نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، ص.۴۳۴-۴۲۶

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 426-434

همسانه سازی ژن گزارشگر *lux*AB در باکتریهای بیمارگر گیاهی بومی‌ایران *Pseudomnas syringae* و *Ralostonia solanacearum*

سارا مستوفی[۱] - منصور مشرقی [۲*] - معصومه بحرینی [۳] - فاطمه عروجعلیان[۴] - پروانه پردلی [۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۱۹

چکیده

توانایی ردیابی یک میکروارگانیسم خاص در شرایط محیطی بسیار دشوار است. بسیاری از ژن‌ها مانند ژن لوسیفراز باکتریایی(*lux*AB) با ایجاد فنوتیپ‌های منحصر به فردی مانند تولید نور بیولومینسانس باعث ایجاد افتراق در سویه‌ها می‌شوند. در تحقیق حاضر ژن *lux*AB در دو پاتوژن مهم گیاهی سودوموناس سرینجی[۶] و رالوستونیا سولاناساریوم[۷] توسط روش الکتروپوریشن کلون گردید. برای لاکس مارک‌دار کردن سویه‌های فوق از ترانسپوزون miniTn-5 *lux*AB استفاده گردید. سویه‌های خالص شده با پلاسمید pUT که شامل ژن‌های *lux*AB بوده در دستگاه الکتروپوریتور، ترانسفورم گردیدند. الکتروپوریشن سویه‌های فوق در ولتاژ kv ۲/۵ و در مدت زمان ۵ میلی ثانیه انجام گردید. تمامی‌سویه‌های لاکس مارک‌دار شده توانایی رشد در محیط کشت کینگ ب[۸] حاوی ۱۲/۵ میکروگرم در هر میلی لیتر از محیط کشت تتراسیکلین را دارا بودند. به‌علاوه، اندازه گیری میزان شدت نور لومینسانس توسط دستگاه لومینومتر حاکی از الحاق موفقیت آمیز ژن *lux*AB در دو باکتری فوق می‌باشد. سویه‌های لاکس مارکدار شده سودوموناس سرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم به علت بیان پایدار نور لومینسانس، پتانسیل لازم را برای مطالعات بعدی در زمینه اثر شرایط مختلف محیطی بر بقا و فعالیت یک باکتری پاتوژن را دارا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس سرینجی، رالوستونیا سولاناساریوم، ژن *luxAB* ، ردیابی

مقدمه

با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و پلاسمیدهای قابل انتقال، باکتری‌های جدیدی ساختار بندی شده اند، این باکتری‌ها دارای فعالیت متفاوتی از سویه‌های اصلی (وحشی) خود می‌باشند (۳ و ۱۱). مهم‌ترین کاربرد میکرو ارگانیسم‌های مهندسی ژنتیک شده کارایی آن‌ها به عنوان گزارشگران زیستی به هدف ارزیابی شرایط محیطی بر پایه متابولیسم باکتری‌ها می‌باشد (۱۲). این باکتری‌ها قادر به تولید سیگنال‌های قابل شناسایی و ردیابی می‌باشند که در محیط‌های گوناگون و شرایط محیطی مختلف کاربرد قابل توجهی دارند (۲۰). استفاده از باکتری‌های گزارشگر به طور موفقیت آمیزی در ارزیابی میزان بقای باکتری‌های مهم توسط محققان زیادی استفاده شده است (۱۵).

ژن‌های لاکس[۹] که عامل پدیده ای بنام بیولومینسانس در باکتریها می‌باشند به عنوان ژن گزارشگر به طور وسیعی برای ساخت این گزارش گرهای زیستی استفاده شده است(۸، ۹ و ۱۰). واکنش بیولومینسانس به شدت هوازی بوده به صورتیکه میکروارگانیسم‌های هوازی اختیاری فقط در حضور اکسیژن دارای فعالیت لومینسانس هستند. همچنین لومینسانس طبیعی باکتریایی اساسا در محیط آبی مشاهده گردیده است (۱۶).

ژن‌های گزارشگر لاکس به پروموتورهایی متصل میشوند که

۱- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی لاهیجان
۲- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد و عضو گروه تحقیقات بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:mashrghi@ferdowsi.um.ac.ir)
۳ و ۵- به ترتیب استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد
۴ - دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

6- *Pseudomonas syringae*
7- *Ralostonia solanacearum*
8- King B medium (KB)
9- lux

به‌طور پیوسته تا زمانی که میکروارگانیسم زنده بوده و از نظر متابولیکی فعال است، بیان میشود. این نوع از گزارشگرها را می‌توان برای بررسی فعالیت و بقای یک میکروارگانیسم خاص در محیط طبیعی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار داد (۱۷، ۱۸ و ۲۱).

ویژگی‌های اکولوژیکی باکتری‌های خاک‌زی مهم مانند گونه‌های سودوموناس، انگیزه ای را برای ساخت بیوسنسورهایی از طریق الحاق ژن لاکس درون باکتریهای مذکور ایجاد می‌کند. این میکروگانیسم‌ها به علت حضور در نقاط گسترده محیط زیست و جوابگویی به دستکاری ژنتیکی، انتخاب میگردند(۲۳ و ۲۴). به عنوان مثال، بقا و فعالیت باکتری دستکاری ژنتیکی شده سودوموناس استوتزرای *lux*AB4[1] که بطور طبیعی قدرت تجزیه کنندگی فنانترین[2] را دارا می‌باشد به علت دارا شدن ژن کد کننده آنزیم لوسیفراز (*lux*AB) بوسیله تکنیک جهش زایی درون جاگیری[3] در شرایط مختلف آزمایشگاهی قابل بررسی بوده است. ورود ژن جدید به این باکتری تاثیر معنی داری در روند رشد باکتری نداشته است، لذا به راحتی و سرعت می‌توان آن را در شرایط مختلف ردیابی نمود(۱۹). همچنین باکتری سودوموناس فلورسنس[4] دارای شاخص لوسیفراز توسط پروتئوس و همکاران(۲۶)طراحی گردید. این باکتری نوترکیب برای بررسی استرس‌های القایی که توسط مواد آلوده کننده ای که بر روی گردش کربن در ریزوباکتریوم اثر میگذارند مورد استفاده قرار گرفت.

ما نیز از گونه خاصی از جنس سودوموناس به نام‌های سودوموناس سرینجی و باکتری رالوستونیا سولاناساریوم که قبلا جزء گروه سودوموناس‌ها طبقه بندی شده بود برای همسانه سازی ژن‌های گزارشگر استفاده گردید. انتخاب این دو باکتری بیشتر از آن جهت بوده که باکتری‌های مورد نظر در این تحقیق دارای طیف وسیعی از بیماری زایی در میزبان‌های متعدد گیاهی بوده که از نظر صنعتی و اقتصادی دارای اهمیت می‌باشند.

