ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ٤، زمستان ١٤٠٠
صفحه ٣٢٨ - ٣٢١

شناسایی و تعیین خصوصیات مولکولی دو ژن *tatD* DNase از سویه بومی *Bacillus* sp. B2

Identification and molecular characterization of two *tatD* DNase genes from a native *Bacillus* sp. B2

امین خوشنویسان[1]، پریسا فرخ*[2,3]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۲- استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۳- پژوهشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

Amin Khoshnevisan[1], Parisa Farrokh*[2,3]

1- MSc Graduated Student of Biotechnology, Faculty of Basic Science, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
3- Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farrokh@du.ac.ir

(تاریخ دریافت: ١٤٠٠/٠٣/٠٦ - تاریخ پذیرش: ١٤٠٠/٠٧/٢٨)

چکیده

نوکلئازها پیوندهای فسفودی‌استر را در اسیدهای نوکلئیک می‌شکنند. TatD DNase پروتئین تکاملی حفاظت شده‌ای است که در موجودات مختلف بیان می‌شود، اما عملکردش به‌طور کامل شناخته نشده است. هدف این پژوهش، شناسایی ژن‌های *tatD* در جدایه *Bacillus* sp. B2 بود که قبلا از خاک شهرستان دامغان جداسازی شده است. شناسایی مولکولی این جدایه با تکثیر و توالی‌یابی *16S rRNA* انجام شد. دو جفت پرایمر چندحالتی برای ژن‌های *tatD* طراحی شدند و توالی‌های تکثیر شده با BLAST بررسی شد. توالی‌های اسیدآمینه‌ای ژن‌های *tatD*، با توالی شناخته شده TatD در *E. coli* هم‌ردیف شدند. ساختار دوم پروتئین‌های TatD و دُمین حفاظت شده در آن‌ها به‌ترتیب با ابزارهای PSIpred و CD-search پیش‌بینی شدند. توالی *16S rRNA* در *Bacillus* sp. B2، ١٠٠٪ با توالی‌های *B. cereus*، *B. thuringiensis* و *B. anthracis* همسانی نشان داد. به‌علاوه، ژن‌های *tatD1* و *tatD2* تکثیر شده، بیش از ٩٠٪ با توالی‌های DNase *tatD* در گونه‌های باسیلوس همسانی داشتند. هم‌ردیفی توالی‌های TatD با توالی TatD Dnase از *E. coli* نشان داد که باقی‌مانده‌های متصل‌شونده به یون فلزی و جایگاه فعال در آن‌ها حفاظت شده است. ساختارهای دوم توالی‌های TatD1 و TatD2 مشابه با توالی TatD Dnase در *E. coli* بودند و CD-Search نشان داد که هر دو پروتئین TatD به ابرخانواده هیدرولازهای وابسته به یون فلزی تعلق دارند. بر اساس این نتایج، جدایه *Bacillus* sp. B2 دو ژن متفاوت *tatD* داشت. به‌نظر می‌رسد که *tatD* در ژنوم تعدادی از گونه‌های باسیلوسی مضاعف شده و تکامل یافته است. شناسایی و تعیین خصوصیات TatD از موجودات مختلف برای درک نقش آن به‌عنوان یک پروتئین تکاملی حفاظت شده، ارزشمند است.

واژه‌های کلیدی

اپران tat
باسیلوس
دئوکسی ریبونوکلئاز
ژن *16S rRNA*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]

مقدمه

نوکلئازها آنزیم‌هایی هستند که پیوند فسفودی‌استر را در اسیدهای‌نوکلئیک می‌شکنند و می‌توانند به‌عنوان اندو یا اگزونوکلئاز، DNase، RNase، توپوایزومراز، ریکامبیناز و آنزیم‌های پیرایش‌کننده RNA عمل کنند. این آنزیم‌ها در فرایندهای سلولی گوناگون مانند همانندسازی، نوترکیبی، ترمیم، پیرایش mRNA و آپپتوز نقش دارند (Yang 2011). دئوکسی‌ریبونوکلئازها در روش‌های آزمایشگاهی مختلف مانند استخراج RNA و پروتئین، ردپانگاری[1] و تهیه پروب به روش درزگیری[2] استفاده می‌شوند (Rittié and Perbal 2008). علاوه بر این، از سال ۱۹۹٤ استفاده از دئوکسی‌ریبونوکلئاز انسانی نوترکیب (rhDNase) به‌عنوان یک روش درمانی برای بیماران سیستیک فیبروزیس مطرح شده است (Innes 1998; Barker et al. 2004). استفاده از rhDNase برای درمان بیماران مبتلا به آتلکتازی هم نتایج مطلوبی داشته است (Hendriks 2005). آنزیم DNase با تخریب DNA خارج سلولی، ویسکوزیته مایعات ریوی را در این بیماران کاهش می‌دهد، ولی گران بودن این دارو استفاده آن را محدود کرده است (Innes 1998; Hendriks 2005).

