تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۲، صفحه ۹۵-۱۰۴
دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۳/۱۹ پذیرش نهایی: ۱۳۹۲/۰۶/۰۹

بررسی مولکولی ژن *luxA* برای شناسایی باکتری‌های نورافشان دریای مازندران

مجتبی محسنی * و محدثه صالح‌قمری
گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

چکیده

نورتابی زیستی (بیولومینانس) واکنشی شیمیایی است که سبب نشر نور در موجودات زنده می‌گردد. باکتری‌های نورافشان، فراوان‌ترین موجودات نورافشان در طبیعت هستند. برای شناسایی این باکتری‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده می‌شود. بررسی مولکولی ژن *luxA* که توالی آن در باکتری‌های نورافشان متفاوت است، می‌تواند در تشخیص این باکتری‌ها مناسب باشد. در پژوهش حاضر، نتایج تعیین جنس باکتری‌های نورافشان بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *luxA* مقایسه شد. همچنین، نتایج توالی‌یابی ژن 16S rDNA جدایه‌های نورافشان برای تأیید نتایج، بررسی شد. نمونه‌های آب دریای مازندران از ایستگاه‌های متعدد سواحل جنوبی جمع‌آوری شد. باکتری‌های نورافشان با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی SWB و SWA جداسازی و ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی آنها تعیین گردید. پس از گروه‌بندی جنس‌های مختلف باکتری‌های نورافشان بر اساس توالی ژن *luxA*، پرایمرهای اختصاصی طراحی و سنتز شد. با استخراج نوکلئیک‌اسید باکتری‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *luxA* و 16S rDNA انجام شد. پس از تعیین توالی ژن 16S rDNA جدایه‌های باکتری، درخت فیلوژنی نیز رسم شد. تعداد ۹ جدایه باکتریایی نورافشان از آب دریای مازندران جداسازی شد. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، تعداد پنج جدایه به جنس *Photobacterium* و چهار جدایه به جنس *Vibrio* متعلق بود. همچنین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *luxA* جنس‌های *Aliivibrio*، *Photobacterium* و *Vibrio* به ترتیب با پرایمرهای اختصاصی *luxA1*، *luxA2* و *luxA3* انجام شد. نتایج توالی‌یابی ژن 16S rDNA جنس *Photobacterium*، نشان‌دهنده شباهت بیش از ۹۹ درصد این جدایه‌ها به گونه *P. leiognathi* بود. نتایج تعیین جنس بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای اختصاصی *luxA* و نیز نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن 16S rDNA، با یکدیگر مطابقت داشت. بنابراین، پرایمرهای اختصاصی ژن *luxA* می‌تواند برای تعیین اولیه جنس باکتری‌های نورافشان به کار رود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های نورافشان، نورتابی زیستی، دریای مازندران، *luxA*

مقدمه

پدیده نورتابی زیستی در موجودات زنده، شامل فرآیند نشر نور در اثر اکسید شدن سوبسترا نظیر لوسیفرین و در حضور آنزیم لوسیفراز است. نقش

* m.mohseni@umz.ac.ir

نورتابی زیستی در موجودات مختلف، متفاوت است. در برخی برای دفاع در برابر شکارچی، در برخی دیگر برای حمله و در برخی از موجودات برای جفت‌یابی صورت می‌گیرد (Haddock *et al.*, 2010). همچنین، سیستم لوسیفرین-لوسیفراز در موجودات مختلف متفاوت است (Alves *et al.*, 2011). آنزیم لوسیفراز باکتری‌ها به کمک اکسیژن مولکولی، موجب اکسید شدن لوسیفرین باکتریایی $FMNH_2$ به همراه یک آلدئید آلیفاتیک زنجیر بلند می‌شود. این واکنش سبب نشر نور سبز-آبی در طول موج حدود ۴۹۰ نانومتر می‌شود که نقش بوم‌شناختی مهمی برای باکتری‌ها دارد. ژن مسؤول نورافشانی باکتری‌ها، در اپرون *luxCDABE* واقع شده‌است (Bose *et al.*, 2007). *luxAB*، آنزیم لوسیفراز ۷۷ کیلودالتونی را کد می‌کند. *luxA* زیرواحد آلفا کاتالیتیک و *luxB* زیرواحد بتا با عملی ناشناخته را کد می‌کند (Nawaz and Ahmed, 2011). در واقع، *luxB* از دو برابر شدن ژنی *luxA* ایجاد شده‌است. *luxCDE* نیز یک کمپلکس اسید چرب‌ردوکتاز را کد می‌کند که آلدئید مورد نیاز برای واکنش نورافشانی را فراهم می‌کند (Ast *et al.*, 2007). این کمپلکس شامل سه پروتئین: ردوکتاز، سنتتاز و ترانسفراز است. پروتئین‌های دیگر مرتبط با نورافشانی تنها در گونه‌های خاص باکتریایی نورافشان، یافت شده‌اند. باکتری‌های نورافشان شامل جنس‌های دریازی نظیر: *Vibrio*، *Aliivibrio*، *Shewanella*، *Photobacterium* و جنس خاکزی *Photorhabdus* هستند (Milburn, 2012). در این پژوهش، باکتری‌های نورافشان از دریای مازندران جداسازی شد و برای شناسایی، از آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد. بررسی مولکولی ژن *luxA* به کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، انجام و توالی ژن 16S rDNA نیز تعیین شد. بررسی ارتباط میان نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، ژن *luxA* و توالی ژن 16S rDNA از اهداف پژوهش حاضر است.

