مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۱، شماره ۱، بهار ۹۰، صفحات ۸۲ تا ۸۸

Original Article

همسانه سازی ژن *ddh* از *Corynebacterium glutamicum* در راستای افزایش تولید اسیدآمینه لیزین

سهیل قاسمی[۱]، مهرداد هاشمی[۲]، عظیم اکبرزاده[۳]، سیدمحمدرضا مهرابی[۴]، علی فرهنگی[۴]، صغری چراغی[۵]، زهرا صفاری[۶]، هیلدا رستگاری[۷]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۲] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران
[۳] استاد، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۴] عضو هیئت علمی، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۵] پژوهشگر، کارشناس ارشد بیوشیمی بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران
[۶] پژوهشگر، کارشناس ارشد بیوشیمی بخش پایلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران
[۷] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم

چکیده

سابقه و هدف: *L – لیزین یکی از اسیدهای آمینه ضروری است که به دلیل کاربرد بسیار در صنایع مختلف، در سال های اخیر تقاضا برای این اسید آمینه افزایش یافته و این منجر به گسترش تحقیقات برای تولید صنعتی این اسیدآمینه شده است.*

روش بررسی: *در این پژوهش با بهینه‌سازی ژنتیکی سعی در افزایش بازده تولید این اسیدآمینه شد. پس از بررسی آنزیم‌های تاثیرگذار در مسیر بیوسنتز لیزین، ژن ddh کدکننده آنزیم دی‌آمینوپیملات دهیدروژناز انتخاب شد. پس از استخراج DNA کروموزومی سویه Corynebacterium glutamicum ATCC 21799 و طراحی پرایمر، قطعه ژنی جدا شده و به منظور تسهیل همسانه‌سازی و تعیین ترادف نوکلئوتیدی در وکتور TAcloning کلون گردید. هضم آنزیمی دو وکتور TAcloning و pET28a توسط آنزیم‌های برشی SalI و EcoRI انجام و پس از تیمار وکتور با آلکالین فسفاتاز، واکنش لیگاسیون صورت گرفت. سپس در سوش E.coliDH5α و در نهایت در میزبان بیانی E.coliBL21(DE3) ترانسفورم شد.*

یافته‌ها: *مشاهده باند ۱۱۵۰bp در نمونه‌های PCR و محصول پلاسمید تخلیص‌شده و هضم‌شده با دو آنزیم مذکور و همچنین نتیجه تعیین توالی نشان داد که ژن مورد نظر به درستی کلون گردیده است. بررسی میزان بیان پروتئین نوترکیب توسط ژل SDS-Page تاییدی دیگر بر صحت کلون سازی و فعالیت پروموتور می باشد.*

نتیجه‌گیری: *در این تحقیق برای اولین بار میزان بیان آنزیم دی‌آمینوپیملات دهیدروژناز در این وکتور بیانی افزایش قابل قبولی را نشان داد.*

واژگان کلیدی: *اسیدآمینه L- لیزین، کورینه باکتریوم گلوتامیکوم، بهینه سازی ژنتیکی، ژن ddh.*

مقدمه

لیزین یکی از اسیدهای آمینه ضروری برای انسان و بسیاری از حیوانات است که در بدن این موجودات ساخته نمی‌شود، لذا باید از طریق مواد غذایی به بدن آنها وارد شود (۱). از لیزین به عنوان مکمل غذایی برای کودکان و ورزشکاران نیز استفاده می‌شود. اضافه بر آن محلول سرمی آن برای تغذیه و درمان بیماران به ویژه آنهایی که دوره نقاهت را سپری می‌کنند، کاربرد دارد (۲). صنایع آرایشی و بهداشتی نیز از مصرف-کنندگان این اسید آمینه به شمار می‌روند (۳). از جمله مواردی که درآنها کاهش میزان لیزین دیده می‌شود می‌توان

آدرس نویسنده مسئول: تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش پایلوت بیوتکنولوژی، دکتر عظیم اکبرزاده
(**email**: azimakbarzadeh@pasteur.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۴/۱۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱/۲۷

به کم‌خونی، ریزش مو، کاهش وزن، تندخویی و افزایش تحریک‌پذیری اشاره کرد. بر اثر کمبود لیزین علائمی چون تهوع، استفراغ، گیجی، کم‌خونی و اختلال در رشد بروز خواهد کرد (۴). در مواردی که میزان آمونیاک درخون افزایش می‌یابد میزان لیزین نیز افزایش خواهد یافت(۵). لیزین همچنین باعث جلوگیری از رشد ویروس‌ها و کمک به تشکیل کلاژن و مواد پیوندی موجود دراستخوان‌ها، لیگامان‌ها، تاندون‌ها و اتصالات می‌شود (۶) و در تولید بعضی ازهورمون‌ها دخیل بوده و منجر به کاهش سطح سرمی تری‌گلیسیریدها می‌گردد (۷).

