

جداسازی، همسانسازی و بررسی ویژگی‌های ژن انتقال‌دهنده هگزوز ۷ (HXT7) از مخمر ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی

سولماز عزیزی (M.Sc)، علیرضا تارینژاد* (Ph.D)

دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

چکیده

سابقه و هدف: مخمر ساکارومایسس سرویزیه از جمله مهم‌ترین میکروارگانیسم‌ها برای تولید اتانول است و از طریق تخمیر الکلی باعث تولید اتانول می‌شود. این به دلیل کارایی بالای این موجود در جذب و تخمیر قندهای هگزوز می‌باشد. مخمر ساکارومایسس سرویزیه دارای ۲۰ ژن کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده هگزوز می‌باشد که شامل HXT1-HXT17، GAL2، SNF3 و RGT2 است. از میان این خانواده ژنی، هفت ژن HXT1-HXT7 نقش مهمی در فرآیند تولید الکل دارند. محققین ثابت کردند که با افزایش میزان بیان این ژن‌ها سرعت تخمیر الکلی افزایش و در نتیجه آن میزان تولید اتانول افزایش می‌یابد هدف این مطالعه شناسایی و جداسازی ژن HXT7 از ژنوم مخمر ساکارومایسس سرویزیه از طریق PCR و همسانسازی آن در وکتور دارای پرموتور بیانی مناسب به منظور پایه‌ای برای طراحی پلاسمید بیانی و نهایتاً مخمر نوترکیب بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق جداسازی ژن HXT7 با پرایمرهای اختصاصی ژن از طریق PCR صورت گرفت و با انجام لیگاسیون قطعه‌ی تکثیر یافته به پلاسمید pGEM-T کلون شد و به باکتری E. coli ترانسفرم گردید و در نهایت برای تایید نهایی قطعات کلون شده در پلاسمیدهای نوترکیب به توالی‌یابی فرستاده شدند.

یافته‌ها: توالی نوکلئوتیدی چارچوب بازخوانی این ژن به طول ۱۷۱۳ bp بوده و یک پروتئین با ۵۷۰ اسید آمینه را رمز می‌کند. وزن مولکولی تخمین زده شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده این پروتئین به ترتیب ۶۲/۷۲۵ کیلودالتون و ۷/۸۹ است.

نتیجه‌گیری: توالی پروتئینی به دست آمده شباهت زیادی با Hxt7p سویه‌های دیگر ساکارومایسس سرویزیه موجود در NCBI دارد و بالاترین درصد تشابه را با Hxt7p ساکارومایسس سرویزیه سویه S288C ثبت شده در NCBI با کد دسترسی NP010629.3 دارد.

واژه‌های کلیدی: همسانسازی، ساکارومایسس سرویزیه، ژن HXT7، پلاسمید نوترکیب

مقدمه

با توجه به محدودیت سوخت‌های فسیلی و به علت مصرف روزافزون آن‌ها، تولید سوخت‌های زیستی اهمیت ویژه‌ای یافته است. اولین تکنولوژی تولید سوخت‌های زیستی در مقیاس صنعتی، مربوط به تولید بیواتانول بوده است. روش

متداول تولید بیواتانول استفاده از روش‌های تخمیری است که با استفاده از سوبستراهای قندی انجام می‌گیرد [۱، ۲]. امروزه از روش‌های مختلف مولکولی نظیر تکنیک کلونینگ در ایجاد استرین‌های ساکارومایسس سرویزیه جهت بهبود راندمان تولید الکلی طی فرآیند تخمیر الکلی استفاده می‌شود [۳، ۴].

به پروموتور ژن‌های HXT متصل و از رونویسی این ژن‌ها به‌وسیله یک‌سری پروتئین دیگر از جمله Cyc8, Tup1, Mth1 و Std1 جلوگیری می‌کند [۱۰]. زمانی که گلوکز در محیط وجود دارد به سنسورهای Snf3 و Rgt2 متصل و منجر به فسفوریلاسیون Mth1 و Std1 می‌شود. سپس Mth1 و Std1 در کمپلکس (SCFGr1-tubiquitin-Ligase) یوبی‌کویتینینه شده و در نهایت در ۲۶ S پروتئوزوم تخریب و تجزیه می‌شوند. از طرفی pKA باعث فسفوریلاسیون Rgt1 شده و در نتیجه آن Rgt1 فسفریله شده از پروموتور ژن‌ها جدا و رونویسی ژن‌های HXT صورت می‌گیرد [۱۱].