مواد و روش‌ها

غنی‌سازی و جداسازی

نمونه‌های آب دریا تا عمق ۳۰ متری از سواحل جنوبی دریای مازندران جمع‌آوری و بلافاصله در ظروف استریل درب‌دار و تحت دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی باکتری‌های نورافشان، نمونه‌های آب در محیط کشت اختصاصی SWB (Sea Water Broth) غنی‌سازی شد. این محیط کشت از مخلوط کردن پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، عصاره گوشت ۰/۳ درصد، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دریا تهیه شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر آب به محیط کشت مایع SWB تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری، نمونه‌های غنی شده به محیط کشت آگاردار SWA (شامل محیط کشت SWB به همراه ۱/۵ درصد آگار) منتقل شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس، در اتاق تاریک بررسی شد و کلونی‌های نورافشان، به محیط کشت تازه SWA منتقل شد تا کشت خالصی از باکتری‌ها، تهیه شود (Quinto, 2001).

شناسایی جدایه‌ها

ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌های نورافشان روی محیط کشت آگاردار SWA بررسی شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم، شکل باکتری‌ها و واکنش گرم آنها مطالعه شد. فعالیت کاتالازی و اکسیدازی، تولید اندول،

مصرف گلوکز از مسیر تخمیر اسیدهای مخلوط (methyl red test) یا مسیر تخمیر بوتاندیول (voges-proskauer test) و حرکت باکتری‌ها مطابق جدول‌های شناسایی کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی، بررسی گردید (Brenner *et al*., 2004). تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد.

استخراج نوکلئیک‌اسید

برای بررسی مولکولی باکتری‌های جدا شده، DNA ژنومی با روش استاندارد استخراج شد. ابتدا دیواره سلولی باکتری‌ها با هگزادسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB) متلاشی شد. سپس، از محلول فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) برای حذف پروتئین‌ها و قندها استفاده شد. برای رسوب نوکلئیک‌اسید از محلول نمکی پلی اتیلن گلیکول و نیز برای شستشو و حذف سایر ناخالصی‌ها از اتانول خالص استفاده شد. درستی استخراج نوکلئیک‌اسید، با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد و رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برماید بررسی شد (Sambrook and Russell, 2006).

طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن *luxA* و پرایمر 16S rDNA

برای طراحی پرایمرهای اختصاصی، توالی ژن *luxA* باکتری‌های نورافشان از بانک اطلاعاتی NCBI تهیه شد و با نرم‌افزار ClustalX درخت دندروگرام ژن *luxA* رسم شد. سپس، به کمک نتایج هم‌ردیف‌سازی (alignment) ژن‌ها در نرم‌افزار ClustalW، توالی پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. صحت توالی پرایمرها با نرم‌افزار Gene Runner تأیید شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ خلاصه شده است. همچنین، برای تکثیر ژن 16S rDNA، از پرایمرهای عمومی PA و PH استفاده شد (Edwards *et al*., 1989).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *luxA* و 16S rDNA

ژنوم باکتری‌های نورافشان جدا شده، با سه گروه پرایمر اختصاصی طراحی شده (جدول ۱) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد. از سه برنامه جداگانه برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مطابق برنامه زیر استفاده شد:

دمای دناتوراسیون اولیه، ۹۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه بود. سپس ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، یک دقیقه دمای اتصال پرایمر بسته به نوع پرایمر اختصاصی (جدول ۱) و یک دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت، برای تکمیل واکنش ساخت DNA دما به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد نگه داشته شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن 16S rDNA نیز برای چهار باکتری جدا شده متعلق به جنس *Photobacterium* مطابق برنامه زیر انجام شد (Edwards *et al*., 1989):

دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۵ دقیقه بود. سپس، ۳۵ چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۵، یک دقیقه دمای ۵۰ و یک و نیم دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. در نهایت، برای تکمیل واکنش ساخت DNA دما به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. درستی انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *luxA* و 16S rDNA با الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برماید تأیید شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای اختصاصی *luxA* و *16S rRNA* استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، F: پرایمر رفت، R: پرایمر برگشت

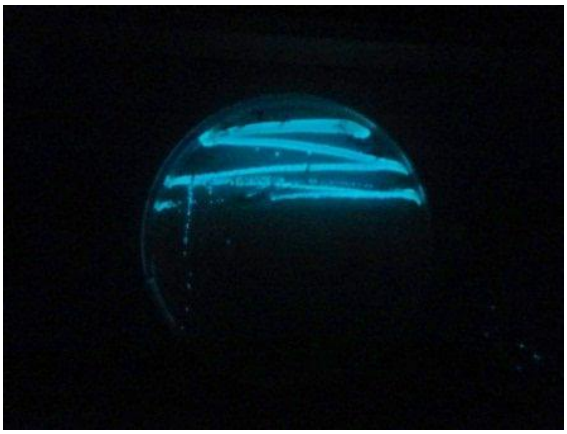
پرایمر	توالی (5′→3′)	درصد GC	دمای اتصال پرایمر (درجه سانتیگراد)	محصول PCR (bp)
luxA1-F	ATGAAGTTYGGAAATATTTG	۲۵ درصد	۵۶	۷۶۷
luxA1-R	GCATTDACATAWGAGTCATACC	۳۶ درصد		
luxA2-F	TWGGCGTTGCWTCAGAAG	۵۰ درصد	۵۶	۳۹۴
luxA2-R	CRTTKACATCTGGGAAYTC	۳۷ درصد		
luxA3-F	TGTTGGTATGACTTGATGAAAG	۳۶ درصد	۵۶/۵	۵۱۸
luxA3-R	GCGATACACTCTTCAGGC	۵۶ درصد		
PA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	۵۰ درصد	۵۶	۱۵۰۰
PH-R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	۶۰ درصد		

پس از تخلیص محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توالی ژن 16S rDNA توسط شرکت GATC آلمان تعیین شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها با نرم‌افزار Chromas مجدداً بررسی شد. شباهت توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rDNA جدایه‌های باکتریایی نورافشان با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon-e تعیین شد (Kim *et al*., 2012).

نتایج

تعداد ۹ باکتری نورافشان با محیط‌کشت اختصاصی SWB و SWA جداسازی شد. کلونی باکتری نورافشان جداشده با نور سبز-آبی (طول موج ۴۹۰ نانومتر) در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

برای شناسایی باکتری‌های نورافشان، ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از طریق بررسی کلونی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف کاتالاز، اکسیداز، تولید ایندول، حرکت و MR-VP بررسی شد. مورفولوژی کلونی جدایه‌های نورافشان به صورت کرم، شفاف، براق و نرم بود. برخی جدایه‌ها دارای رنگیزه‌های زرد و یا نارنجی بودند. برخی نیز دارای کلونی‌های کرم‌رنگ متمایل به سفید بودند. نتایج نشان داد که تمام جدایه‌ها گرم‌منفی بودند. از نظر مورفولوژی سلول باکتری‌ها، به صورت میله‌ای بلند و کوتاه، برخی کروی و نیز برخی ویبریو شکل یا خمیده بودند. ویژگی مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی برخی جدایه‌های نورافشان جدا شده در جدول ۲ خلاصه شده است.

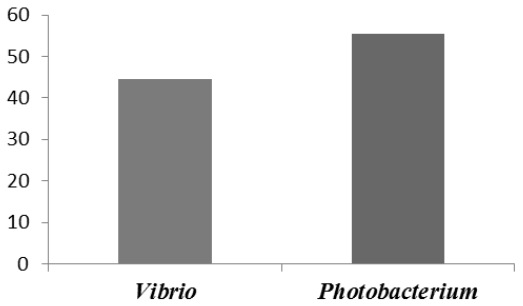


شکل ۱- کلونی باکتری نورافشان جدایه SG4 جدا شده از دریای مازندران در محیط‌کشت SWA با نور سبز-آبی