برای نخستین بار در سال ۱۸۸۹، لیزین از کازئین جدا شد. در دهه ۱۹۵۰ سنتز اسیدهای آمینه از منشأ میکروبی آغاز گردید و برای اولین بار تولید به روش فرمانتاسیون مستقیم در سال ۱۹۵۸ در شرکت کیووا هاکو ژاپن انجام شد (۸). در طی چند سال، اولین موتانت ترشح کننده لیزین از *C.glutamicum* به دست آمد و برای تولید در مقیاس بالا به کار رفت (۹، ۱۰). همچنین بهینه‌کردن سوش‌های تولیدکننده و فرآیندهای تولید، منجر به تولید لیزین از منابع تجدیدشدنی گردید (۸، ۱۱، ۱۲). پس از تحقیقات و تلاش‌های وسیع، تولید صنعتی این اسیدآمینه در کارخانه کیووا هاکو در ژاپن (۱۹۵۷) شروع شد. با گرایش روز افزون استفاده از گوشت سفید، مصرف لیزین نیز به دلیل کاربرد فراوان آن در تولید این محصولات درحال افزایش هرچه بیشتر است و نسبت به تولید اولیه آن به چندین برابر رسیده است (۱۳).

باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم که به عنوان اصلی‌ترین باکتری تولید کننده لیزین مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۴)، از نوع گرم مثبت، غیر اسپورزا، میله‌ای شکل با ابعادی در حدود ۳-۱×۱-۰/۷ میکرومتر، غیرمتحرک و هوازی است که اغلب به شکل V یا حروف های چینی قرار می‌گیرند. کلنی‌های باکتری *C.glutamicum* به رنگ زرد و در بعضی مواقع کرم-سفید می‌باشند (۱۵). تعیین توالی ژنوم باکتری *C.glutamicum* در اواسط سال ۱۹۸۰، در حالی که چندین ژن از مسیرهای بیوسنتز اسیدهای آمینه شناسایی و کلون شده بودند، آغاز شد (۱۶).

در باکتری‌ها و گیاهان، تولید لیزین از آسپارتات، به وسیله یک یا چند تا از چهار مسیر مختلف سوکسینیلاز، استیلاز، دهیدروژناز و آمینوترانسفراز انجام می‌گیرد که در انتهای مسیر هر کدام دی‌آمینوپیمیلات سنتز می‌شود (۱۳). مشخصه بارز *C.glutamicum* این است که از هر دو نوع مسیر سوکسینیلاز و دهیدروژناز در تولید اسیدآمینه لیزین استفاده می‌کند (۱۷).

به دلیل کاربرد بسیار اسیدآمینه لیزین در صنایع مختلف، در این پژوهش سعی بر بهینه‌سازی ژنتیکی و افزایش بازدهی تولید این اسیدآمینه شده است.

مواد و روشها

سوش‌های مهندسی شده DH5α و BL21 از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران و سوش Corynebacterium glutamicum ATCC 21799 از بانک میکروبی آمریکا تهیه گردید؛ سنتز پرایمرها توسط شرکت سیناژن ایران انجام شد؛ آنزیم‌های محدود کننده (SalI, EcoRI) و کیت PCR و کیت TAcloning vector و آنزیم آلکالین فسفاتاز و لیزوزیم و RNase و سایز مارکرهای DNA و پروتئین از شرکت Fermentas آلمان و کیت تخلیص DNA از ژل از شرکت Intron خریداری گردید. تعیین توالی محصول PCR و نتیجه همسانه سازی در مرکز ابن سینا دانشگاه شهید بهشتی تهران (به کمک دستگاه ژنتیک آنالیزر مدل ۳۱۳۰، شرکت ABI آمریکا) و بررسی نقشه آنزیمی (Restriction enzymes) ژن دآمینوپیملات دهیدروژناز(ddh gene) در وب سایت webcutter 2.0 انجام شد.

