنوبی ارسال گردید.

تعیین ترادف قطعات ژنی تکثیر شده و مقایسه آن با سایر ژن‌های موجود در بانک جهانی ژن. نمونه پس از ارسال به کمپانی ماکروژن با دستگاهAutomatic Sequencer 3730 XL تعیین ترادف شد. به منظور تعیین توالی ژن مورد نظر، نتایج

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

حاصل از تعیین ترادف با فرمت الکتروگرام Chromas با استفاده از نرم‌افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفت. پس از حذف ترادف‌های جانبی مربوط به قسمتی از ناقل، این ترادف‌ها ویرایش شده و به فرمت FAST.text آماده گردیدند. این ترادف با ترادف‌های موجود در بانک ژن در شبکه (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) و با جستجوی بلاست مقایسه گردیدند.

بحث و نتیجه‌گیری

پس از نتایج به‌دست آمده به مقایسه و ارزیابی داده‌های توالی‌یابی به‌دست آمده با داده‌ها و اطلاعات فوق‌الذکر پرداخته می‌شود. پس از به‌دست آمدن توالی مذکور، برای شناخت ماهیت و کارکرد آن نخست با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و به طور مشخص ابزار BLAST میزان تشابهات و مطابقت‌های توالی مورد نظر، با اطلاعات و توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی جهانی مورد سنجش قرار گرفت. در تفسیر نتایج بلاست انجام شده بعد از کسب یقین از صحت و ماهیت توالی به‌دست آمده، نکته‌ای که علاوه بر آن جلب نظر می‌کرد تشابه ۹۷٪ و یکسانی ۹۸٪ توالی ژن انتقال‌دهنده هگزوز ۲ با میل ترکیبی بالا برای انتقال گلوکز (HXT2) مورد نظر جدا شده از سویه ساکارومایسس سرویزیه ایرانی با ترادف مشابه این ژن موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) می‌باشد (جدول ۱). مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی حاصله در بانک جهانی ژن، شباهت زیادی را با سایر میکروارگانیسم‌های دیگر نشان می‌دهد. تعیین ترادف سکانس ژن HXT2 نمایانگر آن بود که کاست بیانی به همراه پروموتور T7، محل اتصال ریبوزوم، کدون آغازی (ATG قطعه ژنی HXT2)، بر چسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس پایانی، در ترادف مناسب و به صورت پشت سر هم قرار گرفتند. بررسی شباهت این ژن با سایر ژن‌های موجود در NCBI نشان داد که ژن HXT2 در اکثر سویه‌های ساکارومایسس سرویزیه حفظ شده است. بررسی نرم‌افزار حاکی از آن بود که این ژن پروتئینی با وزن مولکولی ۵۹/۸۴ کیلو دالتون را کد کرده و دارای ۵۴۱ اسید آمینه می‌باشد و هم‌چنین دارای نقطه ایزوالکتریک ۸/۳ می‌باشد. در نهایت ما توانستیم برای اولین با استفاده از پلاسمید pTZ57R/T این ژن را با توالی صحیح کلون کنیم. در این تحقیق، آنالیز توالی ژن HXT2 کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت اینترنتی (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) نشان داد که قطعه ۱۶۲۱ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است. هم‌چنین ژن کلون شده، ژن HXT2 است و ژن HXT2 این سویه ایرانی ساکارومایسس سرویزیه با ژن HXT2 سویه‌های دیگر با شماره دسترس M32270 در بانک جهانی ژن از نظر توالی ۱۰۰٪ شباهت دارد. این ژن با شماره دسترس JQ323554.1 در بانک جهانی ژن ثبت شده است. بررسی‌های که بر روی توالی ژن HXT2 جدا شده از سویه ساکارومایسس سرویزیه ایرانی انجام شد اطلاعات ارزش‌مندی را در اختیار ما قرار داد که می‌توان به مواردی چندی اشاره کرد از جمله این‌که با بررسی توالی اسید آمینه‌ای پروتئین انتقال‌دهنده هگزوز ۲ مورد نظر نشان داد که توالی اسید آمینه مذکور با سه تا از توالی اسید آمینه با شماره‌های دسترس, accession NC 001145.2 accession AAFW02000020.1 و accession AAFW020176.1 موجود در بانک جهانی ژن بیش‌ترین شباهت و هم‌سانی را دارد. پس آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن HXT2 اختصاصی هستند. پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی باکتری‌ها (پلاسمید نوترکیب) تعیین توالی شد. کلونینگ قطعه ژن HXT2 در پلاسمید pTZ57R/T (برای تکثیر ژن) با روش‌های PCR و برش آنزیمی تایید شد. همه روش‌ها بیانگر کلون شدن قطعه فوق در پلاسمید ذکر شده بودند. این مطالعه راهی برای پیش‌رفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب و بیان این ژن برای مطالعه آینده است. برای بیان این ژن نیاز به یک پروموتور قوی نظیر ADHI-promoter و GAPDH-promoter می‌باشد که این پروموتورها باعث افزایش میزان جذب هگزوزها توسط سلول‌های مخمر می‌شود که در نهایت میزان تولید الکل طی فرآیند تخمیری افزایش