هدف این تحقیق کلون ژن HXT7 با توالی صحیح در داخل وکتور pGEM-T و بررسی آن از نظر ترادف ژنی و آمینواسیدی می‌باشد هم‌چنین ویژگی‌های فیزیوشیمیایی توالی پروتئینی به‌دست آمده با استفاده از بررسی‌های اختصاصی موجود در پایگاه Swiss-Prot پیش‌بینی شده و بررسی‌های فیلوژنتیکی با سایر ژن‌های این خانواده صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت مخمر ساکارومیسس سرویزیه. سویه‌ی مخمر ساکارومیسس سرویزیه سویه‌ی ایرانی بوده که در نانواپی و شیرینی‌پزی استفاده می‌شود و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیده است. پس از کشت مخمر در محیط اختصاصی YPD حاوی ۱۰ gr دکستروز، ۲۰ gr پیتون، ۱۰ gr عصاره‌ی مخمر و ۱۵ gr آگار و رشد کلونی‌ها، تک کلونی‌ها به محیط کشت مایع YPD جهت استخراج DNA منتقل و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ °C قرار داده و از آن جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد.

جداسازی DNA. سوسپانسیون حاصل از کشت مخمرها در محیط کشت مایع YPD ابتدا توسط سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰rpm رسوب داده شد و بر روی رسوب حاصله بافر Harju که حاوی ۲-Triton X-۱۰۰٪، ۱٪ SDS، mM EDTA، ۱۰۰ mM Tris-Hcl، (pH=۰/۸)، ۱۰۰ mM NACL

اکثر مخمرها قندهای شش کربنه گلوکز، فروکتوز و مانوز را برای تخمیر ترجیح می‌دهند که با افزایش غلظت این قندها و سرعت گلیکولیک میزان تولید الکل نیز افزایش می‌یابد. ورود گلوکز به سلول‌های مخمر از طریق انتشار تسهیل شده و از طریق یکسری از پروتئین‌های غشایی که HXT نامیده می‌شود انجام می‌شود. بر طبق اطلاعات موجود خانواده‌ی انتقال‌دهنده‌ی هگزوزها در ساکارومیسس سرویزیه شامل پروتئین‌های Rgt2p, Snf3p, Gal2p, Hxt1p-Hxt17p می‌باشد. با افزایش فعالیت این انتقال‌دهنده‌ها، تجمع اتانول یا اسید لاکتیک در سلول‌ها بیش‌تر می‌شود. HXT1-HXT7 جزء مهم‌ترین ناقلین هستند و از نظر متابولیسمی به هم شباهت دارند و با هم در ارتباط هستند. GAL2 برای انتقال گالاکتوز، SNF3 و RGT2 به عنوان سنسور گلوکز عمل می‌کنند. این خانواده‌ی ژنی الگوی بیان متفاوتی داشته و تنظیم آن‌ها به شدت تحت ویژگی کینتیک انتقال‌دهنده‌ها می‌باشد و گلوکز اولین فاکتور کنترل‌کننده‌ی بیان این ژن‌ها می‌باشد [۵،۶].

Hxt6p و Hxt7p یک جفت انتقال‌دهنده‌ی هگزوز هستند. شباهت این دو پروتئین به هم خیلی زیاد است و هر دوی آن‌ها شامل ۵۷۰ اسیدآمینو هستند این دو ژن پشت سر هم روی بازوی راست کروموزوم IV پایین دست HXT3 قرار دارند. شباهت بین این دو ژن ۹۶bp قبل از کدون آغاز شروع می‌شود و حضور این ژن‌ها بدین صورت در اکثر استرین‌های آزمایشگاهی گزارش شده است. Hxt7p بیش‌ترین میل ترکیبی را با گلوکز نسبت به سایر ژن‌های این خانواده دارد و میزان خیلی کم گلوکز را (۱ تا ۲ میکرومولار) قادر به جذب است [۷،۸] و میزان بیان آن در شرایط یکسان نسبت به سایر ژن‌های این خانواده بیش‌تر است. این ژن در منابع کربنی غیر تخمیری از جمله گلیسرول و اتانول و هم‌چنین مالتوز و گالاکتوز به میزان زیاد بیان می‌شود [۹].