باکتری سودوموناس سرینجی یک باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی و دارای تاژک است و معمولا در دماهای زیر ۳۰°C رشد می‌کند (۱۳) و در عرض ۴۸ ساعت کلونی‌های سفید وکرمی رنگی به قطر ۲ـ۱ میلی متر ایجاد می‌کند. این باکتری یک بیمارگر گیاهی محسوب میشود که می‌تواند روی طیف وسیعی از گونه‌های گیاهان علفی و درختان میوه خسارت زا باشد. بیماری‌زایی بیشتر شامل آسیب سرمازدگی بوده که با تولید پروتئین هسته زای یخ[5] انجام می‌شود این مکانیسم درجه یخزدگی آب را تا چندین درجه بالاتر برده، همینطور باعث بیرنگ شدن زیتون سبز، قهوه‌ای شدن سریع برگ‌ها و خال‌های نکروز شده به قطر ۲ـ۱ میلی متر بر روی برگ خواهد شد که منطقه نکروز شده باهاله سبز رنگی احاطه شده است (۲).

رالوستونیا سولاناساریوم باکتری گرم منفی میله ای شکل است که خاستگاه آن خاک است، و باعث پژمردگی و یا پوسیدگی در بسیاری از میزبان‌های گیاهی شامل، تنباکو، سیب زمینی، موز، و بادام زمینی میشود. این باکتری سبب خسارت شدید در محصولات گیاهی می‌شود که در سرتاسر دنیا کشت و برداشت می‌شوند و همچنین دارای میزبان‌های گیاهی بسیار متعددی بوده که بیش از پنجاه خانواده گیاهی را در بر می‌گیرد (۳۰).

در این تحقیق ژن‌های گزارشگر لوسیفراز در سویه‌های سودوموناس سرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم از طریق الکتروترانسفورمیشن[6] با هدف بررسی رفتار این میکروارگانیسم در شرایط مختلف همسانه سازی شوند. لذا با لاکس مارکدار کردن باکتری‌های مزبور می‌توان بقا و فعالیت آنها را در مدت زمان کوتاه و با هزینه پایین نه تنها در محیط آزمایشگاه بلکه در محیط طبیعی آنها مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار داد تا موثر بودن عوامل کنترل کننده این نوع باکتریهای پاتوژن راحت تر مورد ارزیابی قرار گرفته و به این طریق بتوان راهکارهای بهتری برای جلوگیری از شیوع بیماری‌های گیاهی مرتبط ارائه داد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های باکتری مورد استفاده

باکتری‌های سودوموناس سرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم جدایه‌های بومی‌هستند که از کلکسیون مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران تهیه گردیده است. این باکتری‌ها در محیط‌های کشت کینگ ب و تریپتون سویا براث[7] (شرکت مرک[8]، آلمان) در دمای ۳۰°C رشد داده شدند. سویه *Escherichia coli* cc118 λ pir از مرکز تحقیقات ملی بیوتکنولوژی، مادرید اسپانیا تهیه گردید. سویه مزبور نمونه دست ورزی شده می‌باشد که حاوی ژن تولید کننده نور لومینسانس در mini-Tn5 transposon می‌باشد، که این ترانسپوزون در داخل پلاسمید pUT قرار گرفته است. باکتری فوق در محیط کشت لوریا برتانی[9] (شرکت مرک، آلمان) حاوی تریپتون (۰/۵ درصد وزنی /حجمی)، عصاره مخمر (۰/۵ درصد وزنی /حجمی) و سدیم کلراید (۰/۵ درصد وزنی /حجمی) در دمای ۳۷°C رشد داده شد. به محیط‌های کشت جامد و مایع برای رشد سویه‌های لاکس

1- *P.stutzeri*
2- Phenanthrene
3- Insertional mutagenesis
4- *P.fluorescens*
5- Ice nucleation protein
6- Electrotransformation
7- Trypton soy broth(TSB)
8- Merck
9- Luria Bertani (LB)

مارک شده با غلظت ۲۵µg/ml و یا ۵۰µg/ml از آنتی بیوتیک تتراسایکلین اضافه گردید.

استخراج پلاسمید

ساختار اصلی پلاسمیدی که در این تحقیق برای انتقال ژن‌های لاکس به سویه‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت مشابه پلاسمید pUT mini Tn*5*-*lux*ABCDE می‌باشد (۲۹). اندازه این پلاسمید ۱۰/۴ kb می‌باشد و حاوی مینی ترانسپوزون mini-Tn5 *lux*AB transposon است که منشاء ژن لاکس در این مینی ترانسپوزون ژن‌های لوسیفراز باکتری ویبریو فیشری[1] می‌باشد. ترانسپوزون mini-Tn5 از یک کاست sfi 1 حامل مارکرانتخابی (ژن مقاومت به تتراسیکلین) و محل اثر آنزیم محدود کننده Not I که در خارج از کاست می‌باشد و برای کلون کردن DNA خارجی استفاده می‌شود، تشکیل شده است. در این نوع وکتورها قطعه DNA موردنظر به ترانسپورزون متصل شده و سپس با شیوه‌های مهندسی ژنتیک به کرومزوم باکتری هدف ملحق می‌گردد.

استخراج پلاسمید در این تحقیق مطابق با دستورالعمل کیت اختصاصی استخراج پلاسمید (Gene jet plasmid mini prep kit # k0502#k0503) (شرکت اپندورف[2]، آلمان) انجام شد و در مرحله بعد برای تایید پلاسمید استخراجی، الکتروفورز بر روی آگاروز ۱ درصد انجام گردید و نوار پلاسمید بر روی ژل مشاهده گردید.

