حضور و جایگاه تکاملی سه گروه ژنی پلی‌کتاید سنتازهای تیپ I و II و پپتید سنتتاز غیرریبوزومی در سه سویه *استرپتومایسس* Iz8 ، F9 و F6

سارا قشقایی، زهرا اعتمادی فر* و منوچهر توسلی

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۰

چکیده

غربال‌گری پلی‌کتاید سنتازها و پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی راهی سریع برای اثبات پتانسیل تولید عامل ضدمیکروبی و کشف عوامل دارویی جدید می‌باشد. در این راستا حضور و جایگاه تکاملی این خوشه‌های ژنی در سه سویه *استرپتومایسس* مطالعه شد. حضور احتمالی سه گروه ژنی پلی‌کتاید سنتازهای تیپ I و II و پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی به ترتیب در سه سویه *استرپتومایسس* Iz8، F9 و F6 با استفاده از پرایمرهای لغزشی بررسی و اثبات شد. برای تفکیک قطعات مختلف با اندازه یکسان و توالی متفاوت، محصولات PCR با اندازه مربوطه به وکتور pTG19-T پیوند و سپس در سلولهای *اشرشیا کلی* سویه TOP10 ترانسفورم شدند. برای بررسی دقیق‌تر تنوع قطعات، از ژل پلی‌آکریل آمید استفاده شد. از هر گروه ژنی چند کلون تعیین توالی و درخت فیلوژنی در نرم‌افزار مستربیز رسم شد. کلونهای ۳ و ۸ از پلی‌کتاید سنتاز تیپ I، کلون ۴ از پلی‌کتاید سنتاز تیپ II و کلون ۵ از پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی در پایگاه داده GenBank در سایت NCBI ثبت شدند. درختهای فیلوژنی با همردیفی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نشان دهنده قرارگیری کلون ۸ از پلی‌کتاید سنتاز تیپ I و کلون ۴ از پلی‌کتاید سنتاز تیپ II در کلادهای جداگانه و احتمال تولید عوامل ضدمیکروبی جدید می‌باشد. با رسم درخت فیلوژنی و تعیین رابطه تکاملی احتمال حضور خوشه‌های ژنی با ترکیب بندی جدید و بنابراین تولید محصول جدید در سویه‌های Iz8 و F9 نشان داده شد.

واژه های کلیدی: پلی‌کتاید سنتاز، پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی، پلی آکریل‌آمید، مشابه سازی، درخت فیلوژنی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۷۹۳۲۳۶۷-۰۳۱، پست الکترونیکی: z.etemadifar@sci.ui.ac.ir و zetemadifar@gmail.com

مقدمه

اکتینومیستها گروه بزرگی از باکتریهای ساکن خاک هستند. تاکنون بیش از ۲۲ هزار ترکیب فعال‌زیستی میکروبی شناخته شده است که نیمی از آنها توسط اکتینومیستها تولید می‌شوند (۷). پروژه‌های ژنومی اخیر اکتینومیستها نشان داده است که هر ژنوم اکتینومیست مسیرهای بیوسنتیک مختلفی را کد می‌کند که یک دوم تا سه چهارم آنها با مسیرهای مربوط به پپتید سنتتازهای غیرریبوزومی (NRPSs) و پلی‌کتاید سنتازها (PKSs) مرتبط هستند. در نتیجه این دو گروه از ترکیبات متابولیتهای ثانویه اصلی اکتینومیستها هستند. پلی‌کتایدها (PK)، پپتیدهای غیرریبوزومی (NRP) و هیبرید آنها اغلب فعالیتهای زیستی مفید دارویی نشان می‌دهند (۱۰).

PKها خانواده بزرگی از محصولات طبیعی در باکتریها، قارچها و گیاهان با ویژگی ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدکلسترول، ضدانگل، ضدسرطان و سرکوب‌گر سیستم ایمنی هستند (۴). آنها از پیش ماده‌های اسیل کوآنزیم A به وسیله PKSها سنتز می‌شوند (۲۱). سه تیپ از PKSهای باکتریایی تا به امروز شناخته شده است: ۱) PKSهای تیپ I (PKS-I) که به طور کلی به دو گروه مودولار (غیرتکرار شونده) و تکرار شونده تقسیم می‌شوند. PKS-I مودولار

مشابه با اسید چرب سنتازهای (FAS) تیپ I آنزیمهای بزرگ چند کاره با سازماندهی مودولار هستند (۲۰، ۲۱ و ۲۳). هر مودول شامل ۳ دومین کاتالیتیک ضروری برای طویل شدن زنجیره به نامهای کتوسنتاز (KS)، اسیل ترانسفراز (AT) و پروتئین حامل اسیل (ACP) می‌باشد (۲۵). در حالی‌که در ابتدا تصور بر این بود که PKS-Iهای تکرار شونده محدود به سیستم قارچی هستند اما در سالهای اخیر در تعداد زیادی از باکتریها نیز پیدا شده‌اند (۲۶)؛ ۲) PKSهای تیپ II (PKS-II) که به دو گروه تکرار شونده و غیرتکرار شونده تقسیم می‌شوند. PKSهای تکرار شونده مشابه با FASهای تیپ II کمپلکسهای چند آنزیمی عمل کننده در یک رفتار تکرار شونده، هستند (۴ و ۲۵). آنها شامل یک هترودایمر، متشکل از یک زیرواحد KSα (سایت فعال) و یک زیرواحد KSβ یا فاکتور طول زنجیره (CLF)، که با ACP همکاری می‌کنند هستند (۹). PKSهای غیرتکرار شونده فاقد دومین ACP بوده و مستقیماً از سوبسترای آسیل کوآنزیم A برای تشکیل باندهای C-C و C-O استفاده می‌کنند (۲۱)؛ ۳) PKSهای تیپ III (PKS- III) (III آنزیمهای هومودایمری هستند که سایت فعال تک آنها در هر مونومر واکنشهای آماده‌سازی، گسترش یا طویل شدن و حلقوی کردن را به صورت تکرار شونده برای تشکیل محصولات PK کاتالیز می‌کند (۴ و ۲۵). علی رغم سادگی ساختار، PKS-IIIهای باکتریایی خود به ۵ گروه تقسیم می‌شوند که تعداد زیادی از آنها از *استرپتومیسس*ها شناسایی شده‌اند (۲۵).

NRPها از مهم‌ترین داروهای ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، سرکوب کننده‌های سیستم ایمنی و ضدتوموری هستند (۲). آنها همچنین می‌توانند ترکیبات فعالی مانند سیدروفورها را تولید کنند (۵). تعیین توالی NRPSهای مختلف نشان داده است که معمولاً این خانواده‌های ژنی شامل زیرواحدهای کاتالیتیک مودولار بوده و نظم قرارگیری این مودولها در کمپلکس آنزیمی معمولاً توالی پپتیدی را دیکته می‌کند (۲). هر مودول شامل سه دومین به نامهای آدنیلاسیون (A)، تیولاسیون (پروتئین حامل پپتیدیل) (T) و متراکم سازی (C) با نظم C-A-T است. سنتز یک NRP به وسیله یک NRPS شامل یک سری مراحل تکرار شونده است که به وسیله عملکردهای هماهنگ سه دومین CAT کاتالیز می‌شود (۲ و ۶). یک دومین چهارم (تیواستراز) اغلب در C–ترمینال NRPS وجود دارد که آزادسازی پپتید از NRPS را کاتالیز می‌کند. دومینهای اضافی که زنجیره پپتیدی در حال رشد را تغییر می‌دهند نیز می‌توانند بخشی از یک مودول NRPS باشند. دلیل مهم تنوع ساختاری زیاد NRP این است که دومینهای A به ۲۰ اسیدآمینه پروتئینوژنیک استاندارد محدود نمی-شوند. در حقیقت بیش از ۳۰۰ پیش‌ماده متفاوت در NRPها شناسایی شده است. NRPS ها دارای سه تیپ هستند: ۱) تیپ A، NRPS خطی. هر مودول یکبار در طول بیوسنتز NRP استفاده می‌شود. برای تیپ A، NRPS خطی، تعداد مودولها دلالت بر تعداد آمینواسیدهای وارد شده در یک NRP دارد؛ ۲) تیپ B، NRPSهای تکرار شونده. همه مودولها بیش از یکبار در طول بیوسنتز NRP استفاده می-شوند؛ ۳) تیپ C، NRPSهای غیرخطی. این گروه از قانون CAT تبعیت نکرده و بعضی از دومینهای خاص بیش از یکبار در طول بیوسنتز یک NRP عمل می‌کنند (۶).