سیگنالینگ گلوکز به‌وسیله‌ی سنسورهای Snf3 و Rgt2 انجام می‌شود که در این مسیر یک سرکوب‌کننده رونویسی به نام Rgt1 نقش مهمی دارد. در غیاب گلوکز Rgt1

برشی (MCS) است و ژن انتخابگر آن برای گزینش *E. coli* ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد هم چنین یک مکان ژنی دارای کاست ژنی حاوی β -گلوکونیداز تحت پروموتورهای SP6 و T7 در طرفین سایت برشی اختصاصی (MCS) جهت گزینش به روش Blue-White وجود دارد. پس از انجام لیگاسیون و ایجاد پلاسمید نو ترکیب، ترانسفورماسیون به وسیله شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد Top ۱۰ انجام شد. در مرحله بعد باکتری ها روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، IPTG و X-GAL کشت داده شدند، و پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای 37°C ، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی های نو ترکیب انتخاب و مورد بررسی دقیق تر قرار گرفتند. در نهایت استخراج پلاسمیدهای نو ترکیب انجام گرفته و کلونی های نو ترکیب با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه ها برای توالی یابی با دو پرایمر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره ی جنوبی ارسال گردید.

بررسی توالی. ویژگی های فیزیکی و شیمیایی پروتئین به دست آمده با استفاده از برنامه های ProtParam و ProtScale تعیین گردید.

جدول ۱. میزان یکسانی و شباهت توالی اسید آمینه ای Hxt7p با سایر توالی های اسید آمینه ای سویه های دیگر مخمر ساکارومیسس سروزیه مورد استفاده در تهیه

همردیف سازی مقایسه ای و ساخت درخت فیلوژنتیکی

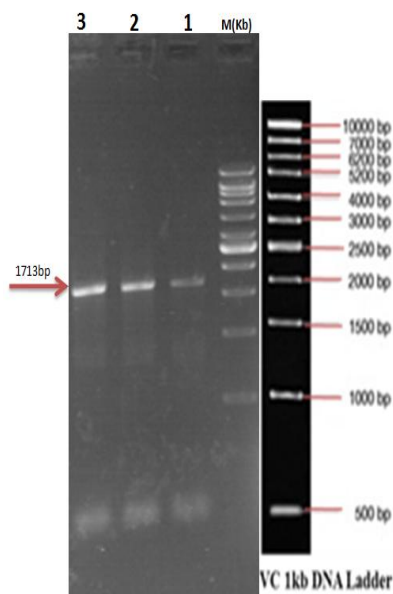
شماره دستیابی	نام اختصاصی ژن	نام سویه	درصد تشابه	درصد یکسانی
NP 010629.3	Hxt7p	S. c S288c	۹۹	۱۰۰
NP 010630.1	Hxt6p	S. c S288c	۹۹	۱۰۰
CAY78842.1	Hxt7p	S. c EC1118	۹۹	۱۰۰
EHN07909.1	Hxt7p	S. c x S kudriavzevii VIN7	۹۹	۱۰۰
EDN60673.1	Hxt7p	S. c YJM789	۹۶	۹۹
EGA76253.1	Hxt7p	S. c Vin 13	۹۹	۸۷
EGA75554.1	Hxt7p	S. c AWR1796	۹۶	۸۸
NP 011960.2	Hxt4p	S. c S288c	۱۰۰	۸۳
NP 013182.1	Gal2p	S. c S288c	۹۹	۷۳
NP 010632.1	Hxt3p	S. c S288c	۹۸	۷۶
NP 012316.1	Hxt9p	S. c S288c	۹۸	۷۱
NP 014486.1	Hxt11p	S. c S288c	۹۸	۷۱
EHN02199.1	Hxt8p	S. c x S kudriavzevii VIN7	۹۸	۶۸

است اضافه شد [۱۲]، تیوب ها در اتانول مطلق سرد به مدت ۲ دقیقه و سپس در دمای 95°C یک دقیقه قرار گرفتند، این مرحله تکرار و ورتکس انجام شد در ادامه با افزودن کلروفورم، ورتکس و سانتریفیوژ، فاز بالایی به تیوب جدید منتقل شده و بر روی آن اتانول مطلق اضافه شد و در دمای 20°C قرار داده شد، در نهایت DNA مخمر با استفاده از روش های رسوب و خالص سازی اسید نوکلئیک خالص شده و در 50°C -۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید.

