

Isolating and Sequencing of Folic Acid Production Gene from Soil Bacillus and its Cloning in *Escherichia Coli*

Keyvan Hadjghanbari

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran, keyvanhajghnbari@yahoo.com

Nooshin Khandan dezfully*

Department of Microbiology, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, Iran, nooshinkhandan23@gmail.com

Kumarss Amini

Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Saveh, Iran, dr_kumarss_amini@yahoo.com

Abstract

Introduction: Folic acid or vitamin B9 is one of the most essential vitamins and plays a key role in the transport of carbon and many biochemical pathways and its deficiency can lead to neurological diseases, anemia, and developmental problems in children. The present study aimed to take a step towards producing this vitamin from native strains by isolating and sequencing the folic acid production gene from soil isolated bacillus and cloning it in *Escherichia coli*.

Materials and methods: In this study, 40 samples were collected from 10-15 cm depth from different areas around Sirjan city, Kerman province, Iran. Bacillus bacteria were isolated by molecular and biochemical methods. By the PCR method, bacteria with the FOLA gene were identified and the amplified gene was cloned into *E. coli* and sequenced. Gene expression was then evaluated by the Real-Time PCR method and its phylogenetic relationships were determined.

Results: As a result of screening 40 soil samples sent to the laboratory, a total of 12 suspected colonies were isolated from Gram-positive bacilli which were identified based on morphological, microscopic, and biochemical characteristics and all species were identified as having FOLA gene. FOLA cloning was performed successfully in one species and its gene expression was confirmed.

Discussion and conclusion: In the present study, the FOLA gene from *Bacillus Halotolerance* isolated from the soils of the surrounding areas of Sirjan was successfully cloned into the PTG19-T expression vector and its successful expression showed that it could be expanded by this method for industrial production of Folate.

Key words: Cloning, Bacillus, Folate

* Corresponding author

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال نهم، شماره ۳۳، بهار ۱۳۹۹، صفحه ۵۷-۶۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۶

doi: [10.22108/BJM.2020.120339.1247](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.120339.1247)

جداسازی گونه‌های باسیلوس دارای ژن تولید فولیک‌اسید از خاک و همسانه‌سازی آن در باکتری اشریشیا کلی

کیوان حاج قنبری: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران، keyvanhajghnbari@yahoo.com
نوشین خندان دزفولی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سیرجان، سیرجان، ایران، nooshinkhandan23@gmail.com
کیومرث امینی: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران، dr_kumarss_amini@yahoo.com

چکیده

مقدمه: فولیک‌اسید یا ویتامین B9 از مهم‌ترین ویتامین‌های ضروری بدن است که نقش اساسی در انتقال گروه‌های یک کربنه و بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی دارد و کمبود آن موجب بروز بیماری‌های عصبی، کم‌خونی و مشکلات رشد در کودکان می‌شود. هدف مطالعه حاضر، جداسازی ژن رمزکننده فولیک‌اسید از باسیل‌های خاک، توالی‌یابی آن و همسانه‌سازی این ژن در باکتری اشریشیا کلی بود تا بتوان گام مؤثری در راستای تولید صنعتی این ویتامین از سویه‌های بومی برداشت

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر، ۴۰ نمونه از عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری خاک مناطق مختلف اطراف شهر سیرجان نمونه‌برداری شدند. باکتری‌های باسیلوس با استفاده از محیط کشت Skim milk جداسازی و با روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. جدایه‌های دارای ژن *FOLA* به کمک روش مولکولی PCR مشخص شدند و ژن تکثیر شده در باکتری *E. coli* همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد؛ سپس بیان ژن به روش Real-time PCR بررسی و روابط فیلوژنتیکی آن مشخص شد.

نتایج: در نتیجه غربال‌گری نمونه‌های خاک ارسالی به آزمایشگاه، در مجموع ۱۲ کلنی مشکوک به باسیل‌های گرم مثبت جداسازی شدند که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند و مشخص شد همه گونه‌ها ژن *FOLA* را دارند. همسانه‌سازی *FOLA* در یکی از گونه‌ها به‌طور موفقیت‌آمیز انجام و بیان ژن آن با Real-time PCR تأیید شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در بررسی حاضر، ژن *FOLA* از باکتری باسیلوس هالتولرانس جداسازی شده از خاک‌های مناطق اطراف شهر سیرجان با موفقیت در وکتور بیانی PTG19-T همسانه‌سازی شد و بیان موفقیت‌آمیز ژن نشان داد می‌توان با گسترش این روش، گامی در راستای تولید صنعتی فولات برداشت.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، باسیلوس، فولات

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

باسیلوس‌ها، باکتری‌های گرم مثبت، هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و میله‌ای شکلند که در شرایط خاصی اسپور تولید می‌کنند. این موجودات معمولاً به شکل ساپروفیت در آب و خاک دیده می‌شوند و امروزه به علت داشتن توان تولید پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و آنزیم‌های مختلف اهمیت دارند؛ به طوری که ارزش تولید این محصولات به واسطه باکتری‌ها به میلیاردها دلار می‌رسد. باکتری‌های یادشده منبع تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، طعم‌دهنده‌ها (مانند نوکلئوزیدهای پورینی) و سورفکتانت‌ها نیز به شمار می‌آیند (۱-۳).