غربال‌گری PKSها و NRPSها به عنوان دو گروه مهم ژنی دخیل در بیوسنتز متابولیتهای ثانویه یک راه سریع و میانبر برای اثبات پتانسیل تولید عامل ضدمیکروبی و کشف عوامل دارویی جدید می‌باشد. در این راستا سه سویه *استرپتومایسس* (*Streptomyces*) جدا شده در آزمایشگاه تحقیقاتی با نامهای Iz8 (KX229772)، F9 (KX417085) و F6 (KX229769) با ۱۰۰، ۹۹/۸۸ و ۹۹/۴۹ درصد تشابه با *استرپتومایسس کریلشنس* (*S. coerulescens*)، *استرپتومایسس کریزیوس* (*S. chryseus*) و *استرپتومایسس ماروکننسیس* (*S. marokkonensis*) برای مطالعه و تعیین میزان تنوع به ترتیب در ژنهای PKS-I، PKS-II و NRPS انتخاب شدند. پس از مشابه‌سازی (Cloning)، تنوع

دومینهای KS و متیل‌مالونیل تراسفراز (MT) در PKS-I، زیرواحد KSα در PKS-II و دومین A در NRPS با ژل پلی‌آکریل آمید بررسی و با تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی نشان داده شد.

مواد و روشها

الف) غربال‌گری اولیه ژنهای کد کننده PKS-I، PKS-II و NRPS به روش PCR لغزشی: DNA به روش CTAB استخراج شد (۱۴). پتانسیل ژنومی برای تولید متابولیتهای ثانویه در ۳ سویه Iz8، F9 و F6 با استفاده از ۳ جفت پرایمر لغزشی K1F/M6R برای تکثیر ناحیه بین دومینهای KS و MT در PKS-I، KSαF/KSαR، بخشی از زیرواحد KSα در PKS-II و A3F/A7R و ناحیه بین موتیفهای حفظ شده A3 و A7 در NRPS ارزیابی شد (جدول ۱). واکنش پلیمرازی برای تکثیر اولیه ژنها در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۳۰۰–۱۰ نانوگرم DNA ژنومیک استخراج شده به عنوان الگو، ۴–۰/۴ میکرومولار از هر یک از پرایمرها، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۲/۵ میکرولیتر DMSO و ۲/۵ واحد تک‌پلیمراز انجام شد. PCR در یک ترمال سایکلر گرادیانت اپندروف انجام شد. PCR شامل ۱) ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت اولیه DNA ، ۲) ۳۵ سیکل هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۵۷ درجه سانتی-گراد (برای K1F/M6R)، ۵۸ درجه سانتی گراد (برای KSαF/KSαR) و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (برای A3F/A7R) و ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و ۳) ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی بود. بعد ازانجام مراحل PCR، ۴ میکرولیتر از محصول PCR به همراه یک میکرولیتر از رنگ لود کننده درون چاهک ژل آگاروز ۱ درصد شامل اتیدیوم بروماید در بافر TBE 1x بارگذاری شد و در جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۱ ساعت قرار گرفت و سپس توسط UV ترانس لومیناتور دیده شد. باندهای ۱۴۰۰–۱۲۰۰، ۷۰۰–۶۰۰ و ۸۰۰–۷۰۰ جفت باز به ترتیب به عنوان محصولات تکثیر احتمالی ژنهای PKS-I، PKS-II و NRPS در نظر گرفته شدند (۳، ۸، ۱۲، ۱۳ و ۱۵). برای اطمینان و تأیید نهایی، محصولات PCR با سایز مربوطه با کمک کیت استخراج DNA از ژل (GeNet Bio, Korea) خالص و برای مشابه‌سازی استفاده شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای لغزشی برای تکثیر ژنهای PKS-I، PKS-II و NRPS.

نام پرایمر	توالی پرایمر	رفرنس
K1F	5′-TSAAGTCSAACATCGGBCA)-3′	(۲)
M6R	5′-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3′	(۲)
KSαF	5′-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3′	(۱۴)
KSαR	5′-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3′	(۱۴)
A3F	5′-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3′	(۲)
A7R	5′-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3′	(۲)

ب) محیط لیزوژنی: محیط لیزوژنی مایع (Lysogeny broth; LB) به عنوان یک محیط مغذی طی فرآیند مستعد سازی سلولها و محیط لیزوژنی جامد (Lysogeny agar; LA) انتخابی (حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی-سیلین) برای گزینش کلونهای ترانسفورم شده استفاده شد. محیط کشت LA شامل ۱۰ گرم بر لیتر تریپتون، ۱۰ گرم بر لیتر کلرید سدیم، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱۵ گرم بر لیتر آگار می‌باشد. در صورت پایین بودن pH محیط، با استفاده از محلول سود ۱ نرمال pH محیط به ۷/۵ رسانده شد (۱۸).

پ) محیط بهینه شده با سرکوب کاتابولیک: محیط بهینه شده با سرکوب کاتابولیک (Super optimal broth with catabolite repression; SOC) با ترکیب ۲۰ گرم بر لیتر تریپتون، ۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۰/۵۸ گرم بر لیتر کلرید سدیم، ۰/۱۸ گرم بر لیتر کلرید پتاسیم، ۰/۹۵ گرم بر لیتر کلرید منیزیم و ۳/۶ گرم بر لیتر گلوکز طی فرآیند تراریختی یا ترانسفورماسیون (Transformation) استفاده شد (۱۸).

ت) تهیه سلولهای مستعد برای مشابه‌سازی (Cloning): در این مرحله ابتدا از کشت شبانه *اشرشیا کلی* (*Escherichia coli*) سویه TOP10 به محیط LB استریل فاقد آنتی‌بیونیک با نسبت ۱ به ۴۹ تلقیح و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با دور ۱۴۰rpm انکوبه شد. پس از گذشت مدت مورد نیاز برای رسیدن به OD برابر با ۰/۶-۰/۵، فاکلون حاوی باکتری به منظور توقف رشد به مدت۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. تمامی محیط کشت در میکروتیوبهای ۱/۵ پخش و به مدت۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع روبی را بیرون ریخته، به باکتریهای رسوب داده شده مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر کلرید منیزیم ۱۰۰ میلی‌مولار سرد اضافه، با عمل پیپتینگ یک دست و به مدت۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. عمل سانتریفیوژ همانند مرحله قبل انجام شد (۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm و در ۴ درجه سانتی‌گراد). پس از دور ریختن مایع رویی، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار سرد به رسوب اضافه، به آرامی با عمل پیپتینگ یک دست و به مدت یک ساعت بر روی یخ قرار داده شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر نمونه‌ها همانند مرحله قبل (۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰rpm و در ۴ درجه سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شدند. مایع رویی را خارج کرده و به هر میکروتیوپ ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط ۷:۳ گلیسرول ۶۰ درصد:کلرید کلسیم ۱۰۰ میلی‌مولار استریل و سرد اضافه شد. پس از پیپتینگ کردن مخلوط به دست آمده تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۸).