الکتروپوریشن

عمل الکتروپوریشن برای انتقال پلاسمید نوترکیب بر روی باکتری‌های سودوموناس سرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم بر طبق روش داور و همکاران (۶) صورت گرفت. اولین مرحله، تهیه کشت مایع TSB (۱۵ گرم تریپتون، ۵ گرم سویتون و ۵ گرم NaCl به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر) از باکتری مورد نظر با کدورت 1= Abs_{600nm} بود. سپس ۱/۵ میلی لیتر از این محیط کشت رسوب گیری شد و توسط بافر هپس[3] ۱ میلی مولار شستشوی سلولی در سه مرحله انجام شد. رسوب حاصل از مراحل شستشوی سلولی در بافر هپس ۱ میلی مولار دارای ۱۰ درصد گلیسرول، سوسپانسیون شد. در انتها ۱۰۰µl از این محلول به همراه ۱۰µl پلاسمید خالص شده به کووت مخصوص الکتروپوریشن منتقل شده و در ولتاژ ۲/۵ KV و در زمان ۵ms در دستگاه الکتروپوریتور (شرکت اپندورف، آلمان) قرار گرفت. در ادامه به سوسپانسیون سلولی، ۱ میلی لیتر محیط کشت SOC[4] (۲۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۲ میلی لیتر NaCl ۵ مولار، ۲/۵ میلی لیتر KCl ۱ مولار، ۱۰ میلی لیتر $MgCl_2$ ۱ مولار، ۱۰ میلی لیتر $MgSO_4$ ۱ مولار، و ۲۰ میلی لیتر گلوکز ۱ مولار به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر) اضافه شد و بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۷ °C، از این محیط مایع بر روی محیط‌های انتخابی با غلظت ۱۰۰ $\frac{\mu g}{ml}$ آنتی بیوتیک تتراسایکلین کشت داده شد. ظهور کلنی بر روی محیط کشت دارای تتراسایکلین بیانگر انجام ترانسفورمیشن و بیان ژن مقاومت به تتراسایکلین که مارکر پلاسمید مورد نظر در این تحقیق است، می‌باشد.

ارزیابی بهترین شرایط الکتروترانسفورمیشن برای بالاترین راندمان در انتقال ژن گزارش گر *lux*AB صورت گرفت. این شرایط به ترتیب شامل جذب نوری مناسب محیط کشت برای رسوب گیری جهت الکتروپوریشن، تراکم سلولی به کار رفته در الکترو پوریشن، میزان غلظت DNA بر روی فرکانس ترانسفورمیشن و بافر مورد استفاده برای شستشوی سلولی و در آخر قدرت پالس دهی در هنگام الکتروپوریشن بودند.

غربالگری سویه‌های لاکس مارکدار شده

تک کلونی حاصل از رشد باکتری‌های ترانسفورم شده به روش الکتروپوریشن بر روی محیط کشت TSB با غلظت ۲۵µg/ml تتراسیکلین توسط لوپ برداشته شده و در محیط کشت TSB با غلظت ۲۵ µg/ml تتراسیکلین در مدت زمان ۴۸ ـ ۳۲ ساعت با دور ۲۰۰rpm انکوبه گردید. سپس محیط کشت مایع حاوی باکتری‌های رشد داده شده برای سنجش نوری استفاده شد و میزان نور لومینسانس باکتری‌ها توسط دستگاه لومینومتر[5] (مدل اف بی ۱۲ شرکت برتهولد[6] آلمان) اندازه‌گیری گردید.

نکته مهم در مورد باکتری‌های ترانسفورم شده این است که این باکتری‌ها فقط توانایی سنتز آنزیم لوسیفراز را داشته که مربوط به دو ژن *luxA* و *luxB* می‌باشند و فاقد ژن‌های مربوط به سنتز سوبسترای آلدئیدی یعنی ژن‌های : *lux* C ،*lux* E ،*lux* D می‌باشند. به این دلیل قبل از انجام سنجش نور لومینسانس باید به نمونه‌ها آلدئید (شرکت مرک، آلمان) یا همان دکانال اضافه گردد. بدین منظور درصدهای مختلفی از آلدئید تهیه گردید (۰/۱ ٪، ۱٪، ۱۰٪) و غلظت‌های مختلفی از آن (۰/۱ تا ۵۰۰ میکرولیتر) به محلول حاوی باکتری لاکس مارکدار شده اضافه گردید و میزان نور توسط دستگاه لومینومتر در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه ای اندازه گیری گردید.

1- *Vibrio fischeri*
2- Eppendorph
3- Hepes
4- Super Optimal Broth with Cathabolic Repression
5- Luminometer
6- Berthold FB12

رسم منحنی رشد باکتری لاکس مارکدار شده در برابر باکتری وحشی

لوله‌های آزمایش درب دار حاوی محیط کشت TSB با و بدون ۲۵ µg/ml آنتی بیوتیک تتراسایکلین با کلونی‌های خالص شده دوباکتری لاکس مارکدار شده، تلقیح گردیدند و در دمای ۲۸°C به مدت ۲۴ تا۴۸ساعت و با دور ۲۰۰ rpm انکوبه شدند. بعد از مشاهده کدورت باکتری‌ها در درجه حرارت مربوطه میزان نوردهی نمونه‌های لاکس مارک شده در مدت ۲ ساعت و با فواصل ۱۵ دقیقه در دستگاه لومینومتر اندازه گیری گردید و نمودار میزان لومینسانس باکتری بر حسب RLU/s[1] نسبت به زمان و با استفاده از نرم افزار اکسل[2] رسم گردید.

نتایج

شرایط بهینه رشد باکتری‌های وحشی

نتایج به دست آمده از ارزیابی میزان رشد سودوموناس سرینجی بر روی محیطهای کشت: KB، TSB، LB و سودوموناس آگار[3] بیانگر سرعت رشد بالای باکتری در سه محیط کشت KB، P.Agar و TSB می‌باشد. رشد بهینه برای این گونه دمای ۲۶°C بدست آمد البته باکتری در دماهای ۴°C و ۳۷°C نیز قادر به رشد می‌باشد در صورتیکه باکتری رالوستونیا سولاناساریوم توانایی رشد در دماهای ۴°C را نداشت. کلونی‌های حاصل از کشت خالص باکتری سودوموناس سیرینجی سفید تا کرمی‌رنگ، دارای حاشیه نامنظم و سطح محدب می‌باشد. همینطور کلونی‌های هر دو باکتری لعابدار[4] گزارش شد. برای اطمینان از عدم آلودگی احتمالی، از کشت میکروبی حاصل، رنگ آمیزی گرم انجام شد که باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی و صورتی رنگ مشاهده گردید.