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

می‌یابد. در این تحقیق با استفاده از روش مهندسی ژنتیک ژن HXT2 به عنوان کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده هگزوز با میل ترکیبی بالا جداسازی و کلون گردید. امید است با بررسی بیش‌تر روی این ژن و سایر خانواده این ژن احتمالاً در آینده مخمر نوترکیب جهت افزایش راندمان تولید الکل طی تخمیر ساکارومایسس سرویزیه طراحی و تهیه نمود.

```
Query  71
TGTCTGAATTCGCTACTAGCCGCGTTGAAAGTGGCTCTCAACAAACTTCTATCCACTCTA  130
||||||||||||||||||||| ||| || |  |||||||||||| |||||||||||| |||||
Sbjct  29
TGTCTGAATTCGCTACTAGCNGCGCTG-ACNTGGCTCTCAAC-AACTTCTATCC-CTCTA  85

Query  131
CTCCGATAGTGCAGAAATTAGAGACGGATGAATCTCCTATTCAAACCAAATCTGAATACA  190
|||||||||| ||| ||||||| ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  86
CTCCGATAGGGCATAAATTATAGACGGATGAATCTCCTATTC-AACCAAATCTGAATACA  144

Query  191
CTAACGCTGAACTCCCAGCAAAGCCAATCGCCGCATATTGGACTGTTATCTGTTTATGTC  250
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  145
CTAACGCTGAACTCCCAGCAAAGCCAATCGCCGCATATTGGACTGTTATCTGTTTATGTC  204

Query  251
TAATGATTGCATTTGGTGGGTTTGTCTTTGGTTGGGATACTGGTACCATCTCTGGTTTTG  310
||||||| ||||| || ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  205
TAATGATGGCATTGGGGGGGTTTGTCTTTGGTGGGGATACTGGTACCATCTCTGGTTTTG  264

Query  311
TTAATCAAACCGATTTCAAAAGAAGATTTGGTCAAATGAAATCTGATGGTACCTATTATC  370
|||||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  265
TTAATCAAACCGATTTCAAAAAAATATTTGGTCAAATGAAATCTGATGGTACCTATTATC  324

Query  371
TTTCGGACGTCCGGACTGGTTTGATCGTTGGTATCTTCAATATTGGTTGTGCCTTTGGTG  430
|||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  325
TTTCGGACGTCCGGACTGTTTTGATCGTTGGTATCTTCAATATTGGTTGTGCCATTGGTG  384

Query  431
GGTTAACCTTAGGACGTCTGGGTGATATGTATGGACGTAGAATTGGTTTGATGTGCGTCG  490
| |||||||||||| ||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  385
GTTTAACCTTAGGACTTCTGGTTGATATGTATGGACGTAAAATTGGTTTGATGTGCGTCG  444

Query  491
TTCTGGTATACATCGTTGGTATTGTGATTCAAATTGCTTCTAGTGACAAATGGTACCAAT  550
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  445
TTCTGGTATACATCGTTGGTATTGTGATTCAAATTGCTTCTAGTGACAAATGGTACCAAT  504

Query  551
ATTTCATTGGTAGAATTATCTCTGGTATGGGTGTCGGTGGTATTGCTGTCCTATCTCCAA  610
|||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  505
ATTTCATTGGTAAAATTATCTCTGGTATGGGTGTCGGTGGTATTGCTGTCCTATCTCCAA  564

Query  611
CTTTGATTTCCGAAACAGCACCAAAACACATTAGAGGTACCTGTGTTTCTTTCTATCAGT  670
|||||||||||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  565
TTTTGATTTCCGAAACAACACCAAATCACATTAGAGGTACCTGTGTTTCTTTCTATCANT  624

Query  671
TAATGATCACTCTAGGTATTTTCTTAGGTTACTGTACCAACTATGGTACTAAAGACTACT  730
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  625
TAATGATCACTCTAGGTATTTTCTTAGGTTACTGTACCAACTATGGTACTAAAGACTACT  684

Query  731
CCAATTCAGTTCAATGGAGAGTGCCTTTGGGTTTGAACTTTGCCTTCGCTATTTTCATGA  790
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  685
CCAATTCAGTTCAATGGAGAGTGCCTTTGGGTTTGAACTTTGCCTTCGCTATTTTCATGA  744

Query  791
TCGCTGGTATGCTAATGGTTCCAGAATCTCCAAGATTCTTAGTCGAAAAAGGCAGATACG  850