فولیک‌اسید که با عنوان ویتامین B9 شناخته می‌شود، از مهم‌ترین ویتامین‌های ضروری بدن است که نقشی اساسی در انتقال گروه‌های یک‌کربنه و بسیاری از مسیرهای بیوشیمیایی ایفا می‌کند. مطالعه‌های مختلف نقش فولات را در فرایند سوخت‌وساز، تولید نوکلئیک‌اسیدها، خون‌سازی و تکوین اعصاب محیطی اثبات کرده‌اند (۴-۶). کمبود فولات در کشورهای درحال توسعه و مناطق مشخصی از کشورهای توسعه‌یافته مسئله مهمی است که ممکن است پیامدهای درخور توجهی برای سلامتی به همراه داشته باشد. فولات در کارایی همانندسازی، ترمیم و متیلاسیون DNA مؤثر است و به همین علت، مقادیر بسیار کم فولات با افزایش خطر بروز حمله‌های قلبی و سکتته‌های مغزی پیوند خورده است و موجب اختلال رشد، کم‌خونی ماکروسیتیک، اسهال، نوروپاتی محیطی و نقص‌های لوله عصبی در جنین می‌شود (۷ و ۸)؛ همچنین ممکن است سبب ایجاد بسیاری از بیماری‌ها و اختلال‌ها از جمله نقص‌های لوله عصبی و کم‌خونی مگالوبلاستیک شود. در پژوهش‌های اخیر، ارتباط بین وضعیت فقر فولات و اختلال‌های پیش‌رونده

عصبی از جمله بیماری آلزایمر، سکتته مغزی و چندین نوع سرطان (سرطان خون، روده بزرگ، پستان، لوزالمعده، دهانه رحم و نایژه) و خطر زیاد ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی گزارش شده است؛ همچنین پژوهش‌های اپیدمیولوژیک اثبات کرده‌اند افزایش مصرف مکمل‌های حاوی فولات احتمال بروز سکتته قلبی، سرطان، کم‌خونی و آلزایمر را به طور درخور توجهی کاهش می‌دهد (۹ و ۱۰).

از آنجا که تنها گیاهان و ریزموجودات می‌توانند فولات تولید کنند، رژیم غذایی تنها منبع این ویتامین برای انسان است. سبزی‌های برگ‌سبز، میوه‌های خاص از جمله مرکبات و توت‌فرنگی، جگر، تخم‌مرغ، مخمر و همچنین آبجو، ماست و سایر فرآورده‌های تخمیری سرشار از فولات هستند؛ همچنین ریزموجودات اصلاح‌شده از نظر ژنتیکی می‌توانند برای زیست‌غنی‌سازی فرآورده‌های تخمیری استفاده شوند (۱۱).

در مطالعه‌های مختلف، ریزموجودات بسیاری از جمله *باسیلوس سوبتیلیس*^۱ (۱۲)، *لاکتوباسیل کازئی*^۲ (۱۳)، *دروزوفیلا ملانوگاستر*^۳ (۱۴)، *کلورلا ولگاریس*^۴ (۱۵)، *لاکتوکوکوس*^۵ (۱۶) و *لاکتوباسیلوس*^۶ (۱۷) معرفی شده‌اند که توانایی تولید فولیک‌اسید را دارند. در باسیلوس‌ها و در اوپرون اصلی فولیک، سه ژن *FOLK*، *FOLA* و *sul* به ترتیب آنزیم‌های پیروفسفوکیناز، دی‌هیدرونتوپترین آلدولاز و دی‌هیدروپتروئات سنتاز را کد می‌کنند که مهم‌ترین آنزیم‌ها در مسیر تولید پیش‌سازهای مسیر سنتز فولات هستند. در باسیلوس‌ها، ژن *FOLA* آنزیم ۲۱ آمینواسیدی دی‌هیدرونتوپترین آلدولاز را کد می‌کند و وجودداشتن آن در ژنوم باکتری موجب ناتوانی ریزموجود در تولید فولات می‌شود (۱۸).

مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از تمام رقت‌های تهیه‌شده برای هر نمونه خاک در سطح محیط تریپتیک‌سوی آگار ریخته شد و با پخش‌کننده شیشه‌ای به‌طور یکنواخت در تمام سطح محیط پخش شد؛ سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و درنهایت، از نظر رشد کردن یا رشد نکردن و کلنی‌های مشکوک به باسیلوس بررسی شدند.

از محتویات لوله‌ها به‌طور جداگانه در محیط کشت اختصاصی *skim milk* (Merck, Germany) حاوی ۵۰ گرم شیرخشک بدون چربی، ۵ گرم کازین، ۲/۵ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم گلوکز و ۱۲/۵ گرم آگار در هر لیتر کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد؛ سپس شناسایی دقیق‌تر باکتری‌های باسیلوس دارای فعالیت پروتولیتیک به روش‌های بیوشیمیایی از جمله آزمون‌های اوره، کاتالاز، حرکت، MR-VP و رنگ‌آمیزی گرم ادامه یافت و درنهایت پس از تأیید باکتری باسیلوس بر اساس ویژگی‌های ظاهری کلنی، ویژگی‌های میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی، شناسایی مولکولی بر اساس بررسی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توالی *16S rDNA* برای تأیید نهایی گونه باسیلوس انجام شد.