ث) واکنش الحاق (Ligation): هدف، الحاق قطعات ژنی PKS-I از سویه Iz8، قطعات ژنی PKS-II از سویه F9 و قطعات ژنی NRPS از سویه F6 در وکتور pTG19-T (ساخت شرکت ویوانتیس، Vivantis) می‌باشد. با در نظر گرفتن نسبت بهینه ۳ به ۱ محصولات PCR به وکتور، مقدار نانوگرم محصول PCR مورد نیاز طبق پروتکل کیت محاسبه شد. به منظور برآورد تقریبی غلظت محصولات PCR استخراج شده از ژل از نشانگر وزنی DM3100 1Kb (0.25-10) ساخت شرکت اسموبیو (SMOBIO) استفاده شد و در نهایت حجم مورد نیاز برآورد شد. سپس واکنش الحاق در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل حجمی معادل نانوگرم قطعه مورد نیاز، ۴ میکرولیتر وکتور pTG19-T (۲۵ نانوگرم بر میکرلیتر)، ۲ میکرولیتر پلی اتیلن گلیکول ۵۰ درصد، ۲ میکرولیتر بافر اتصال ۱۰x و ۱ میکرولیتر آنزیم T4 (۵ Weiss بر میکرولیتر) در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت۱۶ ساعت انجام شد. حجم مورد نیاز از واکنش الحاق برای ترانسفورماسیون طبق فرمول کیت محاسبه شد.

ج)ترانسفورماسیون یا انتقال پلاسمیدها به باکتری: ابتدا سلول مستعد را به مدت۱۰ دقیقه به منظور خروج از یخ-زدگی بر روی یخ قرار داده سپس حجمی معادل ۸۰ نانوگرم از محصول واکنش الحاق به سلول مستعد اضافه شد. پس از مخلوط کردن، میکروتیوب مجدداً به مدت۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. نمونه به مدت۲ دقیقه داخل حمام آب گرم با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس بلافاصله به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. ۸۰۰ میکرولیتر از محیط استریل SOC به نمونه اضافه و برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در

انکوباتور شیکردار انکوبه شد. سپس نمونه به مدت۲ دقیقه در دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ و مایع رویی به نحوی که ۱۰۰ میکرو لیتر بر روی رسوب باقی بماند خارج شد. با عمل پیپتینگ به آرامی رسوب حاصله مخلوط شد. نمونه ترانسفورماسیون شده را در پلیت LA انتخابی حاوی آمپی-سیلین پخش کرده و به مدت۱۶ الی ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۱۸).

چ) غربال‌گری کلونهای دارای ژن مورد نظر با کلنی PCR: هر کلنی در یک پلیت LA انتخابی حاوی آمپی-سیلین جهت خالص‌سازی به صورت مجزا کشت داده شد. این روند سه بار تکرار شد. سپس جهت اثبات الحاق ژن مورد نظر به وکتور از کلنی PCR با جفت پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. ۴ میکرولیتر از محصول کلنی PCR هر سه ژن به همراه یک میکرولیتر از رنگ لود کننده درون چاهک ژل آگاروز ۱ درصد شامل اتیدیوم بروماید در بافر TBE 1xبرده شد و در جریان ۱۰۰ میلی آمپر به مدت۱ ساعت قرار گرفت و سپس توسط UV ترانس لومیناتور دیده شد. نمونه‌های مثبت از لحاظ وجود باند مورد نظر برای بررسی تنوع توالی و سایز بر روی ژل پلی آکریل‌آمید ۱۰ درصد برده شدند.

ح) بررسی تنوع توالی، ساختاری وتفاوتهای کوچک در سایز با ژل پلی آکریل آمید: ۳ میکرولیتر از هر نمونه مثبت با ۷ میکرولیتر از لودینگ بافر 3x (۰/۱۲۵ درصد بروموفنول بلو، ۰/۱۲۵ درصد گزیلن سیانول و ۱۵ درصد گلیسرول) مخلوط و درون چاهک ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد (۳۷/۵:۱ بیس‌آکریل آمید/ آکریل آمید) در بافر 1x TBE (۱ میلی مولار اتیلن دی آمین ترا استیک اسید، ۴۵ میلی مولار تریس-بورات با pH =۸) برده شد و به مدت ۲۲، ۱۷ و ۱۸/۵ ساعت به ترتیب برای PKS-I، PKS-II و NRPS در جریان ۲۲۰ میلی آمپر قرار گرفت و سپس ژل با محلولهای ثبوت (اسید استیک ۷/۵)، آب مقطر، رنگ‌آمیزی (نیترات نقره ۰/۱ درصد) و ظهور (۱/۵ درصد هیدروکسید سدیم و ۰/۱۵ درصد فرمالدهید) به ترتیب به مدت۲۰، ۱۰ ، ۳۰ و ۲۰-۱۵ دقیقه شیک شد و در هر مرحله بعد از دور ریختن محلول قبلی و افزودن محلول بعدی دوبار با آب مقطر به آرامی شستشو داده شد (۱۹).

خ) تأیید گروههای ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS با توالی یابی: جهت اطمینان از حضور ژنهای مورد نظر، بر پایه نتایج بدست آمده از ژلهای پلی آکریل‌آمید ۳ کلون با سایز متفاوت از PKS-I، دو کلون از PKS-II و ۳ کلون از NRPS برای تعیین توالی انتخاب شدند. استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید (GeNet Bio, Korea) طبق پروتکل ارائه شده انجام شد. پلاسمیدهای استخراج شده با پرایمرهای وکتور M13F و M13R در هر دو جهت با استفاده از یک توالی‌یاب اتوماتیک به وسیله ماکروژن تعیین توالی شد.

د) آنالیز فیلوژنتیک توالیهای PKS-I، PKS-II و NRPS: توالیها با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas نسخه 2.6 و Bioedit نسخه 7.1.11.0 ویرایش و با استفاده از ابزار BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI مورد بررسی و سپس با توالیهایی از نزدیک‌ترین دومینهای مرتبط با استفاده از نرم افزار PhyDE نسخه 0.9971 همردیف (Align) شدند. طول ردیف (Alignment) نوکلئوتیدی ۱۳۳۴، ۵۷۳ و ۷۱۳ باز و طول ردیف آمینواسیدی ۴۴۴، ۱۹۱ و ۲۳۷ آمینواسید (شامل الحاق و حذف) به ترتیب برای توالیهای PKS-I، PKS-II و NRPS بود. تعیین رابطه فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار مستربیز (MrBayes) نسخه 3.2.6 انجام شد. مستربیز نرم‌افزاری برای استنباط بیزی (Bayesian inference) با انتخاب طیف وسیعی از مدلهای فیلوژنتیکی و تکاملی می‌باشد (۱۷). مدل تکاملی GTR+I+G برای توالیهای نوکلئوتیدی و مدل Jones برای توالیهای آمینواسیدی انتخاب شد. مستربیز از روشهای مارکوف چین