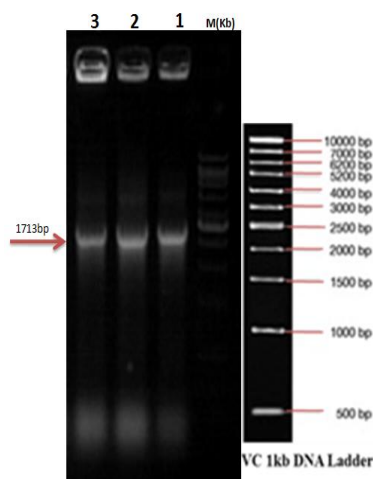
طراحی آغازگر و انجام PCR. ابتدا آغازگرهای مناسب به منظور جداسازی ژن HXT7 با توالی زیر طراحی گردید.
 primerF: 5' -ATGTCACAAGACGCTGCTAT-3'
 primerR: 5' -TTATTTGGTGCTGAACATTC-3'
 برنامه ی انجام PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه در 94°C و انجام ۳۵ سیکل متوالی (94°C به مدت یک دقیقه، 48°C به مدت ۵۰ ثانیه، 72°C به مدت ۸۰ ثانیه) انجام شد.

همساز سازی در وکتور pGEM-T. بعد از تکثیر ژن توسط PCR و خالص سازی آن، عمل لیگاسیون بین ژن و پلاسمید pGEM-T صورت گرفت. پلاسمید pGEM-T شامل پروموتورهای T7 و SP6 پلیمرز در طرفین ناحیه ی سایت

حاصل از کلون کردن DNA ژن HXT7 در پلاسمید pGEM-T. پروموتورهای T7 و SP6 امکان مشخص کردن توالی نوکلئوتیدی قطعه‌ی الحاقی را فراهم می‌کنند.



شکل ۱. تصویر الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HXT7 روی DNA ساکارومیسیس سرویزیه. ۱، ۲ و ۳ سه تکرار مستقل هستند، M(Kb) مارکر



شکل ۲. تصویر الکتروفورز محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HXT7 روی کلونی pGEM-T+HXT7. ۱، ۲ و ۳ سه تکرار مستقل هستند، M(Kb) مارکر

نتایج توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 برای ژن HXT7 بر روی وکتور pGEM-T نمایانگر این بود که موقعیت قرارگیری آن روی سایت برشی اختصاصی (MCS) وکتور در

توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از سویه‌های دیگر ساکارومایسیس سرویزیه که بیش‌ترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف Hxt7p و انواع ژن‌هایی انتقال‌دهنده هگزوز با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 انجام شد. توالی‌های پروتئینی از سویه‌های دیگر ساکارومایسیس سرویزیه که برای تهیه هم‌ردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند به همراه شماره دست‌یابی در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