استخراج DNA ژنومیک از سوش *C.glutamicum* با کمک روش لیز سلولی (۱۸) و با اعمال تغییراتی در مدت زمان تیمار با لیزوزیم و در نحوه جداسازی کلاف DNA، بهینه و انجام شد و به منظور بررسی خلوص و کیفیت DNA خالص شده نسبت جذب نوری در طول موج۲۶۰ به ۲۸۰ محاسبه گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز با پرایمر بالادست GAATTCAAAAGGCTCAACAATACG (۵۴ نوکلئوتید پیش از کدون شروع) و پرایمر پائین دست GTCGACAGAGGCAAGGAAACC (۲۸ نوکلئوتید پس از کدون خاتمه) به منظور تکثیر قطعه ۱۱۴۹ جفت بازی دربرگیرنده ژن ۱۰۲۲ جفت بازی دآمینوپیملات دهیدروژناز انجام شد. قابل ذکر است که به دلیل تسهیل مرحله ترانسفورم و اطمینان از جهت‌گیری صحیح ژن در وکتور، در انتهای هر پرایمر جایگاه برشی برای آنزیم‌های محدودالاثر در نظر گرفته شد. مقادیر مورد استفاده به ازای هر واکنش PCR شامل: ۲ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۱ میکرولیتر(MgCl2 (50mM، ۰/۴ میکرولیتر از مخلوط dNTP(10mM)، ۱ میکرولیتر از هر دو پرایمر (10μM)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۱ واحد) و ۱ میکرولیتر DNA الگو به غلظت

جدول ۱- برنامه تکثیر ژن *ddh* توسط آنزیم های Taq و Pfu پلیمراز

DNA Polymerase	Pre-Denature	Denature	Annealing	Extension	Post-Extension	
Taq	۹۴	۹۴	۵۲/۵	۷۲	۷۲	درجه سانتی‌گراد
	۳۰۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰۰	زمان (ثانیه)
	۱		۳۵		۱	تعداد سیکل
Pfu	۹۴	۹۴	۴۸/۵	۷۲	۷۲	درجه سانتی‌گراد
	۳۰۰	۳۰	۳۰	۱۵۰	۹۰۰	زمان (ثانیه)
	۱		۳۵		۱	تعداد سیکل

جدول ۲- مقادیر مورد استفاده به ازای هر واکنش با آنتریم Pfu پلیمراز

Pfu	Buff.	MgSO4	Pfu	dNTP	DNA	D.D.W	each Primers	Final Vol.
میکرولیتر	۲	۰/۶	۰/۲	۰/۴	۱	۱۳/۸	۱	۲۰

۲۰ نانوگرم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. جهت تکثیر از برنامه ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد.

پس از بهینه سازی شرایط تکثیر با آنزیم Taq با توجه به اینکه هدف بیان می‌باشد تکثیر توسط آنزیم Pfu DNA Polymerase ،به دلیل دقت بالا، بر طبق جدول ۱ و ۲ به ازای هر واکنش انجام گردید.

از آنجایی که برای برش توسط آنزیم‌های محدودالاثر به چندین نوکلئوتید در انتهای ´۳ جایگاه برش نیاز است، همسانه سازی در TAcloning vector امری بدیهی به نظر می‌رسید. به منظور بالا بردن کارایی همسانه سازی باند حاصل از محصول PCR را از ژل آگارز توسط کیت Intron تخلیص شد. سپس با استفاده از کیت TAcloning vector لیگاسیون به صورت overnight انجام و سپس در سوش مهندسی شده DH5α ترانسفورم گردید و محصول بر روی پلیت‌های LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در روز بعد از کلونی‌های سفید حاصله به صورت جداگانه بر روی پلیت های حاوی آمپی-سیلین (Amp) کشت داده شد. از هر کدام از تک کلونی‌های رشد یافته یک لوپ در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به خوبی حل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ نموده و از محلول رویی به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. پس از الکتروفورز محصول PCR، کلونی‌هایی که همسانه‌سازی و ترانسفورم با صحت در آنها انجام گرفته مشخص شدند.

از کلونی های مذکور به روش زیر تخلیص پلاسمید انجام شد. یک لوپ از باکتری‌های رشد یافته در ۵۰۰ میکرولیتر محلول STE به خوبی حل شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد، محلول رویی دور ریخته و رسوب به ترتیب با ۱۰۰ میکرولیتر محلول I سرد، ۲۵۰ میکرولیتر محلول II و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر III مخلوط شده (جدول ۳) و پس از سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه، محلول رویی به ظرف جدید انتقال داده شده و به ترتیب با فنل-کلروفرم و اتانول ۹۶ درصد و الکل ۷۰ درصد تیمار شد. پس از هر مرحله، سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. رسوب حاصل در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حاوی RNase حل شد و به منظور تسریع در حل شدن به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