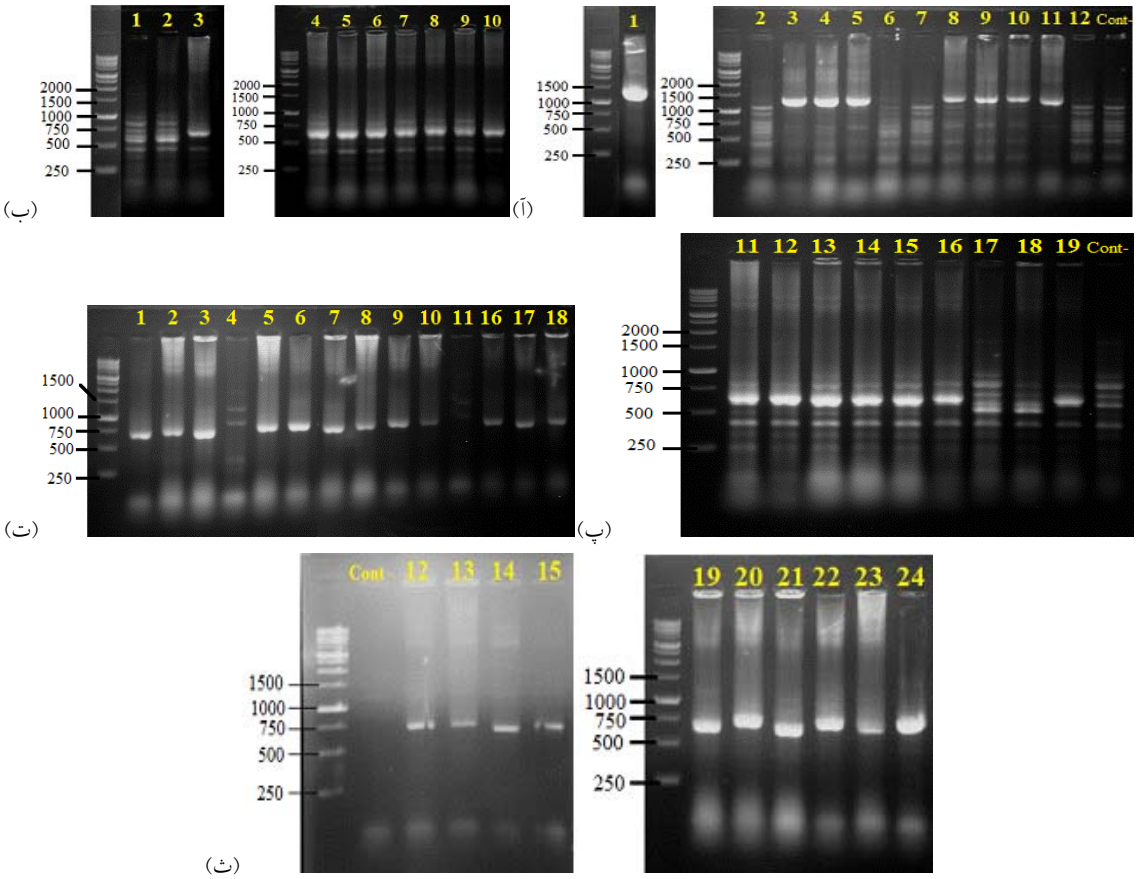
منته کارلو (Markov chain Monte Carlo; MCMC) برای برآورد توزیع احتمال پسین (Posterior probability distribution) پارامترهای مدل استفاده می‌کند. برای درخت فیلوژنی با همردیفی نوکلئوتیدی، دو اجرای موازی از ۴ زنجیره MCMC شامل سه زنجیره گرم و یک زنجیره سرد به صورت همزمان برای ۸ میلیون بار (Generation) (تشخیصها هر ۱۰۰۰ بار محاسبه شد) و برای درخت فیلوژنی با همردیفی آمینواسیدی، دو اجرای موازی شامل یک زنجیره سرد به صورت همزمان برای ۱ میلیون بار (تشخیصها هر ۱۰۰۰ بار محاسبه شد) گذاشته شدند. آنالیزها وقتی که انحراف معیار فراوانیهای خرد شده (Standard deviation of split frequencies) به زیر ۰/۰۱ رسید متوقف شد. اولین ۲۵ درصد از تکرارها سوزانده (Burn-in) شد. درختها با نرم‌افزار FigTree نسخه 1.2.2 دیده شدند (۲۲). حمایت شاخه‌ها در روش مستربیز با اعداد مربوط به احتمال پسین (Posterior probability; PP) بیان می‌شود.

نتایج

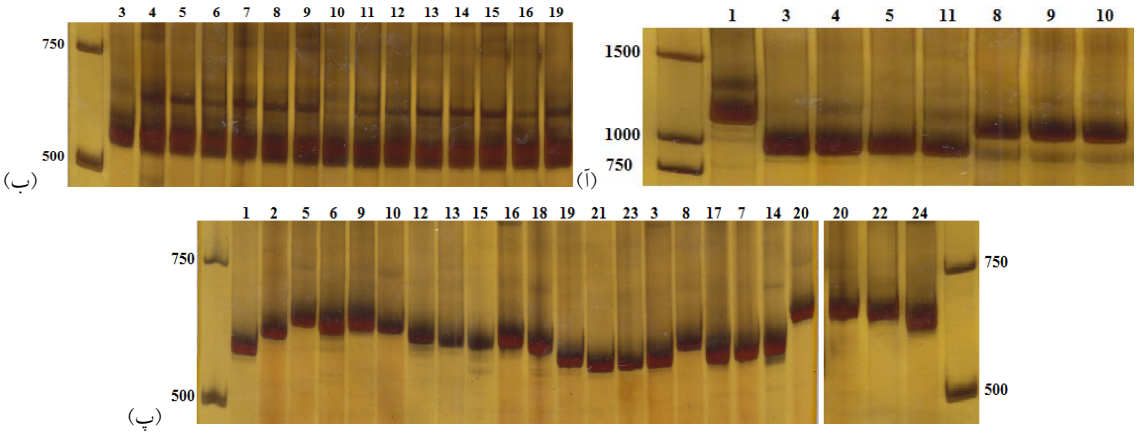
الف) انتقال قطعات ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS به درون وکتور TA: حضور احتمالی سه گروه ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS به ترتیب در سه سویه *استرپتومایسس* Iz8، F9 و F6 با کمک پرایمرهای لغزشی بررسی و اثبات شد. برای اطمینان و تأیید نهایی، محصولات PCR با سایز مربوطه به وکتور pTG19-T الحاق و سپس در *اشرشیا کلی* سویه TOP10 ترانسفورم شدند. ۱۲، ۱۹ و ۲۴ کلون به ترتیب از ترانسفورماسیون قطعات ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS جدا شد. کلونها تا ۳ مرحله کشت مجدد و خالص شدند. برای اطمینان از حضور ژنها در وکتور کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. از *اشرشیا کلی* سویه TOP10 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همان طور که در شکل ۱ دیده می‌شود ۸، ۱۵ و ۲۲ کلون قطعه ژنی مورد نظر را داشتند. محصول PCR کلونهای مثبت برای بررسی و مطالعه دقیق‌تر تنوع در توالی و سایز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید برده شد.

ب) بررسی و مطالعه تنوع در ناحیه بین دومینهای KS و MT خوشه ژنی PKS-I در سویه Iz8: همان طور که در شکل ۲ (آ) دیده می‌شود ۸ کلون به دست آمده از ترانسفورماسیون قطعات ژنی PKS-I در ۳ سایز متفاوت قرار می‌گیرند. یک کلون از هر سه سایز (کلونهای ۱، ۳ و ۸) برای استخراج پلاسمید و تعیین توالی انتخاب شد. نتیجه بدست آمده از بلست توالیهای تعیین شده توسط ماکروژن با توالیهای به ثبت رسیده در NCBI نشان داد که کلون ۱ با ۱۳۲۹ باز و ۷۵ درصد G+C یک ژن کاذب با تغییر چارچوب و تشابه ۹۴ درصدی (Query Cover=100%) با خوشه ژنی PKS-I متعلق به پلاسمید pSPA1 در *استرپتومایسس پاروالوس* (*S. parvulus*) سویه 2297 است. کلون ۳ با ۱۲۴۶ باز و ۷۲/۵ درصد G+C و کلون ۸ با ۱۳۰۳ باز و ۷۰ درصد G+C ژنهای عملکردی بودند. بیشترین تشابه (۸۵ درصد) (Query Cover=99%) کلونهای ۳ و ۸ به ترتیب با خوشه ژنی PKS-I متعلق به "پلاسمید pSPA1 در *استرپتومایسس پاروالوس* سویه 2297" و "ژن ShaA کد کننده PKS-I در *استرپتومایسس آلبوگریزئولوس* (*S. albogriseolus*) سویه MGR072 می باشد.

پ) بررسی و مطالعه تنوع در زیرواحد KSα در ژن PKS-II در سویه F9: کلون ۳ با ۶۱۳ باز و ۶۵/۴ درصد G+C، یک ژن کاذب با چندین کدون توقف درونی بود. کلون ۴ با ۶۱۳ باز و ۶۹/۲ درصد G+C دارای ۹۹ درصد تشابه (Query Cover=99%) با اولین خوشه ژنی PKS-II ثبت شده از گونه‌ای *استرپتومایسس* سویه MM1 بود.