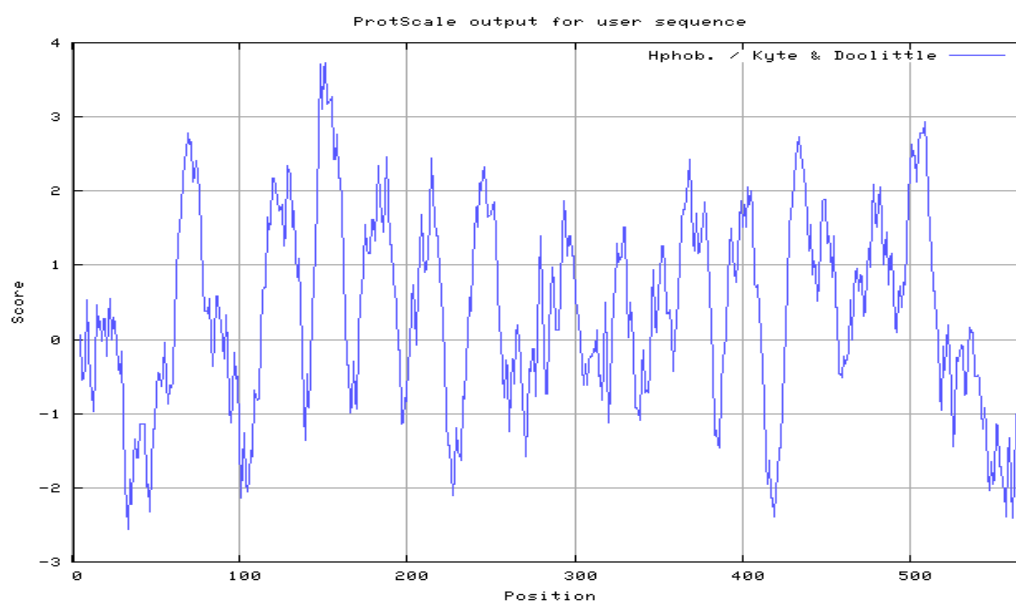
نتایج

پس از استخراج DNA ژنومی مخمر، PCR به منظور تکثیر ژن HXT7 با استفاده از آغازگرهای طراحی شده اجرا گردید. محصول PCR یک باند ۱۷۱۳ جفت بازی روی ژل آگارز نشان داد، که مطابقت با ژن HXT7 موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره دست‌یابی NP010629.3 داشت (شکل ۱). پس از خالص‌سازی، محصول PCR در وکتور pGEM-T کلون گردید. برای تایید قطعه‌ی کلون شده، PCR روی کلونی‌های سفید (شکل ۲) و پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های ترانسفورم شده انجام شد (شکل ۳). نتایج نشان داد که ژن HXT7 به طور صحیح در پلاسمید pGEM-T کلون شده است. نمونه‌های کلون شده بعد از الکتروفورز و اطمینان از تشکیل باند مورد نظر برای تعیین توالی با دو پرایمر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال گردید.

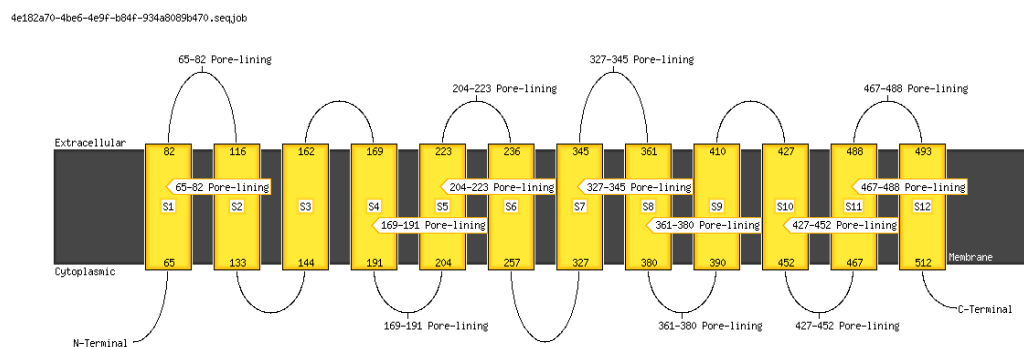
شکل ۳. تصویر الکتروفورز محصول واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن HXT7 روی پلاسمید pGEM-T+HXT7. ۱، ۲ و ۳ سه تکرار مستقل هستند، M (Kb) مارکر شکل ۴. تصویر شماتیک پلاسمید نوترکیب

نزدیکی را با ژن‌های HXT7 و HXT6 دارد و کم‌ترین تشابه را با سنسورهای گلوکز یعنی SNF3 و RGT2 دارد (شکل ۱۰). هم‌چنین نتایج pBLAST در سطح پروتئینی نشان داد پروتئین مورد بررسی با Hxt4p, Hxt3p, Hxt9p, Hxt11p و Hxt8p به ترتیب شباهت ۱۰۰٪ (یکسانی ۸۳٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۷۶٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۷۱٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۷۱٪)، ۹۸٪ (یکسانی ۶۸٪) دارد (جدول ۱).