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  745
TCGCTGGTATGCTAATGGTTCCAGAATCTCCAAGATTCTTAGTCGAAAAAGGCAGATACG  804

Query  851
AAGACGCTAAACGTTCTTTGGCAAAATCTAACAAAGTCACCATTGAAGATCCAAGTATTG  910
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  805
AAGACGCTAAACGTTCTTTGGCAAAATCTAACAAAGTCACCATTGAAGATCCAAGTATTG  864

Query  911
TTGCTGAAATGGATACAATTATGGCCAACGTTGAAACTGAAAGATTAGCCGGTAACGCTT  970
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  865
TTGCTGAAATGGATACAATTATGGCCAACGTTGAAACTGAAAGATTAGCCGGTAACGCTT  924

Query  971
CTTGGGGTGAGTTATTCTCCAACAAAGGTGCTATTTTACCTCGTGTGATTATGGGTATTA  1030
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  925
CTTGGGGTGAGTTATTCTCCAACAAAGGTGCTATTTTACCTCGTGTGATTATGGGTATTA  984

Query  1031
TGATTCAATCCTTACAACAATTAACTGGTAACAATTACTTCTTCTATTATGGTACTACTA  1090
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  985
TGATTCAATCCTTACAACAATTAACTGGTAACAATTACTTCTTCTATTATGGTACTACTA  1044

Query  1091
TTTTCAACGCCGTCGGTATGAAAGATTCTTTCCAAACTTCCATCGTTTTAGGTATAGTCA  1150
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1045
TTTTCAACGCCGTCGGTATGAAAGATTCTTTCCAAACTTCCATCGTTTTAGGTATAGTCA  1104

Query  1151
ACTTCGCATCCACTTTCGTGGCCTTATACACTGTTGATAAATTTGGTCGTCGTAAGTGTC  1210
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1105
ACTTCGCATCCACTTTCGTGGCCTTATACACTGTTGATAAATTTGGTCGTCGTAAGTGTC  1164

Query  1211
TATTGGGTGGTTCTGCTTCCATGGCCATTTGTTTTGTTATCTTCTCTACTGTCGGTGTCA  1270
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1165
TATTGGGTGGTTCTGCTTCCATGGCCATTTGTTTTGTTATCTTCTCTACTGTCGGTGTCA  1224

Query  1271
CAAGCTTATATCCAAATGGTAAAGATCAACCATCTTCCAAGGCTGCCGGTAACGTCATGA  1330
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1225
CAAGCTTATATCCAAATGGTAAAGATCAACCATCTTCCAAGGCTGCCGGTAACGTCATGA  1284

Query  1331
TTGTCTTTACCTGTTTATTCATTTTCTTCTTCGCTATTAGTTGGGCCCCAATTGCCTACG  1390
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1285
TTGTCTTTACCTGTTTATTCATTTTCTTCTTCGCTATTAGTTGGGCCCCAATTGCCTACG  1344

Query  1391
TTATTGTTGCCGAATCCTATCCTTTGCGTGTCAAAAATCGTGCTATGGCTATTGCTGTTG  1450
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1345
TTATTGTTGCCGAATCCTATCCTTTGCGTGTCAAAAATCGTGCTATGGCTATTGCTGTTG  1404

Query  1451
GTGCCAACTGGATTTGGGGTTTCTTGATTGGTTTCTTCACTCCCTTCATTACAAGTGCAA  1510
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1405
GTGCCAACTGGATTTGGGGTTTCTTGATTGGTTTCTTCACTCCCTTCATTACAAGTGCAA  1464

Query  1511
TTGGATTTTCATACGGGTATGTCTTCATGGGCTGTTTGGTATTTTCATTCTTCTACGTGT  1570
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1465
TTGGATTTTCATACGGGTATGTCTTCATGGGCTGTTTGGTATTTTCATTCTTCTACGTGT  1524

Query  1571
TTTTCTTTGTCTGTGAAACCAAGGGCTTAACATTAGAGGAAGTTAATGAAATGTATGTTG  1630
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1525
TTTTCTTTGTCTGTGAAACCAAGGGCTTAACATTAGAGGAAGTTAATGAAATGTATGTTG  1584

Query  1631
AAGGTGTCAAACCATGGAAATCTGGTAGCTGGATCTCAAA  1670
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1585
AAGGTGTCAAACCATGGAAATCTGGTAGCTGGATCTCAAA  1624
```