شناسایی مولکولی: روش‌های مولکولی برای تمایز باسیلوس‌های دارای ژن رمزکننده فولات (*FOLA*) استفاده شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت اختصاصی (Cinna Gen, Iran) و با توجه به دستورعمل سازنده انجام شد. پس از تأیید کیفیت به روش الکتروفورز و با دستگاه نانودراپ (Eppendorf, Germany)، آغازگرهای اختصاصی ژن *FOLA* با نرم‌افزار Gene runner طراحی و در سایت NCBI

امروزه، غنی‌سازی مواد غذایی از طریق افزودن مواد ریزمغذی مانند روی، ویتامین D، کلسیم و سایر ویتامین‌ها به غذاها و شیر از جمله روش‌های تأییدشده سازمان بهداشت جهانی برای جبران کمبود این مواد در افراد است (۱۹ و ۲۰). کشک یکی از فراورده‌های فرعی شیر است که به روش سنتی از جوشاندن، تغلیظ یا خشک کردن دوغی که پس از کره‌گیری باقی می‌ماند یا از ماست بدون چربی تهیه می‌شود و تمام خواص شیر کامل را دارد و حاوی کلسیم، چربی، پتاسیم، پروتئین و ویتامین نیاسین است. پیشگیری از بروز یا پیشرفت بیماری پوکی استخوان مهم‌ترین مصرف درمانی کشک است (۲۱-۲۳). از آنجاکه لبنیات و شیر منبع اصلی ویتامین‌های گروه B به شمار می‌آیند، مطالعه حاضر به جداسازی ژن تولید فولیک اسید از باسیل‌های خاک، توالی‌یابی آن و درنهایت، همسانه‌سازی این ژن در باکتری/شریشیا کلی^۷ می‌پردازد تا گامی برای افزودن سویه‌های بومی پروبیوتیک تولیدکننده فولات به این مواد غذایی بردارد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها: در پژوهش حاضر، تعداد ۴۰ نمونه از عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری خاک مناطق مختلف حاشیه شهر سیرجان (کرمان) و باغ‌های اطراف جمع‌آوری و در شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. به‌منظور جداسازی باکتری‌های دارای فعالیت پروتولیتیک، رقت سریالی 10^{-1} تا 10^{-6} از نمونه‌های خاک تهیه شد. در زمینه کشت نمونه‌های خاک، به‌منظور کاهش تعداد شکل‌های رویشی و با هدف جداسازی سویه‌های باسیلوس از خاک هواخشک استفاده شد.

بلاست شدند تا اختصاصیت آنها تأیید شود. جدول ۱، آغازگرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر را نشان می‌دهد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Cinna Gen, Iran)، ۱ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. مراحل دمایی واکنش PCR به شرح زیر انجام شد: ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و پس از ۳۵ چرخه، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. محصولات PCR در حضور شاهد مثبت و منفی در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اریتروزل به کمک دستگاه ژل‌داک، عکس‌برداری شدند.

همسانه‌سازی ژن فولات: روش TA Cloning، روش نسبتاً جدیدی است که بسیار ساده‌تر و مطمئن‌تر از روش‌های قدیمی همسانه‌سازی ژن در باکتری یا پلاسمید عمل می‌کند و نیازی به استفاده از آنزیم‌های محدوداثر وجود ندارد. در مطالعه حاضر، کیت PCR

برای همسانه‌سازی TA-Cloning (Cinna Gen, Iran) سریع‌تر و مؤثرتر محصول PCR استفاده شد. با توجه به دستورعمل کیت همسانه‌سازی، محصول PCR به دست آمده با ۱ میکرولیتر آنزیم T4 Ligase، ۱ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر وکتور خطی pTG19-T، ۱/۵ میکرولیتر محصول PCR و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شد و سپس به مدت یک ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا ژن هدف به وکتور متصل شود. در مرحله بعد، وکتور به میزبان *Escherichia coli* XL-1 blue (تهیه‌شده از دانشگاه تهران) منتقل و در محیط کشت LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. باکتری منتقل‌شده در پلیت حاوی LB آگار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر IPTG (Isopropylthio-β-D- galactoside) و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-a-D-galactoside) کشت و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. همسانه‌سازی ژنی با غربال‌گری کلنی‌های سفید (حاوی ژن نو ترکیب) و کلنی‌های آبی با لیگاسیون ناموفق و ژن غیرنو ترکیب تأیید و توالی‌یادشده برای توالی‌یابی به آزمایشگاه پاسارگاد فرستاده شد تا با ارسال به شرکت Bioneer کره جنوبی تعیین توالی شود.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده در مطالعه حاضر

آغازگر	توالی آغازگرها	اندازه باند (جفت باز)
<i>FOLA-F</i>	CTGGCTGGTGTGGTAGAACAG	۱۴۴
<i>FOLA-R</i>	AGGCCCGAGGACAAGTT	
<i>16s-F</i>	AGAGTTGATCCTGGCTCAG	۱۵۰۰
<i>16s-R</i>	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
F=forward primer, R=reverse primer		

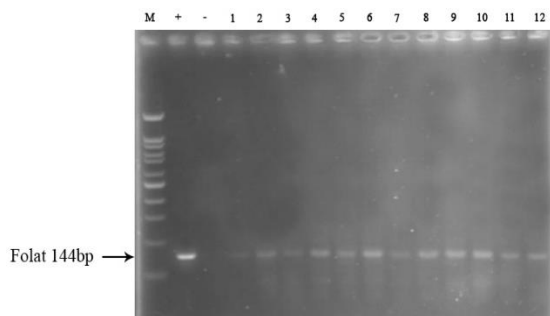
Blast n در بانک ژن جستجو شد و توالی‌های حاصل از Blast با نرم‌افزار Clustal W هم‌ردیف شدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با برنامه MEGA7 انجام شد.