پلاسمید pET28a مطابق روش مذکور تخلیص و به منظور افزایش بازدهی همسانه سازی و جلوگیری از خود اتصالی وکتور، برداشتن فسفات از انتهای ´۵ وکتور با استفاده از آلکالین فسفاتاز (CIP) انجام شد. سپس لیگاسیون قطعه ژنی مورد نظر در وکتور pET28a به صورت overnight انجام گردید. پس از حساس سازی سوش BL21(DE3) به روش کلرید کلسیم (۱۸) و ترانسفورم مخلوط اتصالی(ligation mix) در آن، بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین کشت داده شدند.

جدول ۳- مواد و محلول های لازم جهت تخلیص پلاسمید

بافر STE	۰/۱ مولار NaCl ، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl (pH: ۸) و ۱ میلی مولار EDTA (pH: ۸)
محلول I	۵۰ میلی مولار گلوکز ، ۲۵ میلی مولار Tris-HCl(pH: ۸)، ۱۰ میلی‌مولار EDTA (pH: ۸)
محلول II	۰/۲ نرمال NaOH و ۱٪ SDS (w/v)
محلول III	۶۰ میلی‌لیتر پتاسیم استات ۵ مولار، ۱۱/۵ میلی‌لیتر گلاسیال استیک اسید و ۲۸/۵ میلی‌لیتر آب مقطر

برای ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب از روش ساده‌ای استفاده شد. یک میلی لیتر از کشت شبانه باکتری E.coli BL21(DE3) واجد پلاسمید نوترکیب را در ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB جدید حاوی

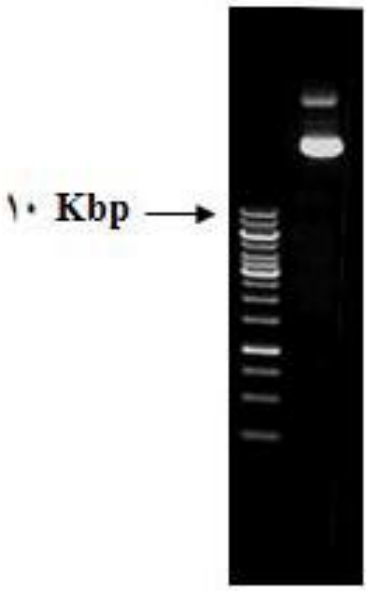
۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری و با هوادهی 150rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت دادیم و پس از اینکه OD600=1 شد به ارلن ها در غلظت نهایی ۲۵۰ میکرومولار IPTG اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت دیگر کشت ادامه یافت. سپس محیط‌های کشت به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند، محلول رویی را دور ریخته و رسوب در ۲ میلی لیتر بافر TE حل گردید، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محصول حاصل را با ۱۰۰ میکرولیتر از Sample Buffer-SDS-Page(1X) مخلوط و پس از گذشت ۵ دقیقه در آب جوش، با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و از محلول رویی برای انجام الکتروفورز SDS-Page استفاده شد.

یافته‌ها

کیفیت و کمیت DNA خالص شده

الکتروفورز DNA تخلیص شده (شکل ۱) و نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ بیانگر کمیت و کیفیت DNA خالص شده است.

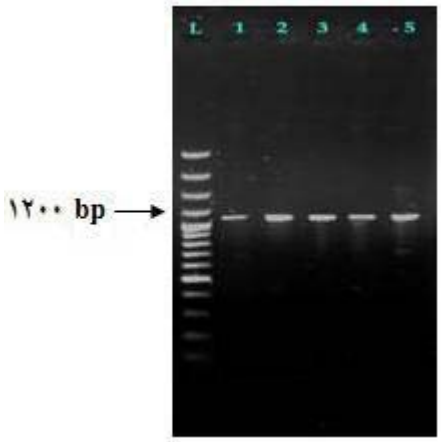
$A_{260}/A_{280} = ۱/۷۹$



شکل ۱- الکتروفورز محصول استخراج DNA کروموزومی سویه *C.glutamicum ATCC21799* بر روی ژل آگاروز ۰/۶ درصد در بافر TBE (Tris- base، اسید بوریک و EDTA)، همراه با مارکر ۱۰Kb

جداسازی ژن *ddh*

محصول PCR با استفاده از سایز مارکر bp ۱۰۰ و هضم با آنزیم‌های EcoRI و SalI ارزیابی و تائید شد (شکل ۲).