در مورد باکتری رالوستونیا سولاناساریوم نیز بهترین شرایط رشد که منتج به ایجاد کلنی‌های مشخص در مدت زمان کوتاه می‌باشد، ارزیابی شد. نتایج به دست آمده حاکی از رشد مناسب و بالای این سویه در محیطهایKB، TSA و P.Agar و رشد متوسط بر روی محیط کشت LB می‌باشد. همچنین باکتری در دمای ۲۶- ۲۷ درجه سانتیگراد در مدت زمان ۴۸ ساعت بهترین رشد را دارا می‌باشد. سرعت رشد این باکتری در مقایسه با سودوموناس سیرینجی، بیشتر بوده و در دمای ۳۷°C نیز قادر به رشد میباشد. بر خلاف سودوموناس سیرینجی این باکتری قادر به رشد در دمای ۴°C نبوده است. تک کلونی‌های حاصل از کشت خالص این باکتری کرم رنگ، محدب باحاشیه نامنظم و بدون رنگدانه بوده است. کلونی این باکتری نیز از نظر ظاهری لعابدار (موکوئیدی) می‌باشد، با این تفاوت که نسبت به سودوموناس سیرینجی شدت آن کمتر می‌باشد. جهت اطمینان از عدم آلودگی احتمالی کشت‌های باکتریایی خصوصا توسط باکتری‌های گرم مثبت تند رشد و مخمر، در مراحل مختلف رشد و تکثیر باکتری رنگ‌آمیزی گرم انجام شد که حضور باسیل‌های گرم منفی صورتی رنگ در زیر میکروسکوپ این اطمینان را حاصل نمود.

همسانه سازی با پلاسمید pUT mini- Tn5 *lux*AB

قبل از انجام الکتروپوریشن استخراج پلاسمید و الکتروفورز نمونه استخراج شده برای تایید حضور پلاسمید انجام گردید (شکل ۱) . اندازه پلاسمید pUT mini- Tn5 *lux*AB ۱۰/۴ کیلوباز است که در آن ژن بدون پروموتور *lux*AB در داخل ترانسپوزون mini- Tn5 قرار گرفته است. پلاسمید به طور تصادفی در مناطقی از ژنوم میزبان الحاق خواهد شد، بسته به اینکه در کدام منطقه ژنومی این اتفاق رخ دهد، بیان ژن *lux*AB این پلاسمید وابسته به پروموتری خواهد شد که در بالادست آن قرار گرفته است.

بهینه سازی عمل الکتروپوریشن سویه‌های هدف

در انجام عمل الکتروپوریشن، بهینه سازی شرایط الکتروپوریشن بسیار با اهمیت بوده و به خصوصیات باکتری‌های مورد نظر وابسته است. فاز مناسب برای رسوب گیری باکتری جهت الکتروپوریشن در انتهای فاز لگاریتمی‌وابتدای فاز سکون بوده است. در این فاز میزان جذب نوری محیط کشت در $Abs_{600nm} \cong 1$ است.

تراکم سلولی به کار گرفته شده در الکتروپوریشن (جدول ۱)، یکی دیگر از موارد دارای اهمیت در میزان راندمان الکتروترانسفورمیشن است. نتیجه‌های به دست آمده توسط محققان نشان‌دهنده یک رابطه مستقیم بین تعداد سلول‌های به کار رفته در الکتروپوریشن و کارایی ترانسفورمیشن بوده است (۶).

جدول ۱- مقایسه اثر تراکم سلولی بر انجام عمل الکتروپوریشن باکتریهای سودوموناس سرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم.
(+ : حضور کلنی - : عدم حضور کلنی)

Strain	Cell density		
	$۱\times۱۰^{۸}\frac{cfu}{ml}$	$۱\times۱۰^{۱۶}\frac{cfu}{ml}$	$۱\times۱۰^{۲۴}\frac{cfu}{ml}$
P. syringae	+	-	+
R. solanacerium	+	-	+

از آنجا که غلظت بالای DNA به کار برده شده در الکتروپوریشن باعث جرقه زدن دستگاه خواهد شد و به کارگیری

1- Relative Light Unit/second
2- Excel
3- Pseudomonas agar (P. Agar)
4- Mucoid

پلاسمید در مقدار کم باعث کارایی پایین و عدم انجام ترانسفورمیشن خواهد شد. در این تحقیق ابتدا غلظت DNA استفاده شده در الکتروپوریشن برای هر سه باکتری مورد نظر بهینه شد. روش کار در جهت کاربرد بالاترین غلظت DNA برای دست یابی به بیشترین راندمان ترانسفورمیشن تنظیم گردید. میزان اضافه کردن پلاسمید به ترتیب در شاخص‌های ۵، ۱۰، ۱۲ و ۲۰ میکرولیتر مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف DNA پلاسمید بر انجام عمل الکتروپوریشن باکتری‌های سودوموناس سرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم (- : عدم حضور کلنی + : تعداد کم کلنی (کمتر از ۵ عدد) ++ : تعداد متوسط کلنی (بین ۵ الی ۱۰ کلنی) +++: تعداد زیاد کلنی (بیش از ۱۰ عدد))

	Plasmid concentration			
Strain	5 µl	10 µl	12 µl	20 µl
P. syringae	++	-	+++	-
R. solanacerium	-	++	+++	-

درانجام الکتروپوریشن، مرحله‌ای است به نام مستعدسازی[1] باکتری، این مرحله قبل از انجام الکتروپوریشن به هدف برداشتن نمک‌های معدنی و مواد الی موجود در محیط کشت باکتری انجام می‌گردد. در صورت کامل انجام نشدن این مرحله، و باقی‌ماندن محیط کشت در سوسپانسیون سلولی، مقاومت سوسپانسیون سلولی پایین بوده و دستگاه الکتروپوریتور در هنگام پالس‌دهی جرقه خواهد زد. مواد شستشو دهنده سلولی مختلفی به هدف برداشتن کامل محیط کشت توسط محققین مورد استفاده قرار گرفته است بعضی از این محلول‌ها شامل آب مقطر، محلول سوکروز ۳۰۰ میل مولار و بافر هپس ۱ میلی‌مولار بوده است. در تحقیق حاضر تنها دو محلول سوکروز و هپس برای دست یابی به بالاترین فرکانس الکتروترانسفورمیشن مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین خصوصیات سویه‌های ترانسفورم شده

جهت صحت انجام الکتروپوریشن و تایید در تفاوت سویه‌های ترانسفورم شده با سویه‌های وحشی، مقاومت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین که مارکر پلاسمید به کار رفته در این تحقیق است، مورد بررسی قرار گرفت. هردو سویه وحشی باکتری‌های سودوموناس سیرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم، در محیط کشت با غلظت ۲۵ µg/ml کشت گردیدند که نتایج بیانگر عدم رشد سویه‌های مذکور در محیط کشت بوده است. در مقابل سویه‌های ترانسفورم شده هر دو باکتری، توانایی رشد در محیط کشت جامد و محیط کشت مایع تکمیل شده با غلظت مورد نظر از آنتی بیوتیک تتراسایکلین را دارا بودند. از آنجائیکه ژن مقاومت به تتراسیکلین در داخل مینی ترانسپوزون در کنار ژن‌های *luxA* و *luxB* قرار داشته است و به همراه ترانسپوزون به داخل ژنوم باکتری وارد گردیده است، این شاخص میتواند به عنوان یک صفت جدید کروموزومی‌در سویه‌های ترانسفورم شده باکتری‌های مورد نظر محسوب گردد. حساسیت باکتری لاکس مارکدار شده در مقایسه با سویه وحشی در دو باکتری سودوموناس سیرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم در شکل ۴ نشان داده شده است.