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان بخاطر حمایت مالی و فراهم نمودن امکانات این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

[1] Ratnam V, Narasimha Rao M, Damodar Rao M, Subba Rao S, Ayyanna C. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. World J Microb Biot 2003; 19: 523-526.

[2] Pretorius S, Tiot M, Rensburg P. Designer yeast for the fermentation industry of the 21 century. Food Technol Biotech 2003; 41:3-10.

[3] Johnson D, Thomas M. The monosaccharide transporter gene family in Arabidopsis and rice: a history of duplications, adaptive evolution, and unctional divergence. Mol Biol Evol 2007; 24: 2412-2423.

[4] Ko CH, Liang H, Gaber RF. Roles of multiple glucose transporters in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol 1993; 13: 638-648.

[5] Johnston M, Kim JH. Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochem Soc Trans 2005; 33: 247-252.

[6] Kruckeberg AL, Bisson LF. The HXT2 gene of Saccharomyces cerevesia is required for high - affinity glucose transporter required. Mol Cell Biol 1990; 10: 5903-5913.

[7] Perez M, Luyten K, Michel R, Riou C, Blondin B. Analysis of saccharomyces cerevesiae hexose carrier expression

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

during wine fermentation: both low- and high- affinity hxt transportere expressed. FEMS Yeast Res 2005; 5: 351-361.

[8] Elbin K, Larsson CH, Bill RM, Albers E, Snoep JL, Boles E, et al. Role of hexose transport in control of glycolyic flux in saccharomyces cerevesiae. Appl Environ Microbiol 2004; 9: 5323-5330.

[9] Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. Plant Physiol 1999; 120: 1083-1094.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Cloning and DNA sequence analysis of the glucose transporter gene2 from Iranian Saccharomyces cerevisiae

Saleh Amiri (M.Sc)[*1], AliReza Tarinejad (Ph.D)[2], Gholamreza Sharifi Sirchi (Ph.D)[1]
1 – Depat. of Biotechnology, Faculty of agriculture, Shahid Bahonar Kerman University, Kerman, Iran
2 – Dept. of Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

(Received: 11 Jun 2011 Accepted: 24 Jul 2012)

Introduction: Saccharomyces cerevisiae has 20 genes that encode hexose transporter proteins including HXT1 to HXT17, GAL2, SNF3 and RGT2. Among these gene families, seven genes (HXT1-HXT7) have important role in alcohol production. The aim of this study was the identification and isolation of HXT2 gene from Saccharomyces cerevisiae genome by PCR technique and cloning into vector containing suitable expression promoter in order to design expression vector as a basis to produce recombinant yeast by transformation.

Materials and Methods: After designing specific oligonucleotides primers, fragment gene amplified by PCR. Gene HXT2 inserted into pTZ57R vector by restriction enzymes EcoRI and HindIII and T4 ligase. After transformation of pTZ57R/THXT2 into E.coli, plasmid recombinant analysis considered. The final further analysis by restriction enzymes digestion and software were evaluated.

Results: HXT2 gene isolated from pTZ57R/THXT2 has correct size in agarose gel electrophoresis. Electrophoresis analysis showed that this gene has correct size on agarose gel. Software study showed that this gene encode proteins with 59.84 KDa molecular weight having 541 amino acids with isoelectric point 8.3.

Conclusion: HXT2 gene by PCR optimization from saccharomyces cerevisiae was isolated and cloned into prokaryotic host. This is the first report of isolation and cloning of this gene by using genetic engineering technique in IRAN that can be used for cloning into suitable expression vector to improve alcohol fermentation yield.

Keywords: Cloning, Saccharomyces cervesiae, Gene HXT2, Recombinant plasmid of pTZ57R/THXT2

* Corresponding author: Fax: +98 9148989735; Tel: +98 9148989735
salehamiriii@gmail.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]