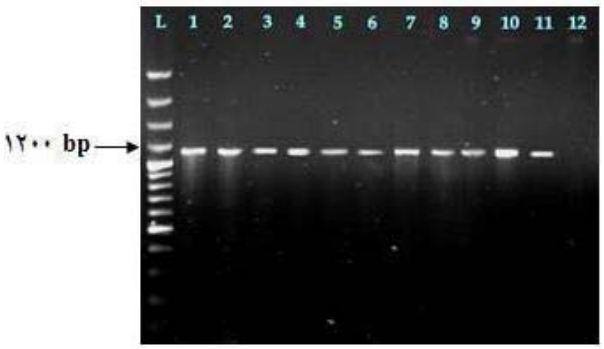


شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR تکثیر ژن *ddh* در ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE. L: مارکر ۱۰۰bp؛ ۱ و ۲ و ۳: محصول PCR با آنزیم Taq پلیمراز؛ ۴ و ۵ : محصول PCR با آنزیم Pfu پلیمراز

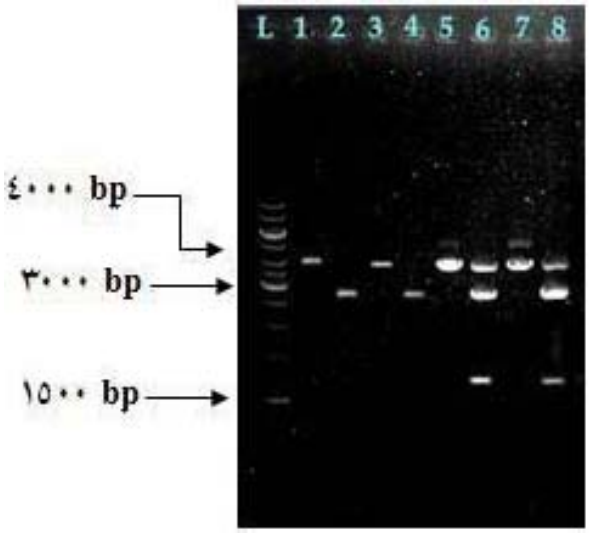
غربالگری کلونی‌های سفید-آبی

غربالگری کلونی‌های سفید حاصل از همسانه‌سازی در وکتور TA به وسیله دو تکنیک PCR (شکل ۳) و تخلیص پلاسمید و هضم آنزیمی(شکل۴) انجام گرفت. همچنین جهت اطمینان از توالی قطعه تخلیص شده، توالی‌یابی (Sequencing) انجام شد و قطعه مورد نظر از ژل جدا و تخلیص گردید.

مشاهده باند ۱۱۵۰bp در نمونه‌های حاصل از PCR و محصول پلاسمید تخلیص شده و هضم شده با دو آنزیم EcoRI و SalI و نتیجه تعیین توالی، حاکی از موفقیت در لیگاسیون داشت.



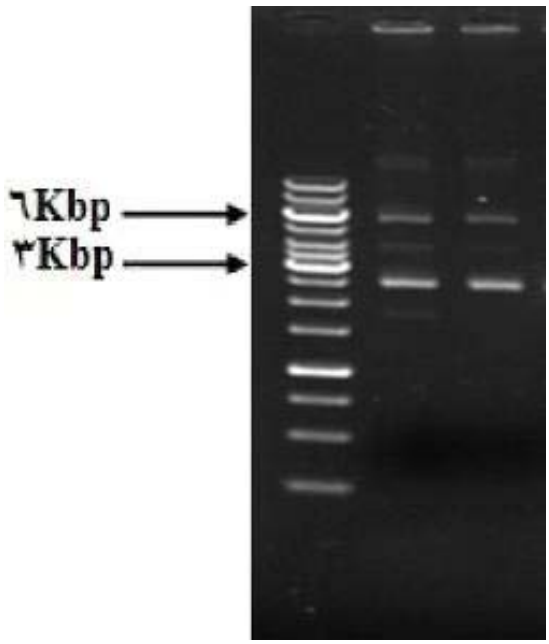
شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR با آنزیم Taq پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱ درصد برای تشخیص اندازه قطعه همسانه‌سازی شده. L : مارکر ۱۰۰bp؛ شماره ۱ تا ۱۰ کلونی‌های سفید بررسی شده؛ ۱۱: کنترل مثبت (ژنوم باکتری *C.glutamicum* به عنوان DNA الگو)؛ ۱۲: کنترل منفی، کلونی حاوی وکتور TA (کلونی آبی) بدون Insert



شکل۴ : الکتروفورز محصول هضم آنزیمی با دو آنزیم *SalI* و *EcoRI*. L: مارکر ۱۰Kbp؛ ۱و۳: وکتور TAcloning نوترکیب خطی شده حاوی ژن *ddh*؛ ۲و۴: وکتور TAcloning خطی شده بدون قطعه insert؛ ۵و۷: هضم آنزیمی فقط با آنزیم *SalI* (پلاسمید نوترکیب به صورت خطی شده)؛ ۶و۸: هضم آنزیمی با دو آنزیم برشی *SalI* و *EcoRI* (قطعه ۱۱۵۰bp مربوط به ژن *ddh* جدا شده).