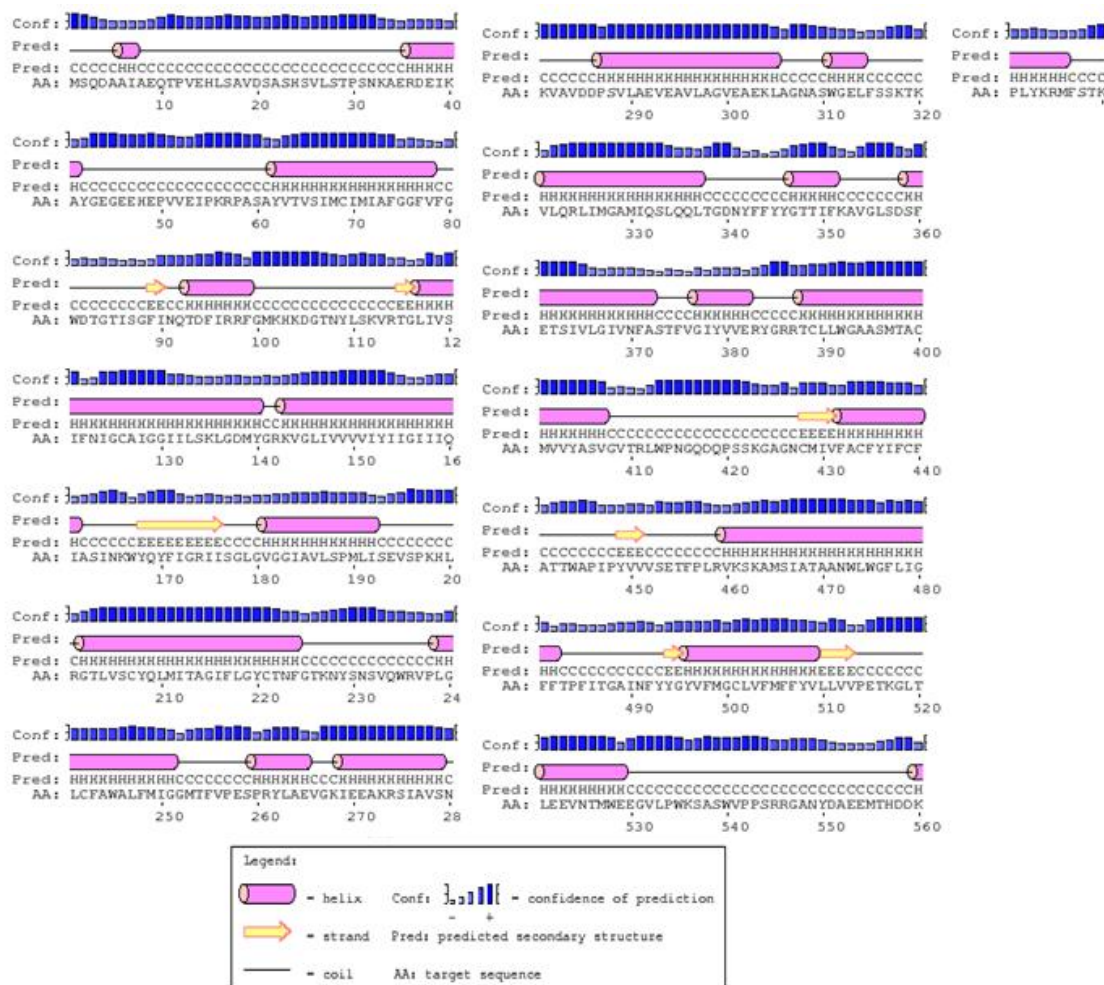
ساکارومیسیس سرویزیه دارد و بیش‌ترین تشابه و نزدیکی را با پروتئین‌های Hxt7p و Hxt6p از سویه S288c دارد (شکل ۹). هم‌چنین به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی آنالیز کلاستر توالی نوکلئوتیدی ژن HXT7 مخمر ساکارومیسیس سرویزیه سویه ایرانی با سایر ژن‌های خانواده‌ی انتقال‌دهنده‌های هگزوز انجام شد. بر این اساس مشخص شد ژن HXT7 سویه ایرانی بیش‌ترین شباهت و



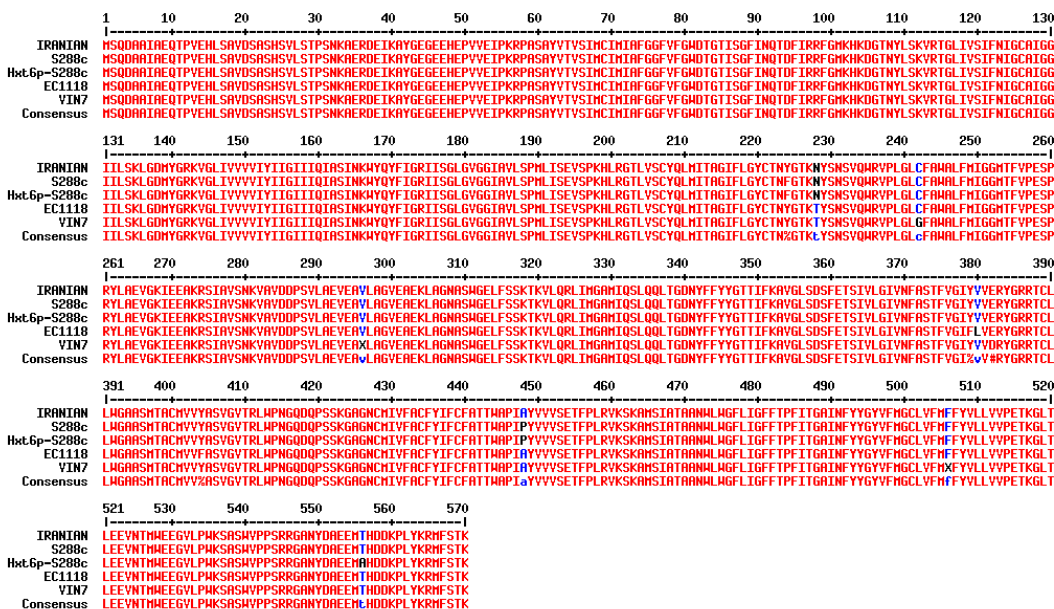
شکل ۵. بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین Hxt7p



شکل ۶. توپولوژی دو بعدی از سنسور گلوکز Hxt7p دومین‌های انتقال دهنده از ۱ تا ۱۲ شماره گذاری شده‌اند. بررسی ساختار دوم پروتئین Hxt7p با استفاده از PSIPred نشان داد که این پروتئین حاوی ۷ رشته β و ۲۳ مارپیچ α می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷. ساختار دویعدی با استفاده از برنامه PSIPred.