TatD DNase پروتئین حفاظت شده‌ای است که در گونه‌های مختلف موجودات از باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات بیان می‌شود. پروتئین‌های TatD مختلف، از نظر توالی همسانی قابل توجه‌ای با هم دارند و دُمین حفاظت شده‌ای در حدود ۲۵۰ اسیدآمینه در آن‌ها وجود دارد (Chen et al. 2014; Singh et al. 2019). به‌عنوان مثال TatD در *Escherichia coli*، به‌ترتیب ۲٦، ۳۷ و ۳۲ درصد با TatD در *Saccharomyces cerevisiae*، *Caenorhabditis elegans* و انسان همسانی دارد. این میزان از شباهت احتمالاً نشان‌دهنده ساختار و عملکرد حفاظت شده در این گروه از نوکلئازها است. با این وجود درباره عملکردهای سلولی یا ویژگی‌های بیوشیمیایی TatD در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها اطلاعات کمی وجود دارد (Chen et al. 2014). در باکتری *E. coli*، ژن *tatD* در اپران *tat* قرار دارد که حاوی سه ژن دیگر به‌نام‌های *tatA*، *tatB* و *tatC* است. محصولات TatA، TatB و TatC پروتئین‌های غشایی هستند که به‌عنوان گیرنده در اتصال و انتقال پروتئین‌هایی با توالی نشانه‌ای حاوی (S/T)RRXFLK، از سیتوپلاسم به پری‌پلاسم نقش دارند. اما TatD، یک پروتئین محلول سیتوپلاسمی یا یک پروتئین درون غشایی با دمین سیتوپلاسمی بزرگ است (Wexler 2000; Chen et al. 2014). TatD ساختار بشکه TIM[3] با ۸ موتیف α/β دارد که این ساختار در بسیاری از آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز، ترانسفراز، هیدرولاز، لیاز و ایزومراز دیده می‌شود (Chen et al. 2014). TatD با فعالیت DNase وابسته به یون منیزیم، به‌نظر نمی‌رسد برای انتقال پروتئین‌ها در مسیر Tat ضروری باشد. نتایج آزمایش‌ها با جهش‌یافته‌های *E. coli* که ژن *tatD* در آن‌ها غیرفعال شده بود، نشان داد که این پروتئین در مسیر ترشحی Tat نقشی ندارد (Wexler 2000; Chen et al. 2014). سرانجام مشخص شد که TatD در *E. coli*، در ترمیم آسیب DNA که توسط H_2O_2 ایجاد شده، نقش دارد و موجب حذف تک رشته DNA از جهت ′۳ به ′۵ می‌گردد و در ترمیم شکستگی‌های DNA دو رشته‌ای مؤثر است (Chen et al. 2014).

همولوگ TatD در *C. elegans*، *S. cerevisiae* و *Trypanosoma brucei* هم با فعالیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ در آپپتوز نقش دارد (Gannavaram and Debrabant 2012; Chen et al. 2014). در *Streptococcus pneumonia*، TatD عامل بیماری‌زای باکتری به حساب می‌آید که با فعالیت دئوکسی ریبونوکلئازی در فرار *S. pneumonia* از تله‌های خارج سلولی نوتروفیل[4] موثر است (Jhelum et al. 2018). بنابراین، نقش‌های متفاوتی که از ترمیم آسیب DNA در پروکاریوت‌ها تا تخریب DNA در آپپتوز در یوکاریوت‌ها برای TatD DNase شناسایی شده است.