همسانه سازی در وکتور بیانی pET28a

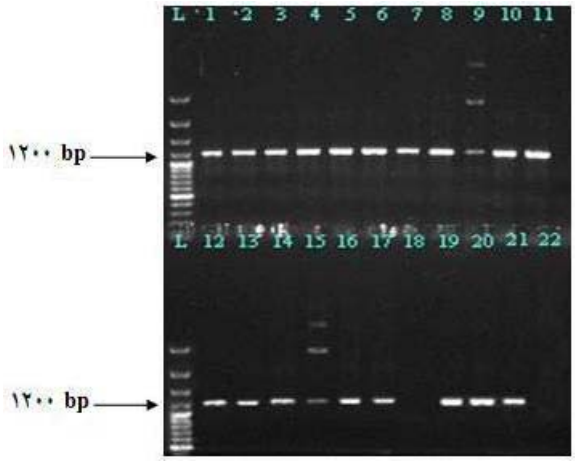
پس از تخلیص وکتور pET28a (شکل۵)، انجام بعضی اصلاحات و تغییرات در روش‌های موجود برای کسب نتایج مطلوب در همسانه‌سازی قطعه ژنی جدا شده در وکتور بیانی pET28a لازم به نظر می‌رسید.



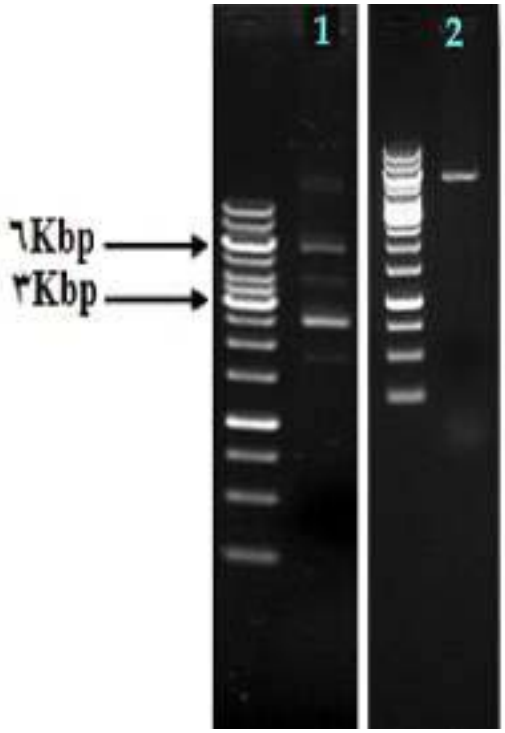
شکل ۵- الکتروفورز DNA پلاسمیدی pET28a (۵۳۶۹ جفت باز) در ژل آگارز ۰/۸٪ در بافر TBE

غربالگری کلونی های واجد وکتور نوترکیب

کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط LB حاوی کانامایسین به عنوان کلونی‌های واجد وکتور و احتمالا واجد قطعه ژن انتخاب شد. به منظور اطمینان از وارد شدن قطعه ژن در وکتور از تکنیک PCR (شکل۶) و تخلیص پلاسمید و تیمار با آنزیم‌های *EcoRI* و *SalI* استفاده گردید (شکل۷).