شکل ۸. هم‌ردیفی مقایسه‌ای توالی اسیدآمینهای HXT7 کلون شده در وکتور pGEM-T با توالی اسیدآمینهای سایر سویه‌های دیگر مخمر ساکارومیسس سروزیه موجود در NCBI با استفاده از برنامه Multialign. ردیف آخر توالی‌های مورد توافق را پس از مقایسه نشان می‌دهد

گزارش از جداسازی و کلونینگ این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است [۱۶].

توالی ژن HXT7 ابتدا در وکتور پایه‌ی pGEM-T کلون شد تا محدودی استفاده از آنزیم‌های برشی برای کلونینگ افزایش یابد برای بیان این ژن نیاز به یک پروموتور قوی نظیر ADH-promoter و GAPDH-promoter می‌باشد که این پروموتورها باعث افزایش میزان جذب قندهای هگزوز توسط سلول‌های مخمر می‌شود که در نهایت میزان تولید الکل طی فرآیند تخمیری افزایش می‌یابد.

این مطالعه راهی برای پیش‌رفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب و بیان این ژن برای مطالعه آینده است. در این تحقیق با استفاده از روش مهندسی ژنتیک ژن HXT7 جداسازی و کلون گردیدند. امید است با بررسی بیش‌تر روی این ژن و سایر ژن‌های این خانواده احتمالاً در آینده مخمر نوترکیب جهت افزایش راندمان تولید الکل طی تخمیر ساکارومیسیس سرویزیه تهیه نمود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به‌خاطر فراهم نمودن امکانات مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- [1] De Bari I, De Canio P, Cuna D, Liuzzi F, Capece A, Romano P. Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *N Biotechnol* 2013; 30: 591-597.
- [2] Singh A, Bishnoi RN. Optimization of ethanol production from microwave alkali pretreated rice straw using statistical experimental designs by *Saccharomyces cerevisiae*. *Indust Crops Produc* 2012; 37: 334-341.
- [3] Rossi G, Sauer M, Porro D, Branduardi P. Effect of HXT1 and HXT7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Microb Cell Fact* 2010; 9: 1-10.
- [4] Gutierrez-Lomeli M, Torres-Guzman JC, Gonzalez-Hernandez GA, Cira-Chavez LA, Pelayo-Ortiz C, Ramirez-Cordova Jde J. Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 93: 363-371.
- [5] Ozcan S, Johnston M. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 554-569.
- [6] Perez M, Luyten K, Michel R, Riou C, Blondin B. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression

فیلوژنتیکی) مشخص شد این پروتئین شباهت زیادی با Hxt7p ساکارومیسیس سرویزیه سویه‌های دیگر ثبت شده در NCBI دارد و این نشان می‌دهد Hxt7p در اکثر سویه‌های ساکارومیسیس سرویزیه حفظ شده است. همچنین بررسی‌های فیلوژنتیکی HXT7 ایرانی با سایر خانواده‌ی انتقال‌دهنده‌های هگزوز نشان از تشابه و ارتباط نزدیک HXT7 با این خانواده ژنی است و از بین آن‌ها بیش‌ترین تشابه را با HXT6 دارد.