شاخص دیگر دو باکتری ترانسفورم شده در این تحقیق ژن‌های گزارشگر لوسیفراز *luxA* و *luxB* می‌باشد که تنها کد کننده آنزیم لوسیفراز بوده و بنابر این در هنگام سنجش میزان لومینسانس سویه‌های ترانسفورم شده باید سوبسترات آلدئیدی به سوسپانسیون سلولی اضافه گردد.

در این تحقیق میزان اضافه کردن حجم‌های مختلفی از سوبسترای آلدئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. این حجم‌ها به ترتیب شامل: ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۲، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، میکرولیتر از آلدئید ۱۰٪ در ۱ میلی لیتر از کشت باکتری مورد نظر با کدورت مناسب بود. نتایج حاکی از بهترین میزان نوردهی در حجم ۲۰۰µl از آلدئید بود که به ترتیب در دو باکتری سودوموناس سیرینجی و رالوستونیا سولاناساریوم شامل، RLU/S ۵۰۰۰۰، RLU/S ۶۰۰۰۰، در مدت زمان ۱۲۰ دقیقه بود (شکل‌های ۲ و ۳).

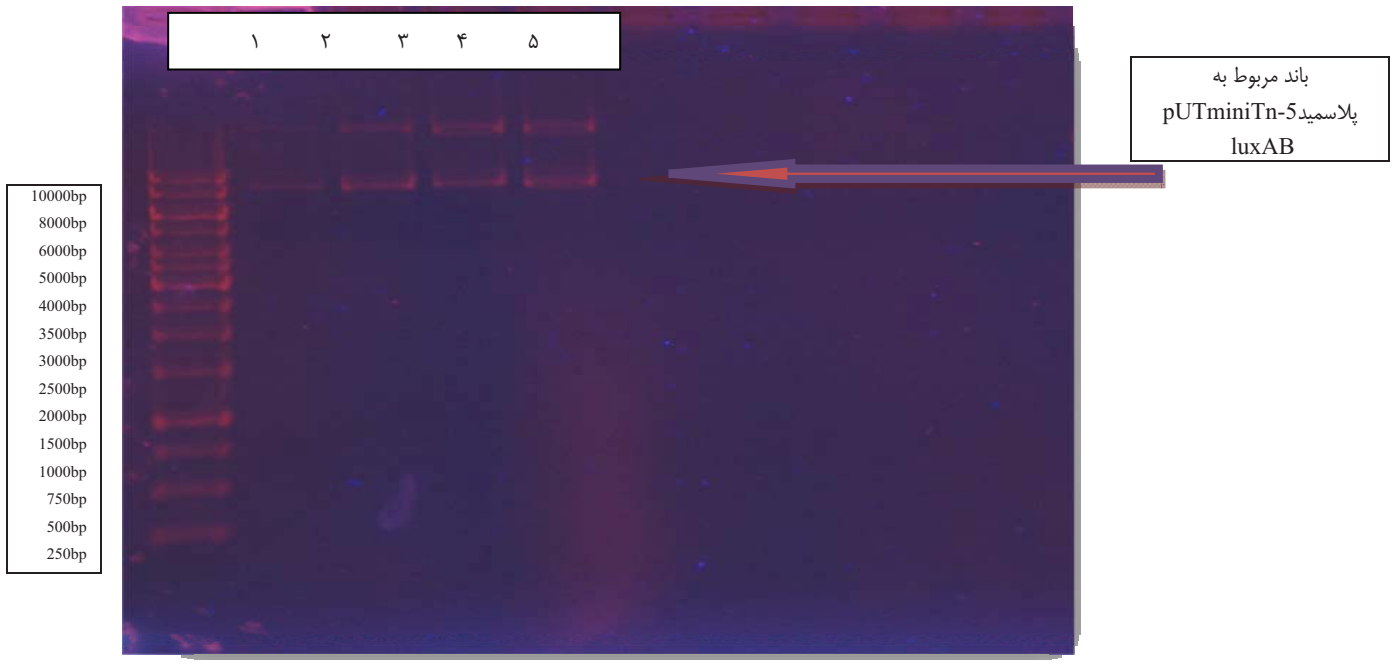
بحث

در این تحقیق برای کلون سازی ژن *lux*AB در باکتری‌های هدف از روش الکتروترانسفورمیشن استفاده گردید. بدین منظور بهینه‌سازی این روش برای بدست آوردن بهترین راندمان در دستور کار قرار گرفت.

در مورد محیط‌کشت مناسب، ارزیابی‌های انجام شده مشخص نمود که باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق بر روی محیط کشت‌های KB، P.Agar، TSB دارای میزان رشد بالایی هستند. اما برای باکتری سودوموناس سیرینجی دمای بهینه رشد ۲۶°C و رالوستونیا سولاناساریوم ۲۶-۲۷ درجه سانتی‌گراد در مدت ۴۸ ساعت گزارش گردید.

محیط‌کشت تریپتون سویا براث به‌عنوان یک محیط‌کشت مناسب برای انجام کارهای کلون سازی ژن در باکتری‌ها توسط محققین دیگری مانند مشرقی و همکاران (۱۷-۱۹) که بر روی ورود ژن لاکس به داخل باکتری سودوموناس استوتزرای کار کرده اند، استفاده شده است.