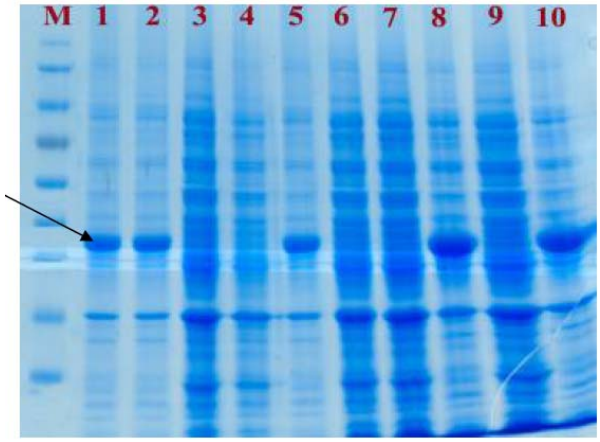
شکل ۶ - الکتروفورز محصول PCR به منظور غربال کلونی‌های حاوی ژن *ddh* L: مارکر ۱۰۰bp؛ ۱-۲۱: تعداد کلونی‌های بررسی شده؛ ۲۲: شاهد {E.coli BL21(DE3) حاوی پلاسمید بیانی pET28a بدون ژن}



شکل ۷- نتیجه هضم آنزیمی ناقل بیانی pET28a با آنزیم‌های *SalI* و *EcoRI*. ۱- پلاسمید هضم نشده (نمونه شاهد)، ۲- پلاسمید هضم شده با آنزیم‌های *SalI* و *EcoRI*

ارزیابی کمی بیان پروتئین نوترکیب

باند حاصل بر روی ژل SDS-Page (شکل۸) تایید دیگری بر صحت کلون سازی بود.



شکل ۸- آنالیز SDS- PAGE برای مشاهده کلونی نوترکیب و نمونه شاهد. M: مارکر پروتئینی به ترتیب وزن ملکولی ۱۷۰، ۱۳۰، ۹۵، ۷۲، ۵۵، ۴۳، ۳۴، ۲۶، ۱۷ و ۱۰ کیلودالتون؛ ۴: شاهد (باکتری حاوی ناقل بدون قطعه)، ۱-۳ و ۵-۱۰: کلونی های دارای وکتور نوترکیب؛ ۱و۲و۵و۸و۱۰: پروتئین نوترکیب؛ رنگ‌آمیزی با استفاده از روش کوماسی‌بلو صورت گرفته است.(پیکان موقعیت پروتئین نوترکیب در نمونه‌ها را نشان می‌دهد)

بحث

L- لیزین یک اسیدآمینه ضروری است که از لحاظ تجاری ارزش زیادی دارد. لیزین در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی حائز اهمیت است (۳). سنتز لیزین در *C.glutamicum* از دو مسیر سوکسینیلاز و دهیدروژناز صورت می‌گیرد که سهم مسیر دهیدروژناز در حالت حداقل در حدود ۳۰ درصد لیزین نهایی سنتز شده می‌باشد (۱۹)، در ابتدای کشت، در حالت بهینه و وجود آمونیوم آزاد کافی در محیط، حدوداً ۷۲ درصد لیزین از مسیر دهیدروژناز تولید می‌شود (۱۹). همچنین این مسیر به دلیل کوتاه‌تر کردن مسیر بیوسنتز لیزین و مصرف کمتر انرژی نسبت به دیگر مسیرهای بیوسنتز ترجیح داده می‌شود. از کورینه باکتریوم گلوتامیکوم که به عنوان یک تولید کننده طبیعی اسیدهای آمینه از جمله لیزین یاد می‌شود به عنوان الگوی ژنومی جهت جداسازی و تکثیر ژن استفاده شد. با توجه به ساختار غشای پلاسمایی و دیواره سلولی سویه مذکور، به منظور دستیابی به DNA کروموزومی با کیفیت و خلوص بالا از تلفیق چند پروتکل استفاده شد و نتیجه مطلوبی به دست آمد. طراحی پرایمر با تعبیه سایت شناسایی *EcoRI* و *SalI* در دو انتهای توالی ژنی، انجام گرفت. این استراتژی همسانه‌سازی محصول PCR را در وکتورهای متعدد امکان پذیر می‌کند. از آنجایی که ژن *ddh* در خزانه ژنی کورینه باکتریوم گلوتامیکوم به صورت معکوس (برخلاف راستای ´۵ به ´۳) قرار دارد، این استراتژی کمک می‌کند که راستای قرارگیری ژن در وکتور را تحت کنترل داشت. این مطالعه در راستای افزایش بیان ژن *ddh* و در نهایت بهبود تولید اسیدآمینه L- لیزین انجام گرفته است. در دهه ۲۰۰۰-۱۹۹۰ تحقیقات زیادی بر بهینه سازی ژنتیکی و متابولیکی اسیدآمینه L-لیزین انجام گرفته که معمولا به صورت افزایش بیان چند ژن با همدیگر بوده است (۲۰). امید است با بهبود بازده بیان و همسانه‌سازی دیگر ژن‌های دخیل در این روند تولید، به میزان قابل قبولی از این اسیدآمینه دست یابیم. در بیشتر مقالات همسانه‌سازی به وسیله یک وکتور غیربیانی و پروموتور خود ژن انجام گرفته (۱۷، ۲۰)، در حالی که در این تحقیق از وکتور pET28a که دارای پروموتور ویروسی T7 می‌باشد، استفاده گردید.