به‌غیر از باکتری *E. coli*، که توالی، ساختار و عملکرد پروتئین TatD در آن شناخته شده است، تنها در سه پژوهش دیگر TatD از سویه‌های *Staphylococcus pasteuri* RA3 (Alborzian Deh Sheikh and Hosseini 2013)، *Ralstonia paucula* RA4 (Alborzian Deh Sheikh and Hosseini 2014) و *Bacillus anthracis* (Singh et al. 2019) مطالعه شده است. با توجه به

[1] Footprinting
[2] Nick translation
[3] TIM-barrel fold
[4] Neutrophil Extracellular traps

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]

بررسی‌های کمی که روی TatD DNase در باکتری‌های مختلف انجام شده، به‌نظر می‌رسد که مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است تا درنهایت بتوان به نقش این پروتئین حفاظت شده در باکتری‌ها پی برد. هدف این پژوهش، مطالعه توالی *tatD* در باکتری باسیلوسی است که از خاک شهرستان دامغان جداسازی شده و یکی از شایع‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشد. با انجام بررسی‌های اولیه مشاهده شد که در توالی ژنوم بسیاری از گونه‌های باسیلوسی، دو توالی *tatD* متفاوت وجود دارد. بر این اساس، احتمال حضور ژن‌های *tatD* در جدایه مورد بررسی با PCR آزمایش شد و سپس خصوصیات توالی‌های اسیدآمینه‌ای آن‌ها با TatD DNase در *E. coli*، با کمک برنامه‌های بیوانفورماتیکی مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

باکتری که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، یکی از باکتری‌های جداسازی شده از خاک مناطق مختلف شهرستان دامغان است. این مجموعه باکتری در یک مطالعه با هدف جداسازی باکتری‌های مولد DNase غربال‌گری شده بودند (Khoshnevisan 2017). باکتری انتخاب شده در این پژوهش، از خاک منطقه شهرک بوستان جداسازی شده بود (جدایه B2) و در محیط کشت DNase، قطر هاله هیدرولیزی بزرگ‌تری ایجاد می‌کرد. جدایه B2 در رنگ‌آمیزی گرم یک باسیل گرم مثبت بود. استخراج DNA ژنومی از جدایه B2 مشابه با روش (2014) Abdulla انجام شد. در این روش از بافر SET برای استخراج استفاده شد و تغییراتی که نسبت به روش اصلی در این مطالعه اعمال شد شامل: تغییر در شرایط گرماگذاری پس از اضافه کردن بافر لیز (سوسپانسیون باکتری به‌همراه بافر لیزکننده ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت) و حذف استات سدیم برای رسوب دهی DNA بود. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده، الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد (سیگما، آمریکا) انجام گرفت و جذب نمونه در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت DNA نیز بر اساس جذب در ۲۶۰ نانومتر بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر محاسبه شد.

شناسایی مولکولی باکتری مورد مطالعه با روش PCR و پرایمرهای عمومی برای ژن *16S rRNA* در یوباکتری‌ها انجام گرفت. توالی پرایمرهای به‌کار رفته شامل F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و R: AAGGAGGTGATCCAGCC (Weisburg et al. 1991) بودند که توسط شرکت سینا کلون (ایران) ساخته شدند. مخلوط واکنش PCR شامل ۱X بافر PCR، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP ، ۰/٤ پیکومولار از هر یک از پرایمرها، ۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز (سیناکلون، ایران) و ۲۰۰ نانوگرم DNA استخراج شده، بود. شرایط دمایی بهینه برای تکثیر ژن *16SrRNA* شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و درنهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

محصول PCR به‌دست آمده روی ژل یک درصد آگارز الکتروفورز شد و پس از خالص‌سازی در وکتور pTZ57R/T طبق دستورالعمل کیت شرکت فرمنتاز کلون شد و با روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد *E. coli* DH5α ترانسفورم شد. باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط LB حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ٤۰ میکروگرم در میلی‌لیتر X-gal و ۰/۲ میلی‌مولار IPTG کشت داده شدند و سپس از یکی از کلنی‌های سفید استخراج پلاسمید انجام گرفت (کیت شرکت دنا زیست آسیا) و با پرایمرهای M13 از دو طرف با روش سنگر توالی‌یابی شد (بایونیر، کره جنوبی).

توالی ژن *16S rRNA* پس از سرهم کردن دو خوانش توسط برنامه SeqMan از مجموعه نرم‌افزار DNASTAR Lasergene، با برنامه BLAST در NCBI (Altschul et al. 1990) بررسی شد تا شبیه‌ترین توالی‌ها به آن شناسایی شود. توالی ژن *16S rRNA* جدایه B2 هم در GenBank توسط BanKit ثبت شد.