بررسی مورفولوژیکی و فیزولوژیکی جدایه‌ها نشان داد که چهار جدایه متعلق به جنس *Vibrio* و پنج جدایه متعلق به جنس *Photobacterium* است. درصد فراوانی باکتری‌های نورافشان به تفکیک جنس‌های شناسایی شده در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

جدول ۲- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی چهار جدایه نورافشان متعلق به جنس *Photobacterium* جدا شده از دریای مازندران

جدایه باکتری	مورفولوژی، واکنش گرم	آزمون‌های بیوشیمیایی						جنس احتمالی
		VP	MR	حرکت	اندول	اکسیداز	کاتالاز	
SG4	میله‌ای کوتاه، گرم منفی	−	+	−	−	−	+	*Photobacterium*
SG5	میله‌ای، گرم منفی	−	+	−	−	+	+	*Photobacterium*
SG8	کوکوئیدی، گرم منفی	−	+	−	−	+	+	*Photobacterium*
SG21	میله‌ای کوتاه، گرم منفی	−	−	−	−	+	+	*Photobacterium*



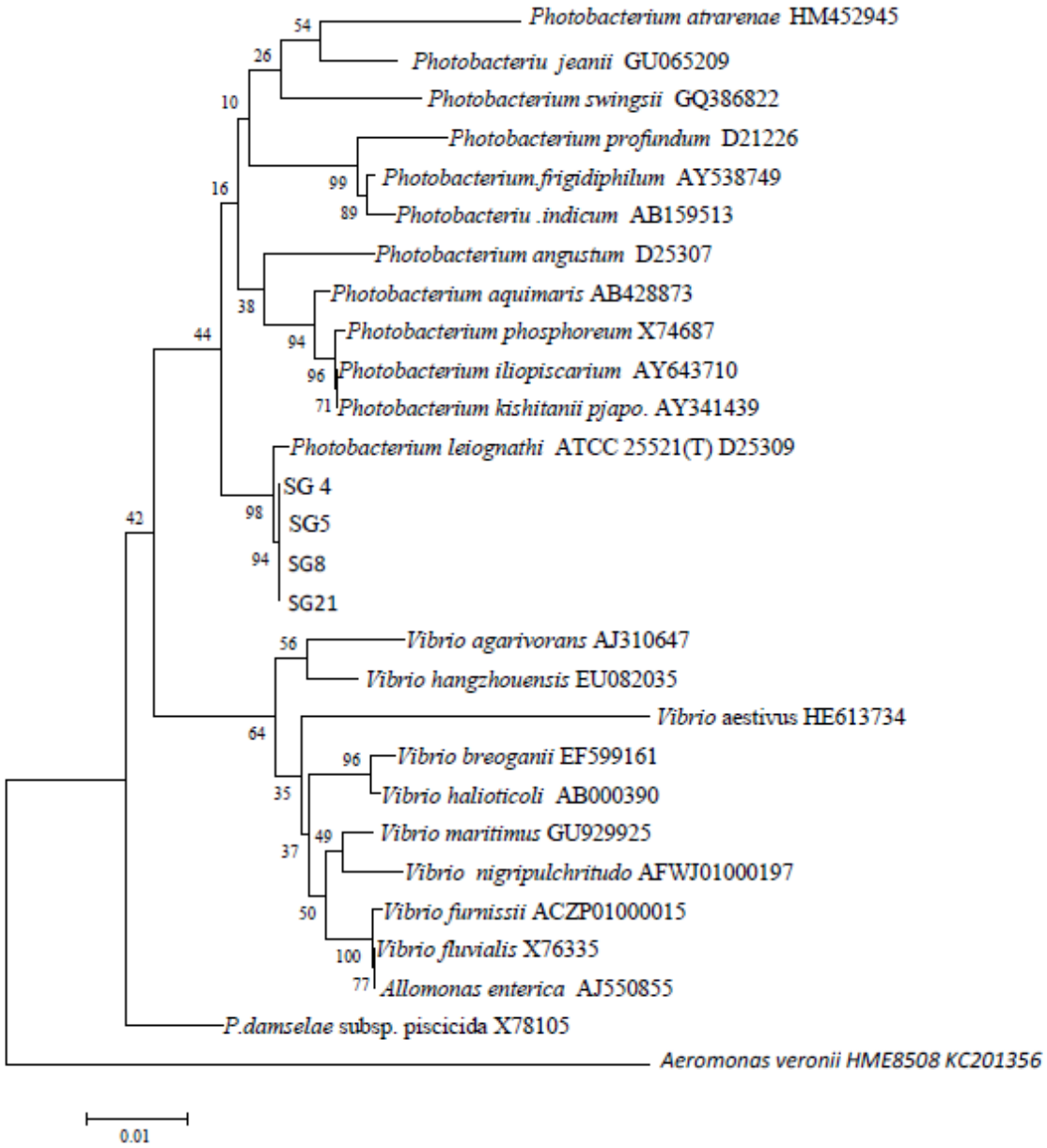
شکل ۲- درصد فراوانی باکتری‌های نورافشان جدا شده بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی

برای تأیید نتایج حاصل از صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی باکتری‌ها، توالی ژن 16S rDNA تعیین شد. به این منظور، چهار جدایه از باکتری‌های شناسایی شده به عنوان جنس *Photobacterium* (جدول ۲)، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن 16S rDNA انجام شد. پس از تعیین توالی آنها، هم‌ساختاری ژن 16S rDNA باکتری‌های نورافشان جداشده با سایرتوالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی EzTaxon-e تعیین شد.

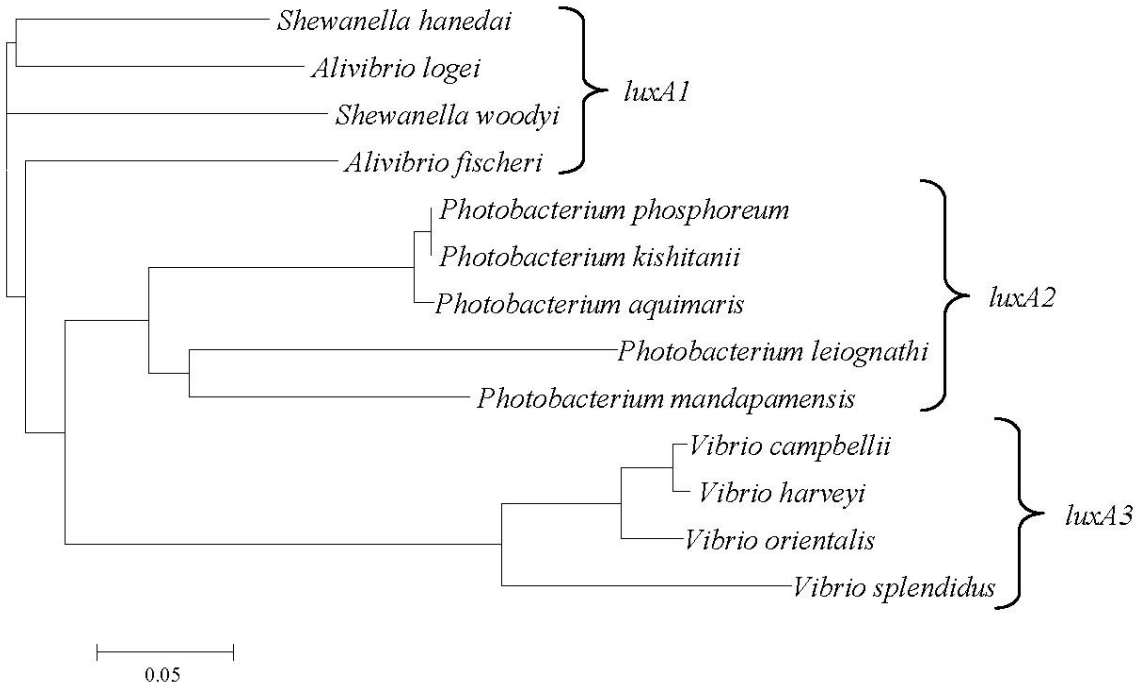
نتایج BLAST نشان داد که چهار جدایه نورافشان با ۹۹ درصد هم‌ساختاری، *P. leiognathi* هستند. توالی ژن 16S rDNA باکتری‌های مشابه با نرم‌افزار ClustalX به همراه باکتری‌های نورافشان جدا شده، هم‌ردیف‌سازی شد. درخت فیلوژنی آن با روش neighbor joining و با نرم‌افزار Mega5 رسم شد. موقعیت فیلوژنی این جدایه‌ها با *P. leiognathi* در شکل ۳ نشان داده شد.

برای بررسی مولکولی ژن *luxA*، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. بر اساس توالی ژنی *luxA* اخذ شده از بانک اطلاعاتی و بانرم‌افزارهای بیوانفورماتیک، درخت دندروگرام رسم شد. نتایج شکل ۴ نشان داد که بر اساس قرابت ژن *luxA*، باکتری‌های نورافشان در سه گروه مجزا قرار می‌گیرند. سپس، به کمک نتایج هم‌ردیف‌سازی ژن‌ها، توالی جفت پرایمرهای اختصاصی *luxA1*، *luxA2* و *luxA3* تهیه شد.