نتایج

نتایج جداسازی باکتری: در نتیجه غربالگری ۴۰ نمونه خاک ارسال شده به آزمایشگاه، در مجموع تعداد ۱۲ کلنی مشکوک به باسیل‌های گرم مثبت جداسازی شد که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی با عنوان باسیلوس شناسایی شدند. در مطالعه حاضر بر اساس روش‌های تشخیصی عنوان شده در کتاب *Bergey*، باسیل‌های گرم مثبت که آزمون‌های MR-VP، سیمون‌سیترات، کاتالاز و TSI آنها مثبت و آزمون‌های احیای نیترات، ایندول، اوره‌آز و اکسیداز منفی آنها منفی بود، برای تمایز مولکولی انتخاب شدند.

نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی باکتری‌های

دارای ژن هدف: واکنش PCR برای ژن *FOLA* با آغازگرهای یادشده در جدول ۱ انجام شد و نتایج در شکل ۱ دیده می‌شوند. تمام ۱۲ سویه باسیلوس جداشده ژن *FOLA* را داشتند (شکل ۱). به منظور شناسایی مولکولی جنس باسیلوس حامل ژن *FOLA* از آغازگرهای عمومی *16S* استفاده شد (شکل ۲).



شکل ۱- نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی ژن فولات

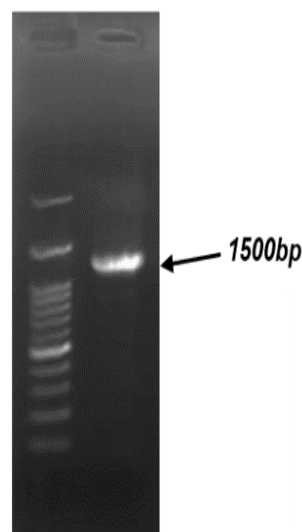
تعیین میزان بیان ژن *FOLA* در باکتری میزبان:

به منظور بررسی میزان بیان ژن *FOLA* به روش Real-time PCR، باکتری نوترکیب گرمخانه‌گذاری شد تا روند بیان ژن طی شود؛ پس از ۱۵ ساعت گرمخانه‌گذاری، استخراج RNA با استفاده از کیت اختصاصی (Cinna Gen, Iran) و با توجه به دستورعمل آن انجام شد و پس از تأیید کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ، سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV (غلظت 25 μ l/unit) و کیت اختصاصی آن (Roche, Germany) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت Genet bio CAT. NO: Q1469، کره جنوبی به شرح زیر انجام و ۱۰ میکرولیتر Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر Depc water، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۱ میکرولیتر Rox dye و ۲ میکرولیتر cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مدنظر در دستگاه Corbet (Corbet, Australia) با برنامه دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. ژن خانگی بتا/کتین برای شاهد درونی آزمون استفاده شد.

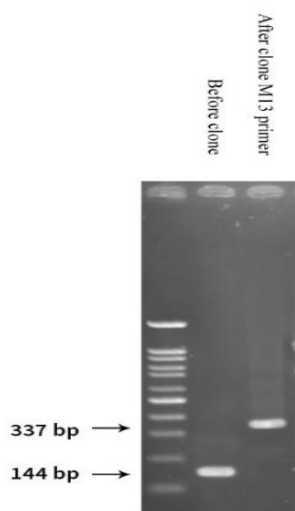
رسم درخت فیلوژنتیکی: نتایج توالی‌یابی توالی‌های

به دست آمده با نرم‌افزار Bio Edit بررسی شدند و پس از اطمینان از درستی توالی‌های به دست آمده، رشته واحدی (از ۵' به ۳') از دو رشته توالی‌یابی شده مستقیم و معکوس با نرم‌افزار DNA Baser مرتب شد. توالی‌های حاصل با جدایه‌های ثبت شده در NCBI مقایسه شدند، هر توالی به طور جداگانه با نرم‌افزار

به‌منظور تأیید نتایج همسانه‌سازی، DNA از کلنی‌های مشکوک استخراج و ورود ژن‌های فولات به باکتری *Escherichia coli* XL-1 blue با آزمون PCR و توالی‌یابی محصول PCR تأیید شد (شکل ۳) و درنهایت، محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال و BLAST شد (شکل ۴)؛ همچنین بیان ژن یادشده به‌طور موفقیت‌آمیز با Real-time PCR سنجش و مشخص شد فولات در باکتری میزبان بیان شده است (شکل ۵).