پس از شناسایی باکتری B2 به‌عنوان گونه‌ای از جنس باسیلوس، تعدادی از توالی‌های *tatD* DNase شناخته شده از گونه‌هایی که بیشترین شباهت را به آن داشتند و شامل *B. cereus* (با شماره‌های دسترسی GenBank: CP009641، CP009968، CP001283، CP009605، CP011155، CP015727 و

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]

CP016316)، *B. thuringiensis* (با شماره‌های دسترسی GenBank: CP016588، CP013275، CP013055، CP010106، CP020723، CP010088 و CP015350) و *B. anthracis* (با شماره‌های دسترسی GenBank: CP001970، CP012724، CP012722، CP022044، CP001974، CP029805 و CP009476) بودند از NCBI گرفته شدند و هم‌ردیفی آن‌ها با برنامه Clustal Omega (Sievers et al. 2011) انجام شد. مطالعه این توالی‌ها نشان داد که این گونه‌ها دارای دو توالی *tatD* متفاوت هستند. به‌همین دلیل دو هم‌ردیفی چندگانه جداگانه برای دو نوع توالی‌های DNase *tatD* با برنامه Clustal Omega آماده شد و برای نواحی حفاظت شده هر دو گروه توالی *tatD* (*tatD1* و *tatD2*)، پرایمرهای چندحالتی[1] طراحی وسنتز (سیناکلون، ایران) شد (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های *tatD*.

نام پرایمر	توالی
FDG1	5'-ATGTTGTTTGATACACATTCRCA-3'
RDG1	5'-TCAACACCAAATAAARCYTTTGC-3'
FDG2	5'-RTGGATTGATAGTCATATACATG-3'
RDG2	5'-AATTGAMTYGTATTTTCATATATYG-3'

در ادامه دو واکنش PCR برای تکثیر ژن‌های *tatD* انجام شد. مخلوط واکنش PCR و شرایط دمایی برای هر دو نوع ژن *tatD* مشابه با واکنش PCR ژن *16S rRNA* بود. برای تکثیر ژن‌های *tatD* از ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ استفاده شد و دمای اتصال پرایمرهای گروه ۱ (FDG1 و RDG1) و گروه ۲ (FDG2 و RDG2) به ترتیب ٥٦ و ٥٥ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.

محصولات PCR در ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز شدند و پس از مشاهده باندهای مورد انتظار، نمونه‌ها برای خالص‌سازی و توالی‌یابی به شرکت بایونیر (کره جنوبی) ارسال شدند. توالی‌یابی از دو طرف با پرایمرهایی مورد استفاده در PCR انجام گرفت و نتایج حاصل با برنامه نوکلئوتید BLAST بررسی شد و سپس در GenBank ثبت شدند.

میزان شباهت ژن‌های *tatD1* و *tatD2* و همچنین پروتئین‌های حاصل از آن‌ها (TatD1 و TatD2) به‌ترتیب با برنامه‌های نوکلئوتید BLAST و پروتئین BLAST به‌کمک گزینه هم‌ردیفی دو توالی، تعیین شدند. توالی‌های پروتئینی حاصل از ترجمه ژن‌های *tatD* برای تعیین این‌که به کدام خانواده پروتئینی تعلق دارند و همچنین وجود یا عدم وجود دُمین حفاظت شده در آن‌ها، با برنامه CD-search (Marchler-Bauer et al. 2015) در NCBI بررسی شدند. برای شناسایی اسیدهای‌آمینه حفاظت‌شده که در جایگاه فعال و اتصال به یون فلزی نقش دارند، توالی‌های پروتئینی TatD در این پژوهش با توالی مطالعه شده آن در *E.coli* (WP_074573707) با برنامه Clustal Omega هم‌ردیف شدند و موقعیت اسیدهای‌آمینه سازنده جایگاه فعال و اتصال به یون فلزی در آن‌ها مقایسه شد. ساختار دوم توالی‌های TatD1 و TatD2 نیز توسط برنامه PSIpred (Buchan et al. 2013) پیش‌بینی شد.