اثر بیان بیشینه‌ی این خانواده‌ی ژنی در مخمرها مورد مطالعه قرار گرفته است و تولید اتانول را در سویه‌ی وحشی مخمر با سویه‌ی مهندسی شده مقایسه کردند. داده‌های به‌دست آمده نشان دادند که تظاهر بیش از حد این انتقال‌دهنده‌ها منجر به افزایش دریافت گلوکز شود. محققین نشان دادند که با تنظیم کردن اولین مرحله‌ی مسیر بیوستنتز گلوکز می‌توان منجر به تجمع اسیدلاکتیک شد، که یک افزایشی در حدود ۱۵٪ در تولید اتانول در مقایسه با سویه‌ی وحشی مشاهده کردند [۴،۳]. بارها این خانواده‌ی ژنی روی پلاسمیدهای مختلف کلون شده و افزایش تولید اتانول در سویه‌ی مهندسی شده در مقایسه با سویه‌ی وحشی مخمر مشاهده شده است. به‌طور مثال Rossi و همکاران (۲۰۱۰) از بین انتقال‌دهنده‌ی هگزوز ساکارومیسیس سرویزیه HXT7 و HXT1 را کلون کرده و افزایش تولید اتانول را در سویه‌ی مهندسی شده مشاهده کردند. در سال ۲۰۱۲ نیز HXT7، HXT1 و GXF1، GXS1 (انتقال‌دهنده‌ی زایلوز) از *Condida intermedia* را به پلاسمید pUPG1 کلون کرده در نهایت به مخمر MT8- 1/XkdXI منتقل کردند. و نتیجه‌ی کارشان را با پلاسمید کنترل مقایسه کردند و افزایش تولید اتانول را با تقویت برداشت گلوکز و زایلوز مشاهده کردند. این نتایج به‌طور آشکار نشان می‌دهند که افزایش بیان انتقال‌دهنده‌ها در مخمر می‌تواند توانایی تولید اتانول را به‌وسیله‌ی تسهیل مصرف گلوکز بهبود بخشد [۱۵]. در ایران نیز ژن HXT2 از طریق بهینه‌سازی PCR از ساکارومیسیس سرویزیه سویه‌ی ایرانی جدا و در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد. این ژن با شماره دسترسی JQ 323554.1 در بانک جهانی ژن ثبت شده است. این اولین

- [12] Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnol* 2004; 21: 4-8.
- [13] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. 2005; pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, NJ: Humana Press.
- [14] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 1982; 157: 105-132.
- [15] Takanori T, Tomonori I, Chiaki O, Naoto O, Takayuki O, Akihiko K. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xyloseisomerase pathway. *J Biosci Bioeng* 2012; 114: 209-211.
- [16] Amiri S, Tarinejad A, Sharifi Sirchi Gh. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose transporter gene2 from Iranian *Saccharomyces cerevisiae*. *Koomesh* 2012; 2: 138-143 (Persian).
- during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Res* 2005; 5: 351-361.
- [7] Reifemberger E, Boles E, Ciriacy M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem* 1997; 245: 324-333.
- [8] Reifemberger E, Freidel K, Ciriacy M. Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol* 1995; 16: 157-167.
- [9] Liang H, Gaber RF. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by SNF3- regulated expression of HXT6. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1953-1966.
- [10] Lakshmanan J, Mosley AL, Ozcan S. Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Curr Genet* 2003; 44: 19-25.
- [11] Kim JH, Polish J, Johnston M. Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5208-5216.

Isolation, cloning and analysis of the glucose transporter gene 7 from Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Solmaz Azizi (M.Sc)¹, AliReza Tarinejad (Ph.D)^{*2}

1 – Dept. of Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

2 – Dept. of Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

(Received: 24 May 2014; Accepted: 8 Nov 2014)

Introduction: The most important and specific known action for *Saccharomyces cerevisiae* yeast is producing ethanol by alcohol fermentation and that is probably due to its high efficiency for absorption and fermentation of hexose sugars. The *S. cerevisiae* express 20 genes that encode hexose transporter proteins, including *hxt1-hxt17*, *gal2*, *snf3* and *rgt2*. Among all those gene families, *hxt1-hxt7* have important role in alcohol production. It has been shown that increasing the expression *hxt1-hxt7* accelerates alcohol fermentation and therefore, ethanol production. The aim of this study was to identify and isolate *hxt7* from *Saccharomyces cerevisiae* genome, using PCR and cloning it into a vector containing suitable expression promoter in order to produce recombinant yeast by transformation.

Materials and Methods: isolation of *hxt7* by specific primers was achieved via PCR. The amplified fragments were cloned into pGEM-T vector and transformed into *Escherichia coli* and finally, the recombinant plasmids were sent to sequencing.

Results: The nucleotide sequence of open reading frame in gene was revealed a 1713 bp long with a deduced amino acid of 570 residues. The estimated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 62.725 kDa and 7.89 respectively.

Conclusion: The deduced protein sequence showed a high similarity to *hxt7* sequences registered in NCBI and with the highest percentage of similarity to Hxt7p *S.cerevisiae* S288C recorded at NCBI with access code NP010629.3.

Key words: Cloning, *Saccharomyces cerevisiae*, *HXT7* gene, Recombinant plasmids

* Corresponding author. Tel: +98 4134327572
atarinejad@yahoo.com