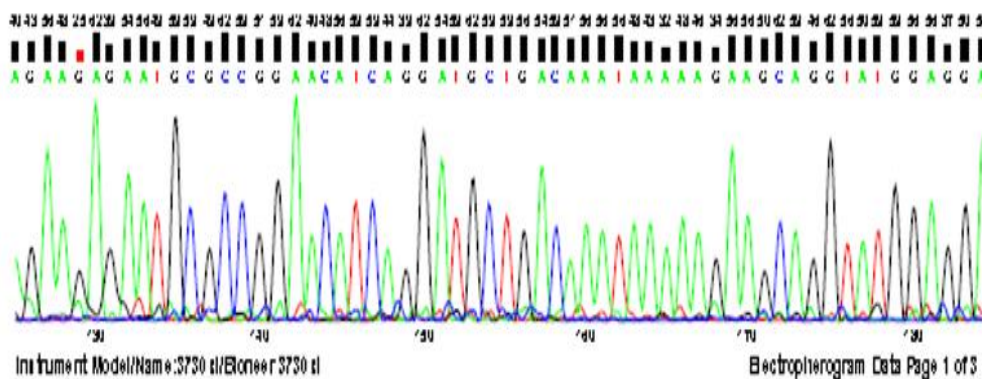
شکل ۲- نتیجه آزمون PCR با آغازگرهای عمومی *16S rDNA* به‌منظور تعیین هویت مولکولی جنس باسیلوس



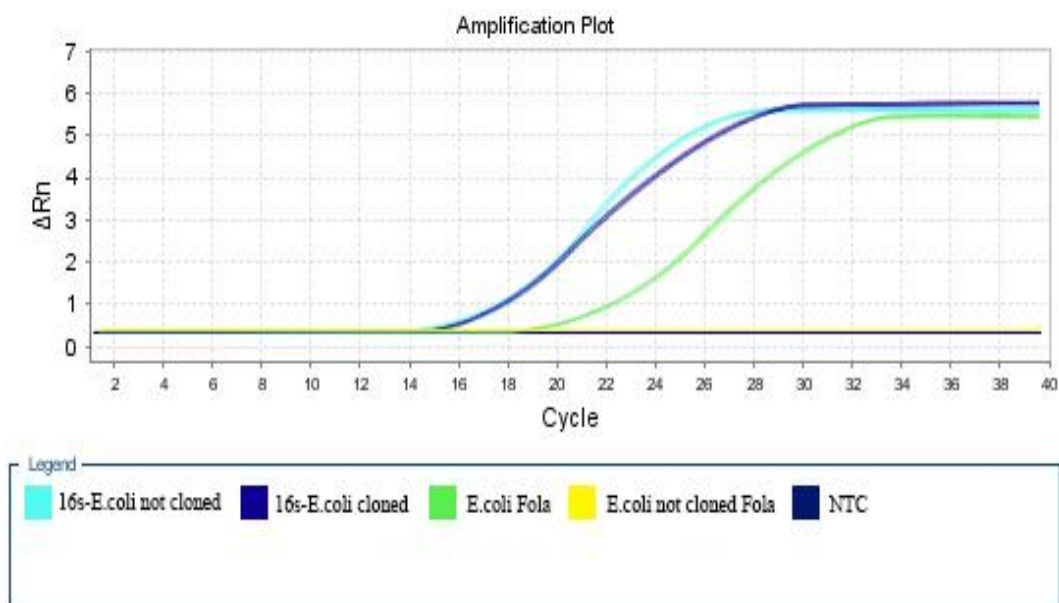
شکل ۳- تأیید همسانه‌سازی به کمک PCR با آغازگرهای M13 و کتور

نتایج همسانه‌سازی ژن فولات: پس از همسانه‌سازی

سویه حامل ژن فولات در فرایند انتخاب کلنی (آبی/سفید)، سویه‌های همسانه‌سازی شده جداسازی شدند. طبق اصول کیت، چنانچه ژن هدف وارد وکتور شده باشد، ژن *Lac z* تخریب می‌شود، باکتری نمی‌تواند از X-gal استفاده کند و کلنی‌های سفید در محیط کشت تشکیل می‌شوند؛ بنابراین کلنی‌های سفید، باکتری‌های با DNA نو ترکیب و کلنی‌های آبی، همسانه‌سازی ناموفق در نظر گرفته می‌شوند.