نتایج

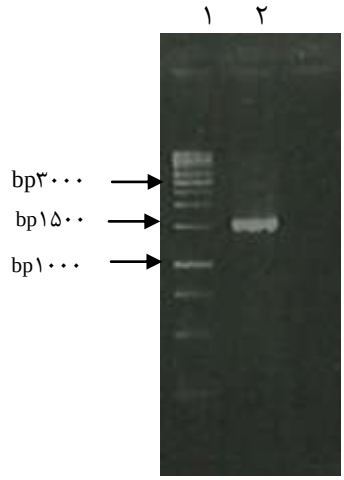
DNA استخراج شده روی ژل آگارز به‌صورت تک باند و بدون اسمیر مشاهده شد و نسبت جذب ٢٦٠ به ٢٨٠ نانومتر هم در آن ۱/۸۹ بود که نشان‌دهنده کیفیت مناسب DNA استخراج شده بود. غلظت DNA هم بر اساس جذب خوانده شده در ٢٦٠ نانومتر، معادل ٢٠٠ نانوگرم در میکرولیتر محاسبه شد. شناسایی مولکولی باکتری با تکثیر و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* انجام شد. محصول PCR این ژن، باند مورد نظر را در محدوده ١٥٠٠ bp روی ژل آگارز نشان داد (شکل ۱). نتیجه توالی‌یابی، یک قطعه ١٥٤٤ bp بود که توالی آن با شماره KY393425.1 در GenBank ثبت شد. نتایج BLAST نشان داد که توالی ژن *16S rRNA* به‌دست آمده از باکتری B2 با توالی‌هایی از گونه‌های *B. cereus*، *B. thuringiensis* و *B. anthracis*، با هم‌پوشانی کامل، ١٠٠ درصد همسانی داشت. بر اساس این نتایج جدایه B2، گونه باسیلوس B2 (*Bacillus* sp. B2) نام‌گذاری شد.

به کمک پرایمرهای چندحالتی طراحی شده برای ژن‌های *tatD1* و *tatD2*، به‌ترتیب دو محصول PCR با اندازه‌های مورد انتظار ٧٦٤ bp و ٧٤٣ bp روی ژل آگارز مشاهده شدند (شکل ۲).

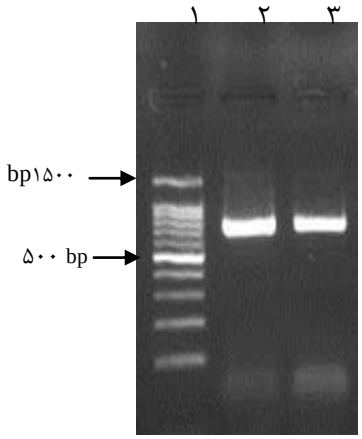
[1] Degenerate primer

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن *16S rRNA*. چاهک ۱، نشانگر وزن مولکولی 1kb (ترموفیشر، آمریکا) و چاهک شماره ۲، محصول تکثیر شده ژن *16S rRNA*.



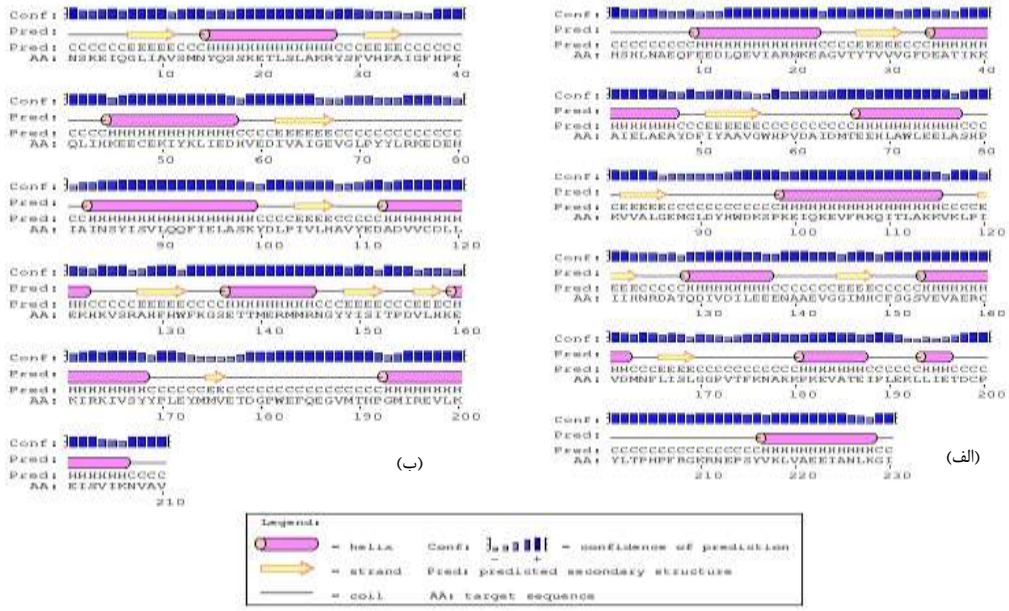
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *tatD1* و *tatD2*. چاهک ۱، نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰bp تا ۱۵۰۰ bp (سیناکلون، ایران)، و چاهک شماره ۲ و ۳ به‌ترتیب، محصول تکثیر شده ژن‌های *tatD1* و *tatD2* به طول تقریبی ۷۰۰ bp.