شکل ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول کلنی PCR تمامی کلونهای تراسفورم شده با استفاده از پرایمر های اختصاصی K1F/M6R (آ)، KSαF/KSαR (ب و پ) و A3F/A7R (ت و ث) روی ژل آگارز ۱ درصد. شماره کلونها در بالای چاهکها ذکر شده است. قطعات ژنی PKS-I (آ)، PKS-II (ب و پ) و NRPS (ت و ث) به ترتیب سایز ۱۴۰۰-۱۲۰۰، ۷۰۰-۶۰۰ و ۸۰۰-۷۰۰ قابل مشاهده هستند. از نشانگر وزنی DM3100 1Kb (0.25-10)برای تخمین اندازه و غلظت و از *اشرشیا کلی* سویه TOP10 به عنوان کنترل منفی (Cont -) استفاده شد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول کلنی PCR کلونهای مثبت تأیید شده با ژل آگارز شامل قطعات ژنی PKS-I مرتبط با سویه Iz8 (آ)، PKS-II مرتبط با سویه F9 (ب) و NRPS مرتبط با سویه F6 (پ) روی ژل پلی آکریل‌آمید ۱۰ درصد (۳۷/۵:۱ بیس‌آکریل آمید/ آکریل آمید). شماره کلونها در بالای چاهکها ذکر شده است.

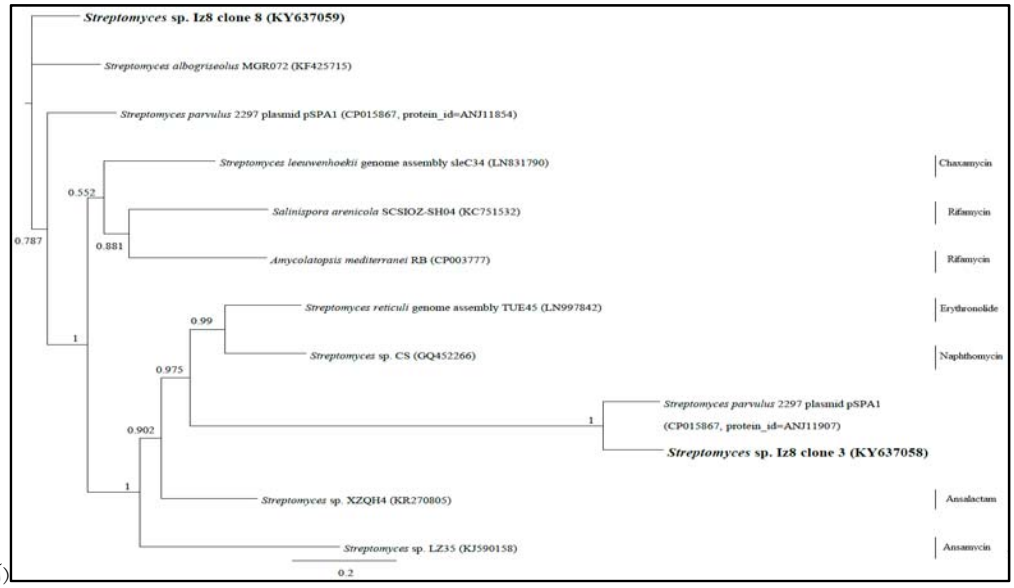
ت) بررسی و مطالعه تنوع در دومین A در ژن NRPS در سویه F6: کلونهای ۵ و ۲۰ با ۷۲۳ باز و ۷۰/۱ درصد G+C دارای توالی یکسان با ۹۲ درصد تشابه (Query Cover=99%) با خوشه ژنی NRPS در *استرپتومایسس پاکتوم* (*S. pactum*) سویه ACT12 بودند. کلون ۱۹ با ۶۶۴ باز و ۷۰ درصد G+C، ۹۵ درصد تشابه (Query Cover=98%) با زنجیره بلند اسید چرب کوآ لیگاز در *استرپتومایسس پاکتوم* سویه ACT12 و ۹۴ درصد تشابه (Query Cover=98%) با زنجیره بلند اسیدچرب کوآ لیگاز در گونه‌ای از *استرپتومایسس* سویه 2114.2 و سنتتاز وابسته به AMP در *استرپتومایسس پارولوس* سویه 2297 داشت.

ث) ثبت ژن در GenBank: کلونهای ۳ و ۸ از PKS-I، کلون ۴ از PKS-II و کلون ۵ از NRPS به ترتیب با شماره های KY637058، KY637059، KY637060 و KY637057 در پایگاه داده GenBank در سایت NCBI ثبت شدند.

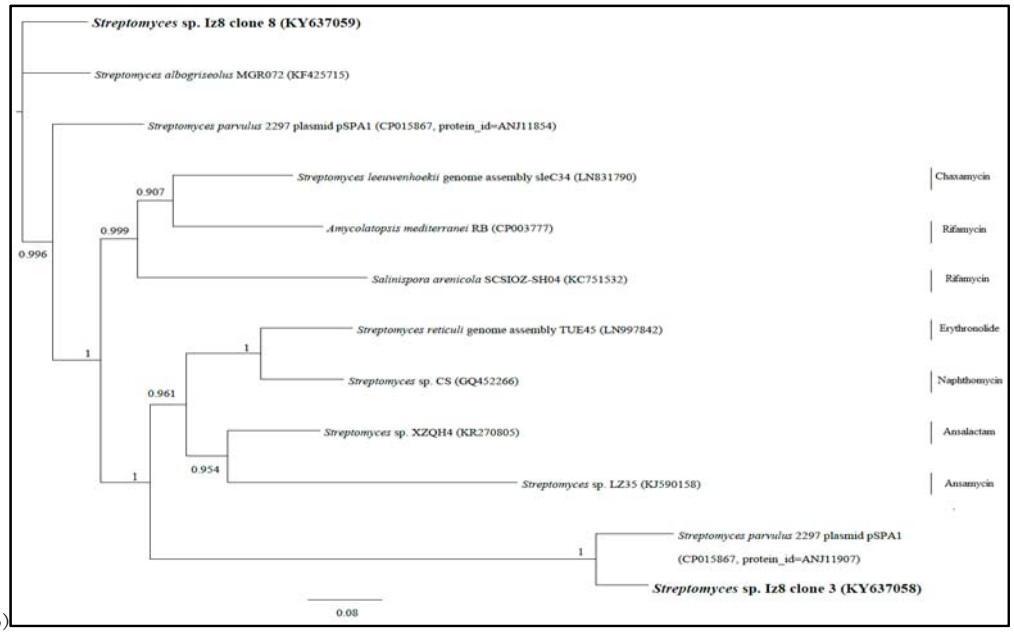
ج) رابطه تکاملی بین گروههای ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS در سویه‌های Iz8، F9 و F6 با نزدیکترین سویه-های مرتبط فیلوژنتیک: در هر دو درخت فیلوژنی با همردیفی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، کلون ۸ سویه Iz8 در کلاد جداگانه‌ای قرار گرفته (شکل ۳ آ و ب) و کلون ۳ با پروتئینی با شماره ANJ11907 در پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی NCBI از *استرپتومایسس پارولوس* سویه 2297، با احتمال شاخه‌ای ۱ در یک شاخه درونی از کلاد ۳ قرار می‌گیرد. مرتبط با سویه F9، درخت فیلوژنی با همردیفی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی به ترتیب به ۳ و ۴ کلاد مجزا تقسیم شد(شکل ۳ پ و ت). در هر دو درخت، کلون انتخاب شده از سویه F9 خود یکی از این کلادها بود. در درخت فیلوژنی بر اساس همردیفی نوکلئوتیدی سویه F6 (شکل ۳ ث) و نزدیکترین سویه‌های مرتبط فیلوژنتیک، کلاد ۳ با حمایت شاخه‌ای ۱ به ۲ شاخه مجزا تقسیم می‌شود. شاخه ۲ نیز با حمایت شاخه ای ۰/۵ به ۲ زیرشاخه تفکیک می‌شود. توالی نوکلئوتیدی دومین A سویه F6 کلون ۵ همراه با *استرپتومایسس پاکتوم* سویه ACT12، *استرپتومایسس آمبوفاشینس* (*S. ambofaciens*) سویه ATCC 23877، *استرپتومایسس سلیکالر* (*S. coelicolor*) سویه A3(2)، *استرپتومایسس لیویدانس* (*S. lividans*) سویه TK24، *استرپتومایسس سیلاسئوس* (*S. silaceus*) سویه و *نانوموریا* (*Nonomuraea*) سویه ATCC 3972 با حمایت شاخه‌ای ۰/۹ زیرشاخه ۲ را تشکیل می‌دهند. دومین A در *استرپتومایسس آمبوفاشینس* سویه ATCC 23877 و نانوموریا سویه ATCC 3972، در تولید سیدروفور نقش دارد. به علاوه این سویه تنها با احتمال شاخه‌ای ۰/۵ درصد که احتمال پایینی محسوب می‌شود از *استرپتومایسس ساب‌تروپیکوس* (*S. subtropicus*) سویه CGMCCIA A-182 در زیرشاخه ۱ از شاخه ۲ کلاد ۳ جدا می‌شود. دومین A در *استرپتومایسس ساب‌تروپیکوس* سویه CGMCCIA A-182 نیز در تولید سیدروفور نقش دارد. در درخت فیلوژنی بر اساس همردیفی آمینواسیدی نیز توالیها در ۳ کلاد متمایز قرار می‌گیرند (شکل ۳ ج). کلاد ۲ به ۲ شاخه تقسیم شد. دومین A در سویه F6 کلون ۵ همراه با *استرپتومایسس پراتنسیس* (*S. pratensis*) سویه ATCC 33331، *استرپتومایسس* سویه PAMC26508، *استرپتومایسس آمبوفاشینس* سویه ATCC 23877، *استرپتومایسس سلیکالر* سویه A3(2) و *استرپتومایسس لیویدانس* سویه TK24 با حمایت شاخه ای ۰/۶۴ دریکی از زیرشاخه‌های شاخه ۲ از کلاد ۲ قرار می‌گیرند. این در حالی است که *استرپتوماسس پاکتوم* سویه ACT12 که بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را با کلون ۵ دارد به طور مجزا زیرشاخه دیگری از شاخه ۲ از کلاد ۲ را تشکیل می‌دهد. با در نظر گرفتن نتیجه هر دو درخت احتمال اینکه قطعه ژنی توالی‌یابی شده مرتبط با تولید سیدروفور در این سویه باشد وجود دارد.