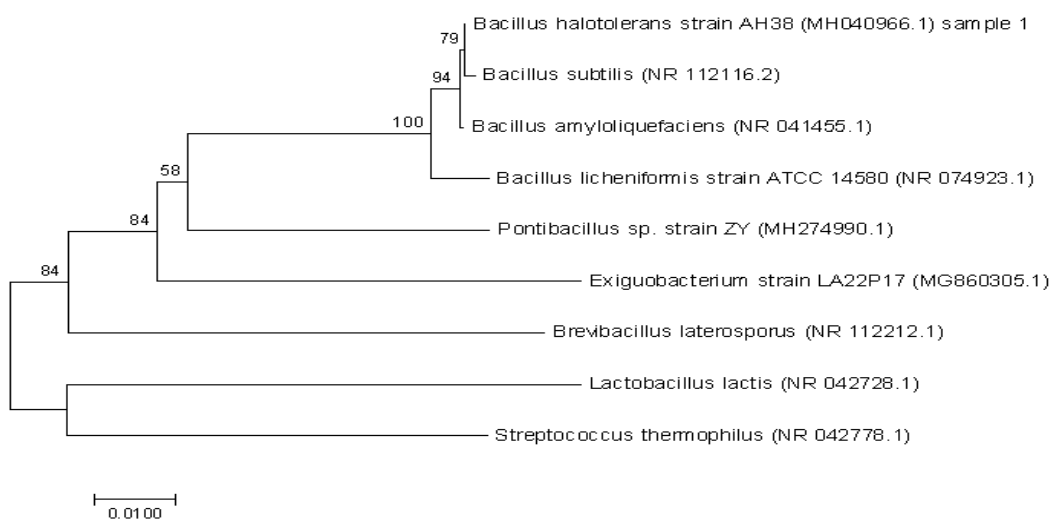
شکل ۴- نتایج توالی‌یابی ژن فولات



شکل ۵- نتایج بیان ژن فولات در باکتری هدف؛ بیان ژن *16S rDNA* شاهد در نظر گرفته شده است. رنگ‌های فیروزه‌ای و آبی نشان‌دهنده بیان ژن شاهد به ترتیب در باکتری‌های *E. Coli* همسانه‌سازی نشده و همسانه‌سازی شده‌اند، رنگ سبز نشان‌دهنده بیان ژن هدف همسانه‌سازی شده در *E. Coli* و رنگ زرد نشان‌دهنده بیان ژن هدف در *E. Coli* بدون همسانه‌سازی شدن است. NTC=no template control.

که بیان‌کننده رابطه خویشاوندی نزدیک آنها با یکدیگر است (شکل ۶). داده‌ها نشان دادند باکتری دارای ژن هدف در مطالعه حاضر، باسیلوس هالوتولرانس AH38 است.

نتایج درخت فیلوژنتیکی: پس از توالی‌یابی، بررسی ارتباط فیلوژنتیکی به روش پیوند هم‌جوار (NJ) انجام شد و نتایج آن نشان دادند گونه‌های باسیلوس ساتیلیس و باسیلوس هالوتولرانس^۸ در یک خوشه قرار می‌گیرند



شکل ۶- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن *16S rDNA*؛ علامت Sample1 در ابتدای درخت نشان‌دهنده نزدیکی باکتری جداسازی شده به باسیلوس هالوتولرانس است.

بحث و نتیجه‌گیری

فولات نوعی ویتامین ضروری برای بدن است که کمبود آن به بروز بیماری‌هایی نظیر کم‌خونی شدید، سرطان و آسیب‌های جبران‌ناپذیر عصبی منجر می‌شود. با توجه به مزیت‌های تولید پروتئین‌های ضروری از طریق عوامل باکتریایی، جداسازی آنزیم‌های راهبردی در صنایع دارویی و غذایی از مهم‌ترین زمینه‌های پژوهشی دانشمندان طی سال‌های اخیر بوده است (۲۴ و ۲۵). بررسی‌ها نشان می‌دهند تولید گسترده فولیک اسید به‌طور تجاری برای غنی‌سازی آن در مواد غذایی از جمله لبنیات مفید است (۲۶). این آنزیم را می‌توان از منابع محدودی از جمله باسیلوس‌ها استخراج کرد؛ بنابراین، نیاز به تکثیر ژن این ویتامین از منابع باکتریایی تولیدکننده آن اهمیت ویژه‌ای دارد. مطالعه حاضر بر آن بود تا با جداسازی ژن *FOLA* از باسیلوس‌های خاک و همسانه‌سازی آن در باکتری میزبان *اشریشیا کلی*، گامی در راستای صنعتی‌سازی این فرایند با مطالعه روی سویه‌های بومی ایران بردارد که به‌طور موفقیت‌آمیز انجام شد و نتایج بیان ژن هدف آن را تأیید کردند.

جستجوی شباهت توالی ژن *16S rDNA* سویه مدنظر در پایگاه داده‌ای اطلاعات (NCBI) نشان داد سویه جداسازی‌شده در مطالعه حاضر شباهت زیادی به گونه باسیلوس *هالوتولرانس* (با شماره دسترسی MH040966) دارد. بررسی ژنی نشان داد ژن *FOLA* در ۱۲ سویه باسیلوس جداشده وجود دارد.

Ahire و همکاران در مطالعه‌ای (۲۰۱۳) به بررسی تولید فولات در لاکتوباسیلوس *هلووتیکوس* پرداختند و در نتیجه، مشتق ۵ متیل تتراهیدروفولات تولید شد؛ همچنین مشخص شد فولات تولیدی دارای آثار آنتی‌بیوتیکی روی باکتری‌های *استرپتوکوکوس پیوژنز*،