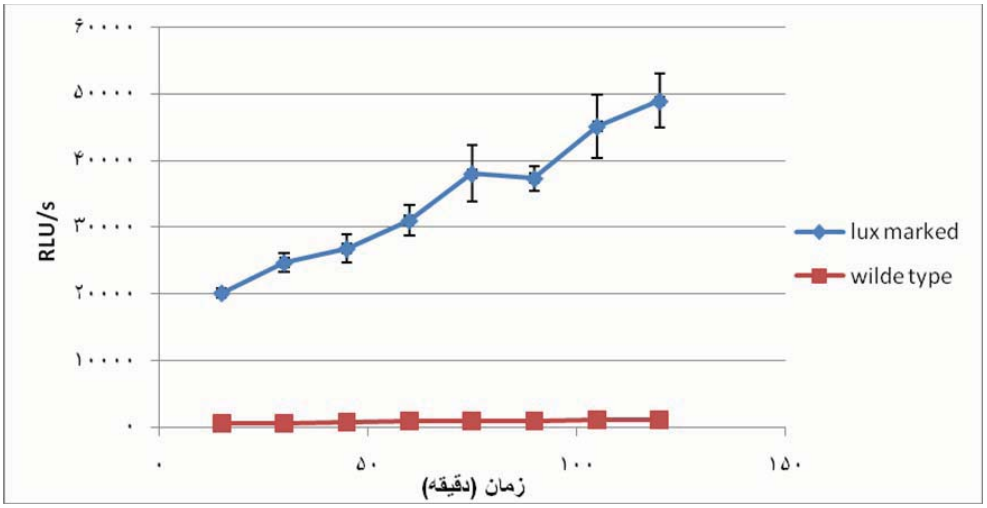
1- Making competent cells



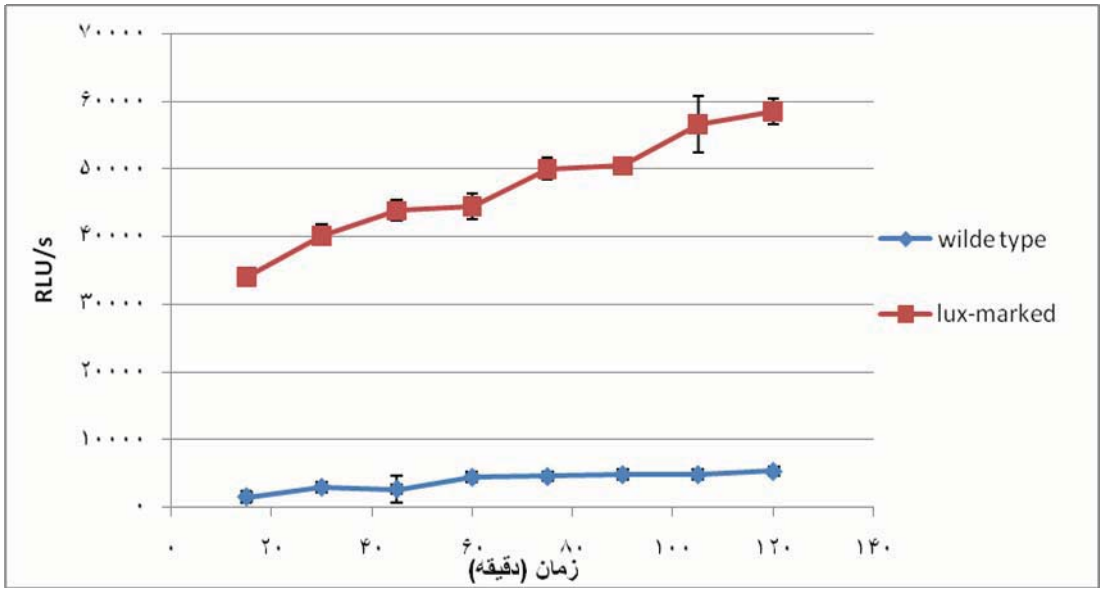
شکل ۱ - الکتروفورز نمونه‌های حاصل از استخراج پلاسمید سویه‌های باکتریایی

که به ترتیب عبارتند از:چاهک اول :مارکر (یک کیلو بازی)- چاهک دوم تا پنجم:*E.coli* cc118 λpir

همچنین آهن و همکاران (۱) در تحقیقاتشان از روشی مشابه با آزمایشی که در این پروژه استفاده شده است برای کلون سازی ژنی متفاوت (gfp) استفاده نمودند که با موفقیت نیز همراه بوده است. دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و استفاده از محیط‌کشت کینگ ب شرایطی بود که توسط کونگ و همکاران (۱۴) برای رشد سودوموناس سرینجی مورد استفاده قرارگرفته است. همین‌طور نتایج کالوزنا و سوبی چفسکی (۱۳) حاکی از رشد دادن این باکتری بر روی محیط کشت KB در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۴۸ ساعت بود.



شکل ۲ -تغییرات شدت نور لو مینسانس سویه لاکس مارکدار شده باکتری سودوموناس سیرینجی در مقایسه با سویه وحشی



شکل۳-تغییرات شدت نور لومینسانس سویه لاکس مارکدار شده باکتری رالوستونیا سولاناساریوم در مقایسه با سویه وحشی

همچنین بهترین کدورت برای انجام الکتروپوریشن Abs_{600nm}= 1 بود که تقریباً بعد از ۳۲ ساعت ایجاد میگردد. محققین مختلف نیز به نتایج مشابهی دست یافته اند بعنوان مثال در تحقیقی که توسط سلیمان و همکاران (۲۷) بر روی الکتروپوریشن باکتری سودوموناس پوتیدا[1] و سودوموناس اولئوورانس[2] انجام شد، از کشتی با کدورت Abs_{600nm}=1 استفاده گردید. البته در مطالعاتی که توسط دایور و همکاران (۶) بر روی الکتروپوریشن سودوموناس آئروجینوزا[3] انجام شد، از کشت مایعی دارای کدورت Abs_{600nm}=0/5-1 رسوب گیری انجام گرفت. همچنین داور و همکاران (۷) بهترین کدورت برای رسوب گیری سلولی جهت انجام الکتروپوریشن اشریشیا کلی را در Abs_{600nm}=1 تشخیص دادند.

با توجه به اهمیت تراکم سلولی استفاده شده برای الکترو پوریشن، در این تحقیق مشخص گردید که ۱×۱۰^{۸} تا ۱×۱۰^{۹} $\frac{cfu}{ml}$ غلظت سلولی مناسب بر انجام عمل الکتروترانسفورمیشن می‌باشد. میزان تراکم سلولی که توسط اولسن و همکاران (۲۲)، در الکتروپوریشن سلولی سودوموناس سیرینجی و سودوموناس آئروجینوزا به کار گرفته شد شامل ۱×۱۰^{۱۱} cfu/ml بود، که با فراوانی قابل قبولی به ترانسفورمیشن نتیجه داد. همچنین تراکم سلولی ۱×۱۰^{۸} cfu/ml تا ۱×۱۰^{۱۰} cfu/ml سلول مستعد توسط محققان دیگر (۵،۱۳) در الکتروپوریشن باکتری‌های سودوموناس فلورسنس و سودوموناس آئروجینوزا به کار گرفته شد.