بحث

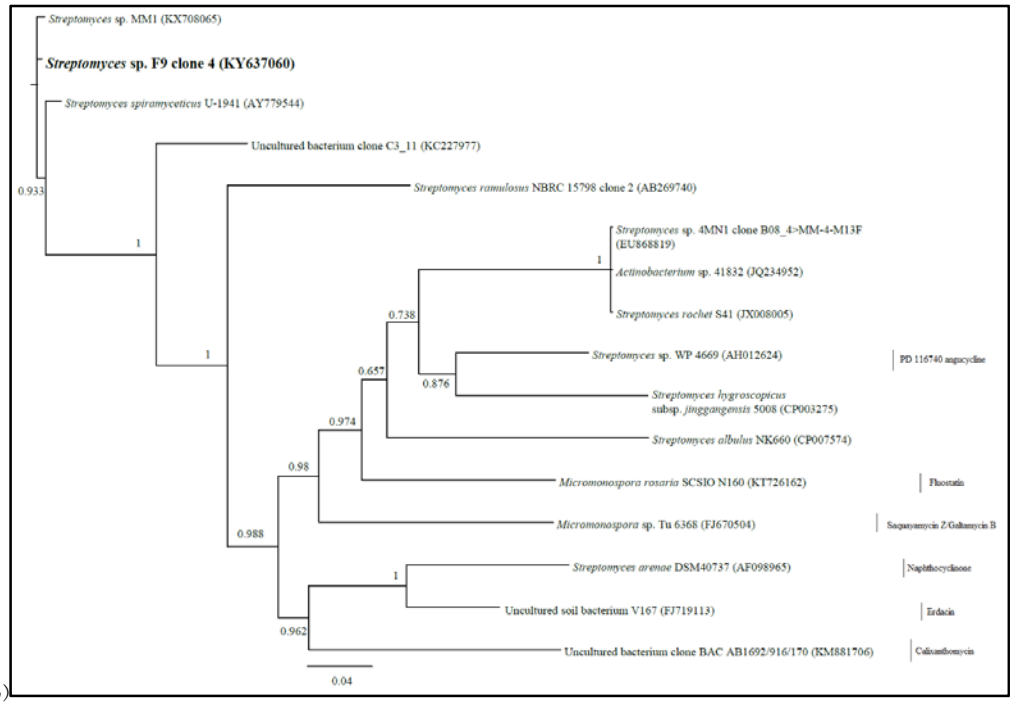
مسیرهای PKS و NRPS، به عنوان مشخصه‌های تولید متابولیت ثانویه، در تعداد زیادی از سویه‌های اکتینومیست شناسایی شده است (۱۱). جنس استرپتومایسس ۷۵ درصد آنتی‌بیوتیکهای طبیعی و دامنه وسیعی از سایر متابولیتهای ثانویه بر ضد عوامل انگلی، قارچی و همچنین ضدتومور و علف‌کش را تولید می‌کند (۱). از یک طرف، غربالگری اولیه سویه‌ها با پرایمرهای اختصاصی برای ژنهای مرتبط با متابولیت ثانویه (PKS-I، PKS-II، NRPS و غیره) یک روش مؤثر در شناسایی ترکیبات بوده (۱۶) و از طرف دیگر، غربالگری این ژنها می‌تواند در کشف سویه‌های با پتانسیل بالا برای تولید متابولیتهای ثانویه جدید بسیار حیاتی و ارزشمند باشد زیرا تعدادی از خوشه‌های ژنی سنتز کننده متابولیت ثانویه تحت شرایط کشت استاندارد غیرفعال یا خاموش بوده و ممکن است برای تولید به یک سری محرک نیاز داشته باشند.



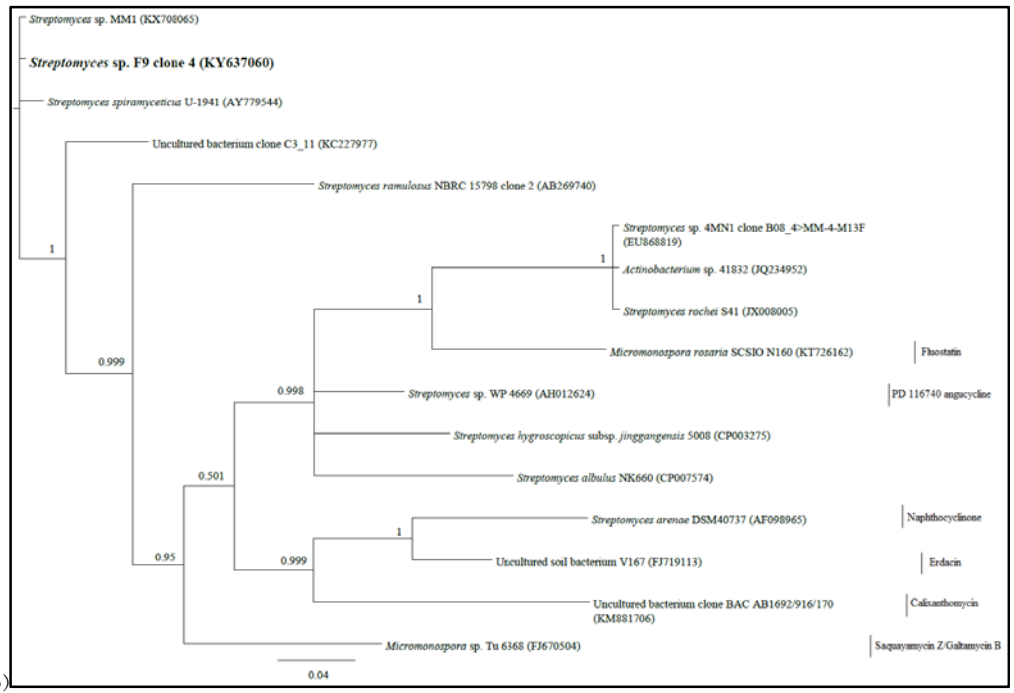
(آ)



(ب)