پس از بررسی نتایج توالی‌یابی آن‌ها، توالی ژن‌های *tatD1* و *tatD2* به‌ترتیب با شماره‌های دسترسی MK164089.1 و MF417495.2 در بانک ژن NCBI ثبت شدند. نتیجه نوکلئوتید BLAST نشان داد که توالی‌های *tatD1* و *tatD2* بین ۹۰ تا ۱۰۰ درصد با توالی‌های مشابه خود در تعدادی از گونه‌های مختلف *B. thurigiensis*، *B. anthracis* و *B. cereus* همسانی دارند. توالی ژن‌های *tatD1* و *tatD2* در سطح نوکلئوتیدی هیچ تشابه معناداری را با BLAST نشان ندادند، ولی میزان همسانی و تشابه توالی اسیدآمینه‌ای TatD1 و TatD2 پس از هم‌ردیفی با یکدیگر به‌ترتیب ۲۹ و ٤۹ درصد می‌باشد. نتایج بررسی توالی‌های پروتئینی در CD-search نشان داد که توالی‌های TatD1 و TatD2 هر دو به خانواده دئوکسی‌ریبونوکلئازهای TatD و ابرخانواده هیدرولازهای وابسته به یون فلزی تعلق دارند. به‌علاوه، توالی اسیدآمینه‌ای هر دوی آن‌ها به دمین TatD DNase مشابه بود. هم‌ردیفی توالی‌های TatD1 و TatD2 به‌همراه توالی TatD در *E. coli* که در میان باکتری‌ها بیشتر مطالعه شده، انجام شد (شکل ۳). هیستیدینی که با ستاره مشخص شده به‌همراه آسپارتیک‌اسید و گلوتامیک‌اسیدهایی که با دایره مشخص شده‌اند، به‌ترتیب در جایگاه فعال و اتصال به یون منیزیم نقش دارند.

باقی‌مانده‌های حفاظت شده در دو توالی TatD مطالعه شده در این پژوهش و مشابه آن در *E. coli* نیز به‌صورت خاکستری نشان داده شده است (شکل ۳). نتیجه پیش‌بینی ساختارهای دوم توالی‌های TatD در PSIpred هم ساختارهای صفحه بتا و مارپیچ آلفا را در مناطق مشابه نشان داد (شکل ٤).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]

شکل ۳- هم‌ردیفی توالی‌های TatD1 و TatD2 از *Bacillus* sp. B2 با توالی TatD در *E. coli* (WP_074573707). باقی‌مانده‌های مؤثر در اتصال به یون فلزی و جایگاه فعال به‌ترتیب با دایره و ستاره مشخص شده‌اند. قسمت‌های خاکستری، باقی‌مانده‌های حفاظت شده را نشان می‌دهند.



شکل ٤- پیش‌بینی ساختارهای دوم در توالی‌های TatD1 (الف) و TatD2 (ب) با برنامه PSIpred.

بحث

آنزیم‌های دئوکسی‌ریبونوکلئاز از لحاظ عملکرد، تنوع زیادی دارند و در گروه‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند (Yang 2011). این آنزیم‌ها علاوه بر نقش‌های متعددی که در فرایندهای سلولی دارند، در روش‌های آزمایشگاهی و همچنین درمان برخی از بیماری‌ها مانند سیستیک فیبروزیس مفید می‌باشند (Barker et al. 2004; Rittié and Perbal 2008). TatD DNase یک نوع نوکلئاز با دمین حفاظت شده است که در همه موجودات یافت می‌شود (Chen et al. 2014). به‌دلیل مطالعات کمی که در ارتباط با پروتئین TatD انجام شده، درک درستی از عملکرد زیستی این پروتئین حفاظت شده وجود ندارد. بنابراین شناسایی و بررسی آن در موجودات مختلف می‌تواند مهم باشد. علاوه بر این، شناسایی آنزیم‌های نوکلئاز با منشا باکتریایی راهکار مناسبی برای تولید مقرون به صرفه آن‌ها به‌منظور کاربردهای درمانی است. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه زیادی درباره *tatD* DNase در باکتری‌های جنس باسیلوس انجام نشده است، در این پژوهش شناسایی و بررسی بیوانفورماتیکی آن‌ها در یکی از باکتری‌های بومی جداسازی شده از خاک شهرستان دامغان انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه B2 با تکثیر و توالی‌یابی کامل ژن *16S rRNA* انجام گرفت. ژن *16S rRNA* تقریبا ۱۵۵۰ جفت‌باز دارد که حاوی نواحی متغیر و حفاظت شده‌ای است و نواحی متغیر آن