قابل ذکر است که همسانه‌سازی در سویه‌های طبیعی تولید کننده این اسیدآمینه نیز از راهکارهای مفید خواهد بود (۲۰) که به این منظور همسانه‌سازی در سویه *C.glutamicum* نیز در حال انجام می‌باشد. همچنین با توجه به افزایش بیان ژن *ddh* در *E.coli* پس از همسانه‌سازی و متعاقب آن افزایش میزان لیزین، می توان انتظار داشت که افزایش بیان این ژن نیز در *C.glutamicum* موجب افزایش تولید لیزین گردد. این افزایش در برخی مقالات تا حدود ۱۴ برابر افزایش فعالیت آنزیمی نیز گزارش شده است (۲۱).

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پروژه تحقیقاتی بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران می‌باشد. بدین وسیله از اساتید ارجمند به ویژه آقای محسن چیانی و دیگر همکارانی که ما را در اجرای این طرح یاری فرمودند، قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Tryfona T, Bustard MT. Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*: transmembrane transport and metabolic flux analysis. Pro Biochem 2005; 40: 499–508.

2. Mack PB, Vose GP, Kinard CL, Campbell HB. Effects of lysine supplemented diets on growth and skeletal density of preadolescent children. Am J Cli Nutr 1962; 11: 255-62.

3. Anastassiadis S. L-Lysine Fermentation. Recent patents on Biotech 2006; 1:11-24.

4. Flodin NW. The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine. J Am Coll Nutr 1997; 16: 7–21.

5. Griffith RS, Norins AL, Kagan C. A multicentered study of lysine therapy in Herpes simplex infection. Dermatologica 1978; 156: 257–67.

6. Furst P. Dietary L-lysine supplementation: a promising nutritional tool in the prophylaxis and treatment of osteoporosis. Nutrition 1993; 9: 71-72.

7. Civitelli R, Villareal DT, Agnusdei D, Nardi P, Avioli LV, Gennari C. Dietary L-lysine and calcium metabolism in humans. Nutrition 1992; 8: 400-405.

8. Pfefferle W, Möckel B, Bathe B, Marx A. Biotechnological manufacture of lysine. In: Scheper T, ed. Advances in biochemical engineering biotechnology Berlin: Springer Berlin; 2003. p.59–112.

9. Kitada S, Nakayama K, Kinoshita S. Method for production L-lysine by fermentation. US Patent No 2,979,439; 1961.

10. Kelle R, Lanfer B, Brunzema C, Weuster D, Kramer R, Wandrey C. Reaction engineering analysis of L-lysine transport by *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol Bioeng 1996; 51: 40-50.

11. Eggeling L. Biology L- lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. Aminoacids 1994; 6: 261-72.

12. de Graaf AA, Eggeling L, Sahm H. Metabolic engineering for l-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Adv Biochem Eng Biotechnol 2001; 73: 9–12.

13. Wittmann C, Becker J. The l-lysine story: from metabolic pathways to industrial production. In: Wendisch VF, Ed. Amino acid biosynthesis—pathways, regulation and metabolic engineering. Heidelberg, Germany: Springer; 2007. p.39–70.

14. Eggeling L, Bott M. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC; 2005. p.465-89.

15. Abe S, Takayama K, Kinoshita S. Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. J Gen Appl Microbiol 1967; 13: 279- 301.

16. Thierbach G, Kalinowski J, Bachmann B, Puhler A. Cloning of the DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartolinase. Appl Microbiol Biotech 1990; 32: 443-48.

17. Schrumpf B, Schwarzer A, Kalinowski J, Puhler A, Eggeling L, Sahm H. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol 1991; 173: 4510–16.

18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Ney York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982.

19. Sahm H, Eggeling L, de Graaf AA. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. Biol Chem 2000; 381: 899-910.

20. Hirano S, Sugimoto M, Nkano E, Izue M. Method of producing L-lysine. US Patent No 6,090,597; 2000.

21. Ishino S, Mizukami T, Yamaguchi K, Katsumata R, Araki K. Cloning and sequencing of the meso-Diaminopimelate-D-dehydrogenase (ddh) gene of *Corynebacterium glutamicum*. Agric Biol Chem 1988; 52: 2903-909.