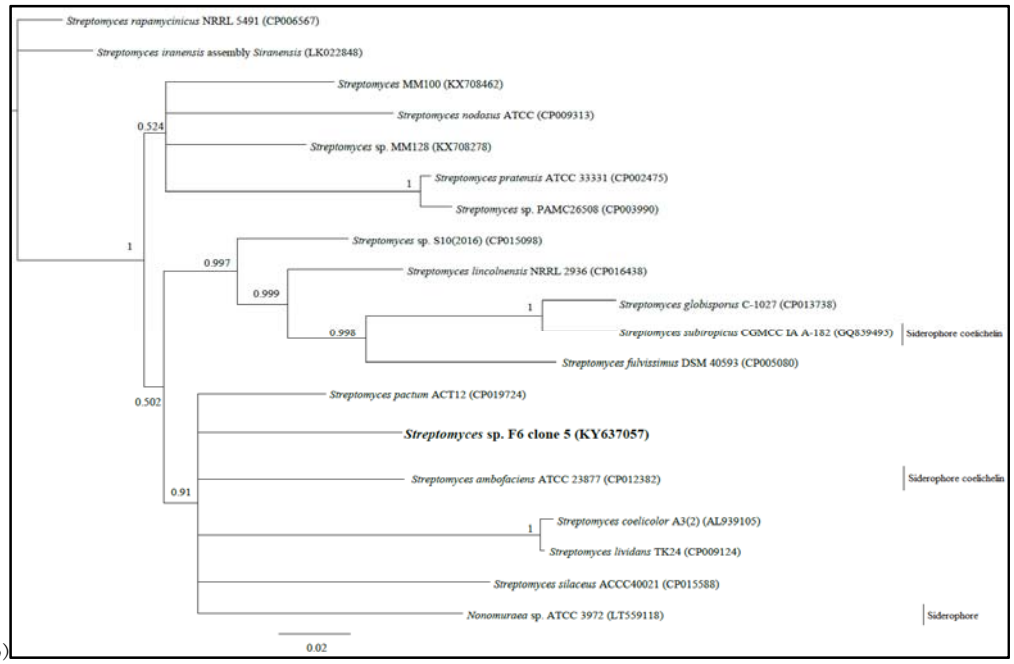
(پ)



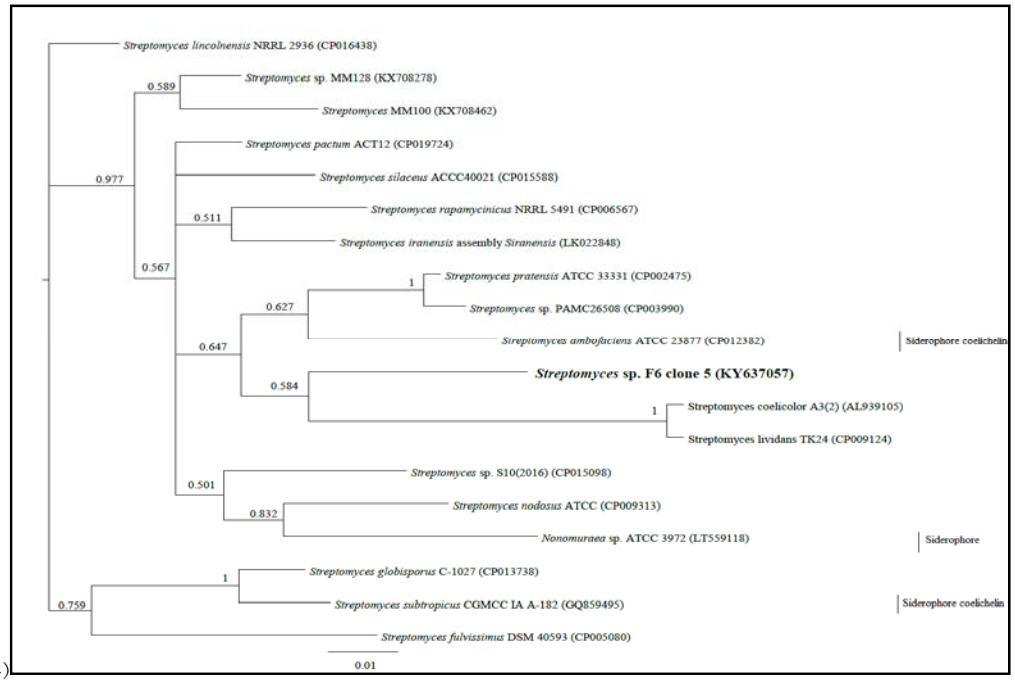
(ت)

در واقع سویه‌های غیرفعال زیستی تحت شرایط کشت مناسب، توانایی ژنتیکی برای تولید متابولیتهای ثانویه مفید را دارند (۱۱). وو (Wu) و همکاران در سال ۲۰۱۱ با کلونینگ قطعات ژنی با سایز پیش‌بینی شده برای NRPS و PKSدر *پانی‌باسیلوس* سویه F6-B70 و تعیین توالی چند کلون و مقایسه آنها با توالیهای ثبت شده در NCBI شاهد تشابه کمتر از ۸۱ درصد با متابولیتهای ثانویه شناخته شده بودند که به احتمال زیاد نشان دهنده آن است که باکتری ممکن است میزبان آنزیمهای جدید برای سنتز متابولیتهای ثانویه باشد.

در واقع آنها معتقد بودند که شرایط کشت موجود در مطالعه لزوماً بیان تمام ژنهای NRPS و PKS را امکان‌پذیر نمی‌سازد (۲۴). این نکته در عصر مقاومت به آنتی‌بیوتیک و نیاز بسیار بالا برای کشف سریهای جدید آنتی‌بیوتیک بسیار حائز اهمیت است.



(ث)



(ج)

شکل ۳- درخت فیلوژنی با تخمین بیزین برای توالی‌های تقریبا کامل ناحیه بین دومینهای KS و MT در PKS-I (آ: ردیف نوکلئوتیدی و ب: آمینواسیدی)، بخشی از زیرواحد KSα در PKS-II (پ: ردیف نوکلئوتیدی و ت: آمینواسیدی) و ناحیه بین موتیف‌های حفظ شده A3 و A7 در NRPS (ث: ردیف نوکلئوتیدی و ج: آمینواسیدی) ببه ترتیب در سه سویه Iz8، F9 و F6. احتمال شاخه‌ای گره‌ها در زیر هر شاخه نوشته شده است.

همان طور که گفته شد سایز قطعات ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS در ژل پلی آکریل‌آمید پایین‌تر از سایز پیش‌بینی شده به نظر می‌رسد بنابراین ژل آگارز برای بررسی و تعیین سایز قابل استنادتر است. همان طور که در شکل ژل آگارز دیده می‌شود تفاوت سایز زیادی در بین قطعات مرتبط با یک ژن دیده نمی‌شود و در واقع تفاوت بالا در سایز که در ژل پلی آکریل‌آمید مشاهده می‌شود به خاطر درصد GC بالا و وجود ساختارهای پیچیده و متفاوت بوده که سبب می‌شود این قطعات ژنی با سرعتی متفاوت از نشانگر حرکت کنند. با توجه به تمامی موارد ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت جایگیری قطعات مختلف در ژل پلی آکریل‌آمید احتمالاً بیش از آنکه به تفاوت در سایز قطعات مرتبط باشد به تفاوت در ساختار و ترکیب بر می‌گردد.