استافیلوکوکوس اورئوس^{۱۰} و *سالمونلا*^{۱۱} است (۲۷). Gangadharan و همکاران در مطالعه مشابهی به بررسی امکان تولید فولات در لاکتوکوکوس لاکتیس^{۱۲} سویه کرموریس^{۱۳} پرداختند و مطالعه آنها در راستای هدف پژوهش حاضر و به‌منظور تولید فولات برای غنی‌سازی شیر خوراکی بود؛ در این مطالعه، مقادیر ۱۸۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر فولات دکونژوگه از ۵ لیتر بیوراکتور جداسازی شد که عدد درخور توجهی نیست (۱۷). در مطالعه‌ای که Taghiabadi و همکاران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، تولید گلوتامیک اسید و فولیک اسید در پروبیوتیک‌های هوازی و بی‌هوازی بررسی شد؛ در این مطالعه، گلوتامیک اسید موجود در ریزموجودات با کروماتوگرافی لایه نازک بررسی و میزان فولیک اسید با کیت فولات اندازه‌گیری شد. هر کدام از باکتری‌ها نیز از نظر کمی و کیفی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار زیاد اندازه‌گیری شدند و میزان فولات در باکتری *بیفیدوباکتریوم*^{۱۴}، ۳۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (۱۸) که عدد مناسبی در محیط آزمایشگاهی نسبت به سایر مطالعه‌ها به شمار می‌آید. در مقایسه با سویه‌های سایر مناطق جهان می‌توان به مطالعه Leblanc و همکارانش (۲۸) اشاره کرد که در آن، تولید فولات از باکتری‌های لاکتوباسیلوس *پلانتاروم*^{۱۵} و لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*^{۱۶} به ترتیب برابر با ۴۵ و ۱ میکروگرم بر لیتر گزارش شده است؛ این مقایسه نشان می‌دهد سویه‌های بومی ایران ظرفیت زیادی برای تولید فولیک اسید دارند.

نقش ژن *FOLA* در روند بیوسنتز THF-polyglutamate اثبات شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه همسانه‌سازی سایر ژن‌های دخیل در روند تولید فولات به روش TA-cloning انجام نشده است؛ این نکته می‌تواند نوآوری دیگر پژوهش حاضر در کنار استفاده از

deficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2019; 110(3): 554-561.

- (3) Ferrer-Polonio E., Fernández-Navarro J., Alonso-Molina JL., Mendoza-Roca JA., Bes-Piá A., Amorós I. Towards a cleaner wastewater treatment: Influence of folic acid addition on sludge reduction and biomass characteristics. *Journal of Cleaner Production* 2019; 232: 858-866.
- (4) Ismail WRW., Rahman RA., Rahman NAA., Atil A., Nawi AM. The protective effect of maternal folic acid supplementation on childhood cancer: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Journal of Preventive Medicine and Public Health* 2019; 52(4): 205.
- (5) Iglesias Vázquez L., Canals J., Arijia V. Review and meta analysis found that prenatal folic acid was associated with a 58% reduction in autism but had no effect on mental and motor development. *Acta Paediatrica* 2019; 108(4): 600-610.
- (6) Wang Y., Jin Y., Wang Y., Li L., Liao Y., Zhang Y., et al. The effect of folic acid in patients with cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. *Medicine* 2019; 98(37)
- (7) Ly L., Chan D., Aarabi M., Landry M., Behan NA., MacFarlane AJ., et al. Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 2017; 23(7): 461-477.
- (8) Sun A., Chen HM., Cheng SJ., Wang YP., Chang JYF., Wu YC., et al. Significant association of deficiencies of hemoglobin, iron, vitamin B12, and folic acid and high homocysteine level with recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2015; 44(4): 300-305.
- (9) Chang JY-F., Wang Y-P., Wu Y-C., Cheng S-J., Chen H-M., Sun A. Hematinic deficiencies and anemia statuses in oral mucosal disease patients with folic acid deficiency. *Journal of the Formosan Medical Association* 2015; 114(9): 806-812.

سویه‌های بومی در نظر گرفته شود. یافته‌ها نشان می‌دهند اغلب تولیدکنندگان فولات در سایر مناطق جهان از بین سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده‌اند (۲۹)؛ درحالی‌که مطالعه حاضر، خاصیت بیان ژن فولات را در باکتری‌های باسیلوس هالتوتولرانس کشف کرد (۲۹). در مطالعه‌های متعددی گزارش شده است اشریشیا کلی به‌شکل میزبان و به‌طور گسترده برای بیان پروتئین‌های نو ترکیب در پژوهش‌ها و صنعت به کار می‌رود (۳۰) و (۳۱)، اما روش‌های همسانه‌سازی به‌کاررفته در آنها سنتی است. مطالعه حاضر در تأیید امکان بیان ژن FOLA در اشریشیا کلی نشان داد روش TA همسانه‌سازی، روش مناسبی برای همسانه‌سازی این ژن است.

نتیجه‌گیری

همسانه‌سازی ژن فولات و بیان آن در مطالعه حاضر به‌طور موفقیت‌آمیز انجام شد. داده‌های مطالعه حاضر نشان دادند باوجود محدودیت‌ها، استفاده از گونه‌های تولیدکننده فولات با تمرکز بیشتر روی سویه‌های بومی می‌تواند بستر جدیدی را برای صنعتی‌سازی تولید این ماده در ایران و کاهش واردات آن به‌طور پیش‌ساز داروها در نظر گرفته شود.