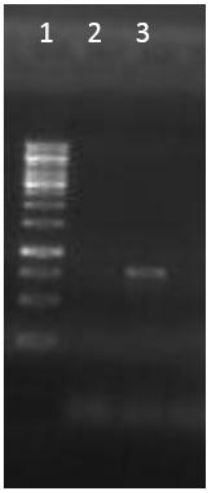
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *luxA*، به کمک پرایمرهای اختصاصی انجام شد. الکتروفورز ژل آگاروز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *luxA* باکتری *A. fischeri* (PTCC 1693) در شکل ۵ مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که پرایمر *luxA1* می‌تواند توالی ژن *Aliivibrio luxA* را شناسایی کند و باند ژن تکثیر شده (اندازه ۷۵۰ bp) در ژل آگاروز مشخص است (شکل ۵).



شکل۳- رابطه فیلوژنی جدایه‌های SG4، SG5، SG8 و SG21 بر اساس توالی ژن 16S rDNA با سایر باکتری‌های نورافشان و غیر نورافشان اخذ شده از بانک اطلاعاتی با روش neighbor joining. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری بوت‌استرپ از ۱۰۰۰ نمونه است. باکتری *Aeromonas veronii* به عنوان out group قرار داده شد.



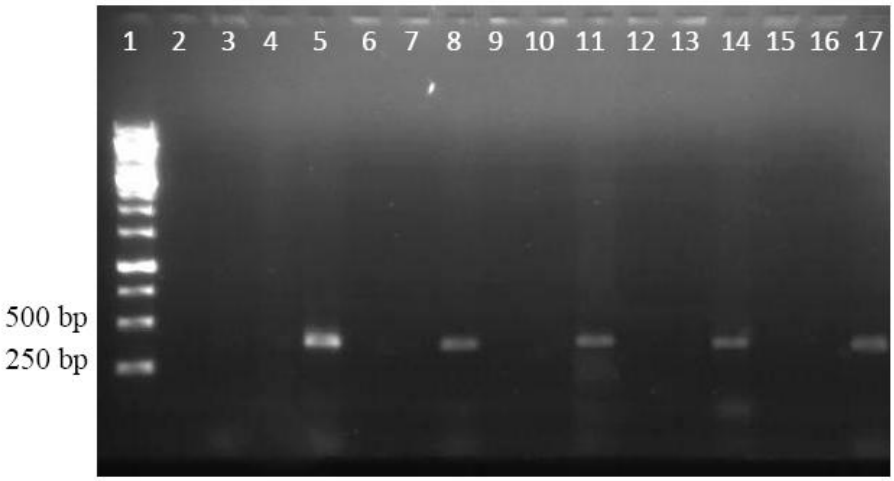
شکل ۴- گروه‌بندی باکتری‌های نورافشان بر اساس توالی ژن *luxA* به کمک رسم درخت دندروگرام



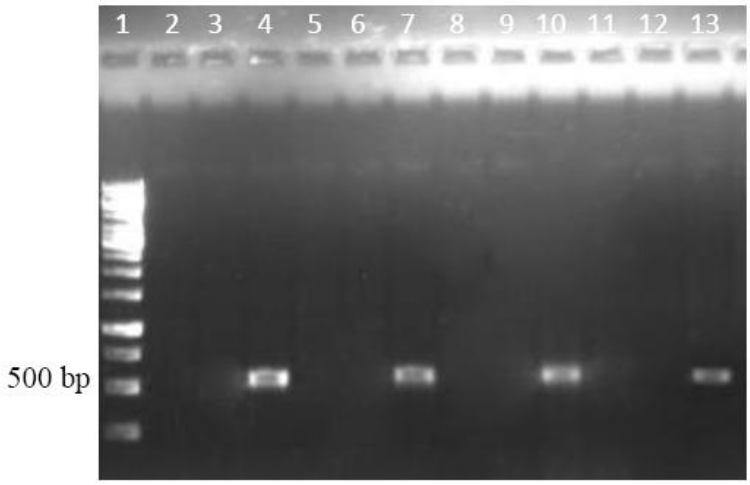
شکل ۵- الکتروفورز ژل آگاروز ژن *luxA* باکتری *A. fischeri* به کمک پرایمر *luxA1*.
ردیف ۱: خط‌کش ژنی 1kb؛ ردیف ۲: *Photobacterium* SG4؛ ردیف ۳: *A. fischeri*

همچنین، نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *luxA* جدایه‌های نورافشان متعلق به جنس *Photobacterium* (SG4، SG5، SG8، SG14 و SG21) در شکل ۶ مشاهده می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز این جدایه‌ها توسط پرایمر *luxA2* انجام شد. البته سایر پرایمرهای اختصاصی، توانایی شناسایی ژن *luxA2* گروه *Photobacterium* را نداشتند (شکل ۶).