با توجه به اهمیت غلظت پلاسمید به کاربرده شده در عمل الکتروپوریشن، مشخص گردید که غلظت ۱۲ میکرولیتر مناسبترین غلظت برای بالاترین راندمان الکتروپوریشن است. در مطالعاتی که توسط دایور و همکاران (۶) بر روی الکتروپوریشن سودوموناس آئروجینوزا انجام شد از میزان ۱۰ µl پلاسمید در حجم ۱۰۰µl از سلول‌های مستعد جهت پالس دهی در دستگاه الکتروپورتور استفاده شد. داور و همکاران(۷) کارایی ترانسفورماسیون ۸۰٪ را در به کارگیری $\frac{ng}{ml}$ ۷/۵ از پلاسمید نشان دادند.

میزان جریان الکتریکی برای الکتروپوریشن گونه‌های مختلف باکتریایی متفاوت است. ولی برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بهترین شرایط الکتروترانسفورمیشن مشابه با روش‌هایی است که در مورد باکتری *E.coli* و مخمر ساکارومیسس سرویزیه[4] به کار گرفته میشود. زیرا این دو گونه در انجام الکتروپوریشن و تحقیقاتی که امروزه انجام میشوند بسیار متداول هستند. در این تحقیق از دو ولتاژ ۱/۵ و ۲/۵ کیلوولتی در زمان ۵ ms برای الکتروپوریشن هر دو باکتری هدف استفاده شد. نتایج در مقایسه با ارزیابی دیگر محققان که بر روی دیگر سویه‌های پاتوژن گیاهی کار کرده اند، مطابقت می‌کند (۱۴،۲۵).

باکتری‌هایی که دارای کاست کامل لوسیفراز هستند، احتیاج به اضافه کردن سوبسترای آلدئیدی ندارند، چون درحالت عادی توانایی سنتز سوبسترای آلدئیدی را دارا هستند. در مقابل بیوسنسورهایی هستند که در این نوع از میکروارگانیسم‌ها میزان نوردهی بعد از افزودن سوبسترای آلدئیدی مورد بررسی قرار میگیرد، و بسته به نوع باکتری این مقدار از آلدئید میتواند متغیر باشد، و بهینه گردد (۵،۲۸).

نتایج حاکی از بهترین میزان نوردهی در حجم ۲۰۰ µL از آلدئید

1- *P. putida*
2- *P. oleovorans*
3- *P. aeruginosa*
4- *Saccharomyces cervisiae*

بـه ازای ۵۰۰ میکرولیتـر محـیط حـاوی بـاکتری در دو بـاکتری سودوموناس سیرینجی و سودوموناس سولاناساریوم در مدت زمـان ۲ ساعت بود در حالیکه حجم‌های ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر از آلدئید به ترتیب دارای راندمان پایین تری در هر دو باکتری مورد نظـر بـوده است. به این صورت که مدت زمان رسیدن آن‌هـا بـه نقطـه حـداکثر نوردهی کوتاه بوده ولی با افت شدید میزان نوردهی بعد از ایـن مـدت زمان همراه خواهد بود که ممکن است به دلیل حساسیت باکتری و به دنبال آن مرگ میکروارگانیسم به دلیل تراکم بـالای الکـل در آلدئیـد اضافه شده به محیط باشد. همچنین میـزان نـوردهی در غلظـت‌هـای ۰/۰۱ و ۰/۱ میکرولیتر از آلدئید مشهود نبوده و در حجم‌های۱، ۲، ۱۰ میکرولیتر بعد از ۲۴ ساعت میزان نوردهی برای هـر دوبـاکتری مـورد نظر به ترتیب، RLU/S ۲۰۰۰، RLU/S۲۱۰۰، بـود. کـه احتمـالا بیـان کننـده متابولیـسم بـسیار کنـد ایـن بـاکتری‌هـا و یـا مقـدارکم سوبـسترای آلدئیـدی بـرای فعـال شـدن آنـزیم لوسـیفراز باشـد. در بررسی‌های انجام شده میزان پایداری لومینسانس برای هر دو باکتری سودوموناس سیرینجی و سودوموناس سولاناساریوم به طـور متوسـط به ترتیب شـامل، RLU/S ۶۰۰۰، RLU/S ۷۰۰۰ کـه از دو روز بعد از اضافه کردن آلدئید تا مدت ۷ روز ثابت باقی خواهد ماند.

از دیگر موارد تحقیق در این آزمایش میزان کدورت محیط کشت و زمان سنجش نور لومینسانس از کشت مایع باکتری مورد نظر بـوده است. کدورت مورد نیاز برای محیط کشت باکتری‌های مورد نظـر در OD_{600nm}= ۱/۹ که در این کـدورت، بـاکتری‌هـا بـه انتهـای فـاز تصاعدی و یا ابتدای فاز سکون رسیده اند. از آنجا که زمان مورد نیـاز برای رسیدن به این کدورت برای هر گونه از باکتری متفـاوت اسـت. این زمان مورد ارزیابی قرار گرفت و برای هر دو باکتری سـودوموناس سیرینجی و سودوموناس سولاناساریوم زمان ۴۸ سـاعت مـورد تاییـد قرار گرفت.

در ارزیابی‌هایی که پیتون و همکـارانش (۲۴) بـر روی آزادسـازی نوری در باکتری‌های دارای شاخص لومینسانس که به ترتیـب شـامل *E.coli* HB101، *P.putida* F$_1$tn5، *P.putida* TVA8، بودند، انجام شد. ابتدا نمودار رشد این باکتری‌ها نسبت به زمان کشیده شد و بهترین زمان برای سنجش میزان نور لومینسانس مـورد بررسـی قـرار گرفت. نتیجه‌های این محققین حاکی از انتخـاب مقطـع انتهـایی فـاز لگاریتمی‌و یا ابتدای فاز سکون برای بیشترین میزان نوردهی هـر سـه باکتری مورد نظر این محققین بود.

در خاتمه باید ذکر نمود که باکتری‌هـای پـاتوژن گیـاهی لاکـس مارک شده با ژن گزارشگر *lux* AB در مقایـسه بـا بـاکتری کنتـرل مثبت (سودوموناس پوتیدا[1]) کـه در حـدود ۳۰ میلیـون RLU/s نـور خروجی آن بوده است دارای نوری با شدت متوسط بـوده و پایـدار بـه مدت تقریباً ۵ روز می‌باشد. دو بـاکتری لاکـس مارکـدار شـده درایـن تحقیق که از نمونه‌های بومی‌ایران میباشد را میتـوان بـه سـهولت در شرایط مختلف محیطی بر اساس بیـان ژن لاکـس آن ردیـابی نمـود. همچنین اثرات عوامل ضد میکروبی و سموم را نیـز میتـوان بـر روی این باکتری‌ها بررسی نموده و به باکتری‌های وحشی تعمیم داد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده فناوری زیـستی دانـشگاه فـردوسی مـشهد بـرای حمایت از این تحقیق با کد پروژه ۱۰۰۱۱۴ قدردانی میگردد. از آقـای مهندس ابوالقاسم قاسمی‌عضو هیـات علمـی‌موسـسه تحقیقـات گیـاه پزشکی کشور برای در اختیار قرار دادن سویه‌های بـومی‌ایـران کمـال تشکر و سپاس را داریم.