References

- (1) Li W., Jiang M., Zhao S., Liu H., Zhang X., Wilson J., et al. Folic acid inhibits amyloid β -peptide production through modulating DNA methyltransferase activity in N2a-APP cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(10): 25002-25013.
- (2) Berry RJ. Lack of historical evidence to support folic acid exacerbation of the neuropathy caused by vitamin B12

- (10) Moll R., Davis B. Iron, vitamin B12 and folate. *Medicine* 2017; 45(4): 198-203.
- (11) Christensen KE., Mikael LG., Leung K-Y., Lévesque N., Deng L., Wu Q., et al. High folic acid consumption leads to pseudo-MTHFR deficiency, altered lipid metabolism, and liver injury in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2015; 101(3): 646-658.
- (12) Sauer U., Cameron DC., Bailey JE. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides, riboflavin, and folic acid. *Biotechnology and Bioengineering* 1998; 59(2): 227-238.
- (13) Bond TJ. Production of folinic acid from folic acid by *Lactobacillus casei*. *Science (Washington)* 1953; 117:563-564.
- (14) Blatch S., Meyer KW., Harrison JF. Effects of dietary folic acid level and symbiotic folate production on fitness and development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Fly* 2010; 4(4): 312-319.
- (15) Pratt R., Johnson E. Production of thiamine, riboflavin, folic acid, and biotin by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1965; 54(6):871-874.
- (16) Ahire JJ., Patil KP., Chaudhari BL., Chincholkar SB. A potential probiotic culture ST2 produces siderophore 2, 3-dihydroxybenzoylserine under intestinal conditions. *Food Chemistry* 2011; 127(2): 387-393.
- (17) Gangadharan D., Nampoothiri KM. Folate production using *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* with implications for fortification of skim milk and fruit juices. *LWT-Food Science and Technology* 2011; 44(9): 1859-1864.
- (18) Taghiabadi Z., Dehkordi MK., Emtiaz G. Glutamic acid and folic acid production in aerobic and anaerobic probiotics. *Biological Journal of Microorganism* 2018; 7(25): 127-136.
- (19) Joseph DB., Chandrashekar AS., Chu LF., Thomson JA., Vezina CM. A folic acid enriched diet attenuates prostate involution in response to androgen deprivation. *The Prostate* 2019; 79(2): 183-194.
- (20) Kancherla V., Averbach H., Oakley Jr GP. Nation wide failure of voluntary folic acid fortification of corn masa flour and tortillas with folic acid. *Birth Defects Research* 2019; 111(11): 672-675.
- (21) Pérez-Esteve É, Ruiz-Rico M, Fuentes A, Marcos MD, Sancenón F, Martínez-Mañez R, et al. Enrichment of stirred yogurts with folic acid encapsulated in pH-responsive mesoporous silica particles: Bioaccessibility modulation and physico-chemical characterization. *LWT-Food Science and Technology* 2016; 72: 351-360.
- (22) Altic L., McNulty H., Hoey L., McAnena L., Pentieva K. Validation of folate-enriched eggs as a functional food for improving folate intake in consumers. *nutrients* 2016; 8(12): 777.
- (23) Moreno J., Espinoza C., Simpson R., Petzold G., Nuñez H., Gianelli M. Application of ohmic heating/vacuum impregnation treatments and air drying to develop an apple snack enriched in folic acid. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2016; 33: 381-386.
- (24) Keil KP., Abler LL., Altmann HM., Wang Z., Wang P., Ricke WA., et al. Impact of a folic acid-enriched diet on urinary tract function in mice treated with testosterone and estradiol. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2015; 308(12): 1431-1443.
- (25) van Gool JD., Hirche H., Lax H., De Schaepdrijver L. Folic acid and primary prevention of neural tube defects: A review. *Reproductive Toxicology* 2018; 40: 73-84.
- (26) Grosse SD., Berry RJ., Tilford JM., Kucik JE., Waitzman NJ. Retrospective assessment of cost savings from prevention: folic acid fortification and spina bifida in the US. *American Journal of Preventive Medicine* 2016; 50(5): S74-S80.

- (27) LeBlanc JG., de Giori GS و Smid EJ., Hugenholtz J., Sesma F. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms In: Méndez-Vilas. editor. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2007: 329-339
- (28) Rossi M, Amaretti A, Raimondi S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients*. 2011 Jan;3(1):118-34
- (29) Jahandar M., Nassiri M., Aslaminejad A., Tahmoorespour M., Haghparast A. Cloning of InvG gene from Salmonella Enterica in the Expression Vector pET32a and Evaluation of its Expression in hosts BL21-DE3. *Journal of Agricultural Biotechnology* 2015; 14(3): 75-87.
- (30) Yuan Y., Nymoer DA., Dong HP., Bjørang O., Shih I-M., Low PS, et al. Expression of the folate receptor genes FOLR1 and FOLR3 differentiates ovarian carcinoma from breast carcinoma and malignant mesothelioma in serous effusions. *Human Pathology* 2009; 40(10): 1453-1460.

-
- 1- *Bacillus subtilis*
 - 2- *Lactobacillus casei*
 - 3- *Drosophila melanogaster*
 - 4- *Chlorella vulgaris*
 - 5- *Lactococcus*
 - 6- *Lactobacillus*
 - 7- *Escherichia coli*
 - 8- *Bacillus halotolerans*
 - 9- *Streptococcus pyogenes*
 - 10- *Staphylococcus aureus*
 - 11- *Salmonella*
 - 12- *Lactococcus lactis*
 - 13- *cremoris*
 - 14- *Bifidobacterium*
 - 15- *Lactobacillus plantarum*
 - 16- *Lactobacillus acidophilus*