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که ژن *luxA* جدایه‌های متعلق به جنس *Vibrio* (SG1، SG2، SG3 و SG9) توسط پرایمر اختصاصی گروه *Vibrio* (*luxA3*) تکثیر شد (شکل ۷). این نتایج نشان می‌دهد که ژن *luxA* باکتری‌های گروه‌بندی شده (شکل ۴)، فقط با پرایمرهای اختصاصی آن گروه، تکثیر می‌یابند.



شکل ۶- الکتروفورز ژل آگاروز ژن *luxA* جدایه‌های نورافشان متعلق به جنس *Photobacterium* به کمک پرایمر *luxA2*. ردیف ۱: خط‌کش ژنی 1Kb؛ ردیف ۲: واکنش منفی پلیمراز (شاهد)؛ ردیف‌های ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷: به ترتیب جدایه‌های SG4، SG5، SG8، SG14 و SG21 با پرایمر *luxA2*؛ ردیف‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲ و ۱۵: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA1*؛ ردیف‌های ۴، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA3*.



شکل ۷- الکتروفورز ژل آگاروز ژن *luxA* جدایه‌های نورافشان متعلق به جنس *Vibrio* به کمک پرایمر *luxA3*. ردیف ۱: خط‌کش ژنی 1Kb؛ ردیف‌های ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳: به ترتیب جدایه‌های SG1، SG2، SG3 و SG9 با پرایمر *luxA3*؛ ردیف‌های ۲، ۵، ۸ و ۱۱: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA1*؛ ردیف‌های ۳، ۶، ۹ و ۱۲: همان جدایه‌ها با پرایمر *luxA2*.

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نمونه‌برداری از آب دریای مازندران و از ایستگاه‌های مختلف انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد که ارتباطی مستقیم بین آزمون‌های بیوشیمیایی و تکثیر ژن *luxA* با پرایمرهای اختصاصی وجود دارد. برای تأیید بیشتر توالی‌یابی ژن 16S rDNA برای چهار جدایه از باکتری‌ها انجام شد که نتایج حاصل از آن نیز با نتایج بالا منطبق بود. بنابراین، می‌توان از نشانگرهای اختصاصی ژن *luxA*، برای تعیین جنس باکتری‌های نورافشان استفاده کرد. Nealson و همکاران (۱۹۹۳) از پروب‌های هیبریدیزاسیون ژن *luxA* برای شناسایی باکتری‌های نورافشان استفاده

کردند. تعدادی از باکتری‌ها، *V. harveyi* و برخی *V. splendidus* شناسایی شدند (Nealson *et al.*, 1993). Yoshizawa و همکاران (۲۰۰۹) نیز دو باکتری نورافشان از خلیج ساگامی ژاپن جداسازی کردند. پس از بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی باکتری‌ها، توالی ژن 16S rDNA و چند ژن خانه‌گزین و نیز ژن *luxA* را تعیین کردند. نتایج مطالعه اخیر، شباهت نزدیکتری با *P. kishitanii* را نشان داد اما ارزش هیبریداسیون DNA-DNA این جدایه‌ها با باکتری *P. kishitanii* حدود ۴۲ درصد بود. ویژگی‌های فنوتیپی این جدایه‌ها بسیار شبیه به *P. kishitanii* و *P. phosphoreum* بود ولی به دلیل اختلافات فیزیولوژیکی، *P. aquimaris* نام گرفتند (Yoshizawa *et al.*, 2009). Nawaz و Ahmed (۲۰۱۱) نیز برای انجام تحقیقات خود، با آزمون‌های بیوشیمیایی و نیز توالی‌یابی ژن 16S rDNA، گونه *V. harveyi* را شناسایی کردند. در این مطالعه حضور اپرون *lux* در باکتری‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *luxAB*، تعیین شد و با توالی‌یابی محصول آن، شباهت این ژن‌ها با ژن‌های *luxAB* سایر باکتری‌های نورافشان، بررسی شد (Nawaz and Ahmed, 2011).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که با کمک پرایمرهای اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *luxA* می‌توان برای شناسایی سریع باکتری‌های نورافشان و تعیین جنس آنها استفاده کرد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر ابوالقاسم روحی استادیار پژوهشکده اکولوژی دریای خزر که در جمع‌آوری نمونه‌ها از دریای مازندران همکاری کردند، سپاسگزاری می‌کنیم.