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]

برای مطالعات تاکسونومی و شناسایی باکتری‌ها استفاده می‌شود (Clarridge 2004). در این مطالعه از پرایمرهای عمومی ناحیه حفاظت شده دو انتهای ژن برای تکثیر استفاده شد و نتیجه توالی‌یابی، بیشترین شباهت (۱۰۰٪) را به گونه‌های *B. cereus*، *B. thuringiensis* و *B. anthracis* داشت.

جستجو و مطالعه ژنوم گونه‌های مختلف *B. cereus*، *B. thuringiensis* و *B. anthracis* در NCBI که به جدایه *Bacillus* sp. B2 شبیه‌تر بودند، نشان داد که در ژنوم آن‌ها دو توالی *tatD* وجود دارد که محصولات آن‌ها با نام‌های TatD هیدرولاز و TatD مرتبط با DNase[1] مشخص شده است. در ژنوم‌های مورد بررسی، یکی از ژن‌های *tatD* در نزدیکی اعضای اپران *tat* قرار دارد و ژن *tatD* دیگر با فاصله زیادی از آن‌ها به‌صورت مستقل از اپران در ژنوم قرار گرفته است. درحالی‌که در باکتری‌های *E. coli* (Chen et al. 2014)، *S. pasteuri* RA3 (Alborzian Deh Sheikh and Hosseini R 2013) و *R. paucula* RA4 (Alborzian Deh Sheikh and Hosseini R 2014) یک ژن *tatD* گزارش شده است. با توجه به تفاوت‌های دو ژن *tatD* در ژنوم باسیلوس‌های مطالعه شده، این دو ژن توسط پرایمرهای چندحالتی جداگانه‌ای در جدایه مورد بررسی تکثیر و توالی‌یابی شدند که با سایر توالی‌های *tatD* در جنس باسیلوس مشابه بودند. وجود دو توالی ژنی متفاوت *tatD* در گونه‌های مورد بررسی باسیلوس احتمالاً نشان‌دهنده این است که طی تکامل این ژن در ژنوم مضاعف شده است و در اثر تغییرات ژنتیکی، تفاوت‌هایی نسبت به‌هم پیدا کرده‌اند. جدا بودن یکی از توالی‌های *tatD* از اپران *tat* در ژنوم گونه‌های بررسی شده باسیلوس می‌تواند نشان دهنده این واقعیت باشد که محصول TatD DNase مشارکتی در انتقال پروتئین‌های حاوی توالی نشانه آرژنین دوتایی ((S/T)RRXFLK) از غشاء ندارد. مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است تا به اهمیت حضور دو توالی tatD در ژنوم باسیلوس‌ها پی برده شود.

در توالی TatD شناسایی شده در *E. coli*، سه باقی‌مانده E91، E201 و D203 در اتصال دو تا سه یون منیزیم دخالت دارند و H62 در جایگاه فعال TatD، نقش مهمی در هیدرولیز DNA بر عهده دارد (Chen et al. 2014). این باقی‌مانده‌ها در هر دو توالی TatD1 و TatD2 در باکتری مورد بررسی در این پژوهش نیز وجود دارند.

امروزه توالی‌های بسیاری از ژن‌های *tatD* DNase به‌واسطه توالی‌یابی ژنوم بسیاری از موجودات در پایگاه‌های اطلاعاتی ژنی وجود دارد، ولی تاکنون تنها ۱۲ ساختار کریستالی مرتبط با پروتئین TatD در بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB) گزارش شده که البته نقش و عملکرد همه آن‌ها به درستی شناخته نشده است. مطالعه ساختار دوم پروتئین TatD1 و TatD2 به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که آن‌ها هم مشابه با توالی TatD در *E. coli* از مارپیچ‌های آلفا و صفحات بتا تشکیل شده‌اند که به‌طور متداول در آنزیم‌های هیدرولازی مشاهده می‌شود (Chen et al. 2014). بنابراین ویژگی‌های توالی و ساختاری TatD1 و TatD2 نشان می‌دهد که هر دو جزء دئوکسی‌ریبونوکلئازهای TatD هستند.