درخت فیلوژنی با همردیفی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی کلونهای سویه Iz8 و F9 نسبتاً شبیه بوده با این تفاوت که احتمالاًت شاخه‌ای در درخت آمینواسیدی بسیار بالاتر از نوکلئوتیدی بوده که تا حدودی نشان دهنده حفظ توالی آمینواسیدی نسبت به توالی نوکلئوتیدی طی تکامل می‌باشد. بر اساس هر دو درخت فیلوژنی با ردیف نوکلئوتیدی و آمینواسیدی دو فرضیه در مورد سویه Iz8 مطرح می‌شود یکی اینکه احتمالاً خوشه ژنی PKS-I در این سویه دارای دو دومین مشابه با دو دومین قبلاً گزارش شده از دو پروتئین متفاوت می‌باشد و ترکیب آنها احتمالاً سبب تولید محصولی جدید خواهد بود. احتمال دیگر اینکه دارای دو خوشه ژنی باشد به‌طوری‌که کلون ۳ یک دومین متعلق به خوشه ژنی PKS-I با احتمال تولید پروتئینی مشابه با ANJ11907 در *استرپتومایسس پارولوس* سویه 2297 بوده و کلون ۸ دومینی دیگر از خوشه ژنی متمایز با محصولی متفاوت و کاملاً جدید باشد. سویه F9 با وجود تشابه ۹۹ درصدی با *استرپتومایسس* سویه MM1، به صورت مجزا یکی از ۳ و ۴ کلاد را به ترتیب در درختهای فیلوژنی با همردیفی نوکتئوتیدی و آمینواسیدی تشکیل داد و با ابن سویه به عنوان زیرشاخه‌های یک کلاد کنار هم قرار نگرفتند. بنابراین احتمال تولید ترکیب جدید در این سویه نیز وجود دارد.

نتیجه‌گیری

محصول PCR سه گروه ژنی PKS-I، PKS-II و NRPS به ترتیب در سه سویه *استرپتومایسس* Iz8، F9 و F6 جدا شده در تحقیقات قبلی کلون و در *اشرشیا کلی* سویه TOP10 ترانسفورم شد. از هر یک از گروههای ژنی چند کلون برای تعین توالی انتخاب و پس از رسم درخت فیلوژنی با همردیفی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در نرم‌افزار مستربیز، احتمال تولید عوامل آنتی‌میکروبی جدید در سویه‌های نام برده بررسی شد. تعیین رابطه تکاملی احتمال حضور خوشه‌های ژنی با ترکیب‌بندی جدید و بنابراین تولید محصول جدید در سویه‌های Iz8 و F9 را نشان داد گرچه این امکان وجود دارد که به دلیل شرایط کشت و نیازمندی به سوبستراهای خاص این محصول تولید نشود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان به دلیل حمایت مالی این پایان نامه در مقطع دکتری تشکر و قدرانی ویژه به عمل می‌آورند.

منابع

۱- درویشی هرزویلی، ف.، گلبانگ، ن.، حجتی، ز.، متولی باشی، م.، ۱۳۸۵. جداسازی ژن تنظیم کننده تولید آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (*strR*) با PCR. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۹، شماره ۳، ۲۷۱-۲۶۴

2- Amoutzias, G. D., Chaliotis, A., Mossialos, D., 2016. Discovery strategies of bioactive compounds synthesized by nonribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases derived from marine microbiomes. Mar. drugs. DOI: 10.3390/md14040080

3- Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O., 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and

PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. Microb. Ecol. 49, 10-24.

4- Chan, Y. A., Podevels, A. M., Kevany, B. M., Thomas, M. G., 2009. Biosynthesis of polyketide synthase extender units. Nat. Prod. Rep. 26, 90–114.

5- Crosa, J. H., Walsh, C. T., 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66(2), 223-249.

6- Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., Thomas, M. G., 2008. Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. Mol. Pharm. 5, 191-211.

7- Hamedi, J., Imanparast, S., Mohammadipanah, F., 2015. Molecular, chemical and biological screening of soil actinomycete isolates in seeking bioactive peptide metabolites. Iran J. Microbiol. 7, 23-30.

8- Harrigan, W. F., 1998. Laboratory methods in food microbiology. London: Academic Press.

9- Hillenmeyer, M. E., Vandova, G. A., Berlew, E. E., Charkoudian, L. K., 2015. Evolution of chemical diversity by coordinated gene swaps in type II polyketide gene clusters. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112, 13952-13957.

10- Komaki, H., Ichikawa, N., Oguchi, A., Hamada, M., Tamura, T., Fujita, N., 2015. Genome-based analysis of non-ribosomal peptide synthetase and type-I polyketide synthase gene clusters in all type strains of the genus *Herbidospora*. BMC Res. Notes. 8, 548. DOI: 10.1186/s13104-015-1526-9

11- Lee, L. H., Zainal, N., Azman, A. S., Eng, S. K., Goh, B. H., Yin, W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., 2014. Diversity and antimicrobial activities of Actinobacteria isolated from tropical mangrove sediments in Malaysia. Sci. World J. DOI: 10.1155/2014/698178

12- Li, J., Dong, J. D., Yang, J., Luo, X. M., Zhang, S., 2014. Detection of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic genes from antimicrobial coralassociated actinomycetes. Antonie van Leeuwenhoek. 106, 623-635.

13- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2011. Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in Saharan soils of Algeria. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6710-6714.

14- Mesapogu, S., Jillepalli, C. M., Arora, D. K., 2013. Microbial DNA extraction, purification, and quantitation. In Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques. Arora, D. K., Das, S., Sukumar, M. (Eds). pp.1-16. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

15- Metsä-Ketelä, M., Salo, V., Halo, L., Hautala, A., Hakala, J., Mäntsälä, P., Ylihonko, K., 1999. An efficient approach for screening minimal PKS genes from Streptomyces. FEMS Microbiol. Lett. 180, 1-6.

16- Qin, S., Li, J., Chen, H. H., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., Xu, L. H., Li, W. J., 2009. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare Actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. Appl. Environ. Microbiol. 75, 6176-6186.

17- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics. 19, 1572-1574.

18- Sambrook, J., Russell, D. W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

19- Sanguinetti, C. J., Dias, N. E., Simpson, A. J., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques. 17(5), 914-921.

20- Seow, K. T., Meurer, G., Gerlitz, M., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C. R., Davies, J., 1997. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: A means to access and use genes from uncultured microorganisms. J. Bacteriol. 179, 7360-7368.

21- Shen, B., 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 285–295.

22- Stöver, B. C., Müller, K. F., 2010. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC Bioinformatics. DOI: 10.1186/1471-2105-11-7

23- Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., Sivonen, K., 2014. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 9259-9264.

24- Wu, X. C., Qian, C. D., Fang, H. H., Wen, Y. P., Zhou, J. Y., Zhan, Z. J., Ding, R., Li, O., Gao, H., 2011. Paenimacrolidin, a novel macrolide

antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6-B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb. Biotechnol. 4, 491-502.

25- Yu, D., Xu, F., Zeng, J., Zhan, J., 2012. Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis. IUBMB Life. 64, 285-295.

26- Zhang, Q., Pang, B., Ding, W., Liu, W., 2013. Aromatic polyketides produced by bacterial iterative type I polyketide synthases. ACS Catal. 3, 1439-1447.

The presence and phylogenetic position of polyketide synthase types I and II and nonribosomal peptide synthetase gene groups in *Streptomyces* strains Iz8, F9 and F6

Ghashghaei S., Etemadifar Z. and Tavassoli M.

Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

The screening of polyketide synthase (PKS) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene groups is a quick way to show the potential for antibacterial agent production and novel drugs discovery. With regard to this matter, the presence and the phylogenetic relationship of these gene clusters were studied in three *Streptomyces* strains. PCR amplification of PKS types I, PKS type II, and NRPS genes was performed using three degenerate primer sets in *Streptomyces* strains Iz8, F9 and F6, respectively. To separate the same-sized DNA fragments with different sequences, PCR products cloned to pTG19-T vector and then transformed to *Escherichia coli* TOP10. Polyacrylamide gel was used for the sequences variation. The purified plasmids were sequenced and phylogenetic trees were constructed using Bayesian inference, implemented in the MrBayes. PKS I clone 3 and 8, PKS II clone 4 and NRPS clone 5 were deposited in the NCBI GenBank database. Phylogenetic tree from aligned nucletotide or amino acide sequences of PKS I and II contained several differential clades. PKS I clone 8 and PKS II clone 4 were one of these clades. This could raise the production possibility of new antimicrobial agents. Construction of phylogenetic tree and determination of evolutionary relationships confirmed possibility of the presence of gene clusters with new compositions and therefore new products in strains Iz8 and F9.

Key words: polyketide synthase, nonribosomal peptide synthetase, polyacryle amide, cloning, phylogenetic tree