منابع

Alves, E., Costa, L., Cunha, A., Faustino, M. A., Neves, M. G. P. and Almeida, A. (2011) Bioluminescence and its application in the monitoring of antimicrobial photodynamic therapy. Applied Microbiology and Biotechnology 92: 1115-1128.

Ast, J. C., Urbanczyk, H. and Dunlap, P. V. (2007) Natural merodiploidy of the *lux*-rib operon of *Photobacterium leiognathi* from coAstal waters of Honshu, Japan. Journal of Bacteriology 189: 6148-6158.

Bose, J. L., Kim, U., Bartkowski, W., Gunsalus, R. P., Overley, A. M. and Lyell, N. L. (2007) Bioluminescence in *Vibrio fischeri* is controlled by the redox responsive regulator ArcA. Molecular Microbiology 65: 538-553.

Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (2004) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition, vol. 2, Springer, New York.

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. and Bottger, E. C. (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research 17: 7843-7853.

Haddock, S. H., Moline, M. A. and Case, J. F. (2010) Bioluminescence in the sea. Marine Science 2: 443-493.

Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database

with phylotypes that represent uncultured species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 62: 716-721.

Milburn, B. (2012) The function of cyclo (Phe-Pro) in gene expression of *Vibrio harveyi*. MSc thesis, Florida International University, Florida, USA.

Nawaz, A. and Ahmed, N. (2011) Isolation and characterization of indigenous luminescent marine bacteria from Karachi coAst. Academic Research International 1: 74-83.

Nealson, K. H., Wimpee, B. and Wimpee, C. (1993) Identification of *Vibrio splendidus* as a member of the planktonic luminous bacteria from the Persian Gulf and Kuwait region with *luxA* probes. Applied and Environmental Microbiology 59: 2684-2689.

Quinto, E. A. (2001) A simple water toxicity test using *Photobcicterium leiognathi*. Journal of Biological Education 35: 89-92.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2006) The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Yoshizawa, S., Wada, M., Kita-Tsukamoto, K., Yokota, A. and Kogure, K. (2009) *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59: 1438-1442.

Molecular investigation of *luxA* gene to identify luminescent bacteria in Caspian sea

Mojtaba Mohseni * and Mohaddeseh Salehghamari

Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Abstract

Bioluminescence is a chemical reaction that causes light emission in the living organisms. Luminous bacteria are the most abundant bioluminescent organisms in natural environments. Biochemical tests are used for identification of luminous bacteria. However, molecular characterization of *luxA* gene could be suitable for investigation of luminescent bacteria due to differences in the sequences. In this study, the results of identification of luminescent bacteria were compared to the results of biochemical tests and PCR amplification of *luxA* using designed specific primers. In addition, thr results were confirmed by sequencing of 16S rDNA gene in the isolated luminescent bacteria. Samples of sea water were collected from several locations of southern shores of the Caspian sea. Luminous bacteria were isolated using specific cultures SWB and SWA. Then, morphological and physiological characterization of the isolates was identified. Specific primers for amplification of *luxA* were designed and synthesized after classification of luminescent bacteria according to the sequence of *luxA*. Polymerase chain reaction for *luxA* and 16S rDNA genes was performed after nucleic acid extraction of bacteria. Sequencing of 16S rDNA gene was obtained and then phylogenetic tree was constructed. Nine strains of luminescent bacteria were isolated from the Caspian sea. According to the results of biochemical tests, 5 strains belonged to the *Photobacterium* genus and 4 strains belonged to the *Vibrio* genus. Also, *luxA* PCR amplification of *Aliivibrio*, *Photobacterium* and *Vibrio* was done in order to specify primers *luxA1*, *luxA2* and *luxA3*, respectively. In addition, BLAST subroutine of the 16S rDNA sequences revealed that the isolates were most similar to *Photobacterium leiognathi* with 99% homology. Results of isolates determination are according to the biochemical tests, molecular investigation of PCR *luxA* using specific primer and 16S rDNA analyses was correspondent. Therefore, the specific primer of *luxA* could be used for preliminary determination of luminescent bacteria.

Key words: Luminous bacteria, Bioluminescence, Caspian sea, *luxA*

* m.mohseni@umz.ac.ir