به‌طور کلی، نتایج به‌دست آمده از این پژوهش منجر به شناسایی دو ژن *tatD* در جدایه *Bacillus* sp. B2 شد. با وجود تفاوت فیلوژنتیکی باکتری‌های جنس باسیلوس با *E. coli*، مقایسه توالی‌های اسیدآمینه‌ای TatD1 و TatD2 به‌دست آمده با توالی TatD DNase مطالعه شده در *E. coli*، نشان داد که باقی‌مانده‌های کاتالیتیکی و متصل شونده به منیزیم در آن‌ها حفاظت شده است و بنابراین نقش مهمی عملکرد TatD DNase در میان باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارند. شناسایی این دو ژن *tatD*، مقدمه‌ای برای همسانه‌سازی و بیان آن‌ها است تا بتوان با شناسایی ویژگی‌های نوکلئازی‌شان در مصارف درمانی یا پژوهشی از آن‌ها استفاده کرد. همچنین با غیر فعال‌سازی هر یک از دو ژن *tatD* در *Bacillus* sp. B2 می‌توان به نقش آن‌ها در جدایه مورد بررسی و احتمالاً تعدادی دیگر از گونه‌های باسیلوسی پی برد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از کارشناس محترم آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه دامغان، جناب آقای ابوطالب کوشا تشکر می‌کنند.

[1] TatD related DNase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]

منابع

Abdulla AA (2014) Optimization of DNA extraction of *Lactobacillus spp* for identification by *tuf*B gene –based polymerase chain reaction. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare 4:122-126.

Alborzian Deh Sheikh A, Hosseini R (2013) Molecular characterization of *TatD* DNase gene from *Staphylococcus pasteuri* RA3. Research in Biotechnology 4:8-20.

Alborzian Deh Sheikh A, Hosseini R (2014) Molecular charcterization of *tatD* DNase gene from *Ralstonia paucula* RA4 soil bacterium. Applied Biochemistry and Microbiology 50:447-455.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215:403-410.

Barker M, Franke E, Böhle M, Pfannenstiel C, Heimann G (2004) Effect of DNase on exercise capacity in cystic fibrosis. Pediatric Pulmonology 38:70-74.

Buchan DW, Minneci F, Nugent TC, Bryson K, Jones DT (2013) Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. Nucleic Acids Research 41:W349-W357.

Chen YC, LI CL, Hsiao YY, Duh Y, Yuan HS (2014) Structure and function of TatD exonuclease in DNA repair. Nucleic Acids Research 42:10776-10785.

Clarridge III JE (2004) Impact of *16S rRNA* gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 17:840-862.

Gannavaram S, Debrabant A (2012) Involvement of TatD nuclease during programmed cell death in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*. Molecular Microbiology 83:926-935.

Hendriks T, Hoog M, Lequin MH, Devos AS, Merkus PJFM (2005) DNase and atelectasis in non-cystic fibrosis pediatric patients. Critical Care 9:R351-R356.

Innes JA. 1998. DNase in cystic fibrosis: the challenge of assessing response and maximising benefit. *Thorax* 53:1003-1004.

Jhelum H, Sori H, Sehgal D (2018) A novel extracellular vesicle-associated endodeoxyribonuclease helps *Streptococcus pneumonia* evade neutrophil extracellular traps and is required for full virulence. Scientific Reports 8:7985.

Khoshnevisan A (2017) Isolation and molecular identification of deoxyribonuclease producing bacterium isolated from soil of different regions of Damghan. Dissertation, Islamic Azad University, Damghan branch. (In Farsi).

Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer RC, He J, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Wang Z, Yamashita RA, Zhang D, Zheng C, Bryant SH (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Research 43:222-226.

Rittié L, Perbal B (2008) Enzymes used in molecular biology: a useful guide. Journal of Cell Communication and Signaling 2:25-45.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWiliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular Systems Biology 7:539.

Singh D, Rahi A, Kumari R, Gupta V, Gautam G, Aggarwal S, Rehan M, Bhatnagar R (2019) Computational and mutational analysis of TatD DNase of *Bacillus anthracis*. Journal of Cellular Biochemistry 2019:1-13.

Wexler M, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C, Berks BC, Palmer T (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. The Journal of Biological Chemistry 275:16717-16722.

Weisburg W, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173:697-703.

Yang W (2011) Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. Quarterly Reviews of Biophysics 44:1-93.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-10-15]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.2.6]