منابع

1- Ahn Y. B., Beaudette L.A., Lee H., and Trevors J.T. 2001. Survival of a GFP labeled polychlorinated biphenyl degrading psychrotolerant *Pseudomonas* spp. in 4 and 22°C Soil Microcosms. Microb. Ecol. 42:614–623
2- Arrebola E., Cazorla F., Codina J., Gutiérrez-Barranquero J., Pérez-García A., and de Vicente A. 2009. Contribution of mangotoxin to the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. syringae. Int. Microbiol. 12:87-95
3- Artiquenave F., Vilagines R., and Danglot C. 1997. High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. FEMS Microbiol. Lett. 153:363-369.
4- Bloemberg G.V., O'toole G.A., Lugtenberg B.J., and Kolter R. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4543-4551.
5- Bundy J.G., Campbell C. D., and Paton G. I. 2001. Comparison of response of six different luminescent bacterial bioassays to bioremediation of five contrasting oils. J. Environ. Monit. 3:404-410.
6- Diver J. M., Bryan. L. E., and Sokol. P. A. 1990. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. Anal. Biochem. 189:75-79.
7- Dower W. J., Miller. J. F., and Ragsdale. C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. 16:6127-6145

1- *Pseudomonas putida*

8- Durham K.A., Porta D., Twiss M.R., McKay R.M.L. and Bullerjahn G.S. 2002 Construction and initial characterization of a luminescent *Synechococcus* sp. PCC 7942 Fe-dependent bioreporter. FEMS Microbiol. Lett. 209:215-221.
9- Ferguson Y., Bricknell I.R., Glover L.A., MacGregor D.M., and Prosser J.I. 1998. Colonisation and transmission of *lux*-marked and wild-type *Aeromonas salmonicida* strains in Atlantic salmon (Salmo salar L.). FEMS Microbiol. Ecol. 27: 251-260.
10- Ferguson Y., Glover L.A., McGillivray D.M., and Prosser J.I. 1995. Survival and activity of *lux*-marked *Aeromonas salmonicida* in seawater. Appl. Envrion. Microb. 61: 3494-3498.
11- Ford S., and Olson B.H. 1988. Methods for detecting genetically engineered microorganisms in the environment. Adv. Microb. Ecol. 10: 45-79.
12- Harms H. 2007. Biosensing of heavy metals. In: Nies DH and Silver S, eds. *Molecular microbiology of heavy metals.* Berlin: Springer, Microbiology monographs 6/2007 pp143-157.
13- Kałużna M., and Sobiczewski P. 2009. Virulence of *Pseudomonas Syringae* Pathovars and races originating from stone fruit trees. Phytopathologia 54:71-78
14- Kong H., Patterson C. D., Zhang W., Takikawa Y., Suzuki A., and Lydon A. 2004. A (PCR) Protocol for identification of *Pseudomonas syringae* pv. tagetis based on genes required for tagetitoxin production. Biol. Control 30: 83-89
15- Lindow S.E. 1995. The use of reporter genes in the study of microbial ecology. Mol. Ecol. 4: 555-566.
16- Madigan M. T., Martinko J. M., and Parker J. 1997. Biology of Microorganisms. 8th ed. Prentice Hall, London.
17- Mashreghi M. 2005. Influence of matric potential on survival and activity of genetically engineered *Ralstonia eutropha* H850 Lr. J. Sci. IRI 16: 117-123
18- Mashreghi M., Prosser J. I. 2004. Construction and characterization of a *lux*-marked phenanthrene degrading bacterium. Iran. J. Biotechnol. 2(4):243-249.
19- Mashreghi M., Prosser J. I. 2006. Sruvival and activity of *lux*-marked phenanthrene –degrading *Pseudomonas stutzeri* P16 under different conditions. Iran. J. Sci. Technol. A. 30 : 71-79
20- Mckay R.M.L., Porta D., Bullerjahn G.S., Al-Rshaidat M.M.D., Klimowicz J.A., Sterner R.W., Smutka T.M., Brown E.T., and Sherrell R.M. 2005. Bioavailable iron in oligotrophic Lake Superior assessed using biological reporters. J. Plankton Res. 27:1033-1044
21- Meikle A., Glover L.A., Killham K. and Prosser J.I. 1994. Potential luminescence as an indicator of activation of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* in liquid culture and in soil. Soil Biol. Biochem. 26: 747-755.
22- Olsen R. H., DeBusscher G., and McCombie W. R. 1982. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. J. Bacteriol. 150: 60–69.
23- Paton G. I., Rattary E.A.S. Campbell C. D., Cresser M. S., Glover L. A., Meeussen J.C.L., and Killham K. 1996. Use of genetically modified biosensors for soil ecotoxicity testing. In "Biological indicators of Soil Health" (C. F. Pankhurst, B. M. Double, and V. V. S. R. Gupta, Eds.), pp. 397-418.
24- Paton G.I., Reid B.J., and Semple K.T.2009. Application of a luminescence-based biosensor for assessing naphthalene biodegradation in soils from a manufactured gas plant. Environ. Pollut. 157:1643-1648.
25- Plangklang P. and Reungsang A. 2011. lux-Marking and application of carbofuran degrader *Burkholderia cepacia* PCL3. New Biotechnology *(in Press*) doi:10.1016/j.nbt.2011.04.00.
26- Porteous F., Killham K., and Meharg A. 2000. Use of *lux*-marked rhizobacterium as a biosensor to assess changes in rhizosphere C flow due to pollutant stress. Chemosphere 41: 1549-1554.
27- Solaiman D.K.Y. Ashby R.D., and Foglia T.A. 2001. Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:664–669.
28- Sticher P., Jaspers M.C. M., Stemmler K., Harms H., Zhender A. J. B., and van der Meer J. R. 1997. Development and characterisation of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4053-4060
29- Weitz, H. J., Ritchie J. M., Bailey D. A., Horsburgh A. M., Killham K., and Glover L. A. 2001. Construction of a modified mini-Tn5 luxCDABE transposon for the development of bacterial biosensors for ecotoxicity testing. FEMS Microbiol. Lett. 197:159-165.
30- Yao J. and Allen C. 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* Needs Aerotaxis for normal biofim formation and interactions with its tomato Host. J. Bacteriol. 189:6415-6424