مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۴، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۲۴-۱۱

همسانه‌سازي و بررسي ويژگي‌هاي ژن *RGT2* از سويه ايراني مخمر نان

Cloning and investigation of *RGT2* gene charecteristics from an Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*

سولماز عزیزی[۱]، علیرضا تاری نژاد*[۲]

Azizi[1] S. and A.R. Tarinejad*[2]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی،
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،
دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

[1]MSc. in Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, *Tabriz, Iran.*
[2]Department of agriculture Biotechnology, Faculty of agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: atarinejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۱۲)

چکیده

مخمر *Saccharomyces cerevisiae* دارای ۲۰ ژن کدکننده پروتئین‌های انتقال‌دهنده هگزوز است که شامل *HXT1-HXT17*، *GAL2*، *SNF3* و *RGT2* می‌باشد. دو ژن *SNF3* و *RGT2* به عنوان حسگر گلوکز عمل کرده و ژن‌های*HXT1-HXT17* در انتقال مستقیم گلوکز نقش دارند. پژوهشگران 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 *RGT2* یا *Restores Glucose Transport2* از ژنوم مخمر *S. cerevisiae* از طریق PCR و همسانه‌سازی آن در پلاسمید دارای پیشبر بیانی مناسب به منظور پایه‌ای برای طراحی پلاسمید بیانی و در نهایت مخمر نوترکیب بود. در این تحقیق پس از تهیه آغازگرهای اختصاصی، ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر شد و واکنش لیگاسیون بین قطعه تکثیر یافته و پلاسمید pGEM-T انجام و کلونی‌های ترانسفورم شده از طریق سیستم گزینش آبی- سفید شناسایی شدند و در نهایت برای تایید نهایی قطعات همسانه شده، پلاسمیدهای نوترکیب به توالی‌یابی فرستاده شدند. بررسی نرم‌افزاری نشان داد که این ژن پروتئینی با وزن مولکولی۸۳/۱۷۳ کیلودالتون را کد کرده و دارای ۷۶۳ اسیدآمینه بوده و نقطه ایزوالکتریک آن ۵/۶۸ می‌باشد. در ادامه، ژن *RGT2* از طریق محل‌های برش آنزیمی *Pst*I و *Nco*I در پلاسمید pGBKT7 همسانه‌سازی شد. توالی پروتئینی بدست آمده شباهت زیادی با RGT2p سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* موجود در NCBI از جمله سویه P301 (۱۰۰ درصد تشابه) نشان داده و بررسی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از سایر ژن‌های خانواده انتقال‌دهنده‌های هگزوز نشان داد که *RGT2* بیشترین ارتباط و شباهت را با *SNF3* دارد. با جداسازی و همسانه سازی و تعیین ویژگی و در نهایت انتقال این ژن به مخمر می‌توان میزان تولید اتانول را طی تخمیر الکلی افزایش داد.

واژه‌های کلیدی

پلاسمید نوترکیب
RGT2
مخمر
S. cerevisiae
همسانه‌سازی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

مقدمه

سیاست‌های جهانی، به ویژه در کشورهای توسعه یافته‌ای که با کمبود منابع انرژی روبرو هستند، سبب شده تا توجه خاصی را به منابع انرژی تجدیدپذیر معطوف نمایند. یکی از مهمترین این منابع انرژی، سوخت‌های زیستی (Biofuel) هستند. طی سالهای اخیر، برنامه‌های بلندمدتی برای تولید و استفاده از سوخت‌های زیستی در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، به ویژه در صنعت حمل و نقل تهیه شده است (De Bari *et al.* 2013). قسمت اصلی سوخت‌های زیستی که امروزه در جهان تولید می‌شود، زیست سوخت و اتانول زیستی است. در حال حاضر اتانول به صورت مخلوط با بنزین برای افزایش عدد اکتان و یا به صورت خالص به عنوان سوخت استفاده می‌شود. پیش‌بینی می‌شود، تولیدات جهانی اتانول زیستی تا پایان سال ۲۰۱۶ به بیش از ۹۵ میلیارد لیتر برسد (Lee *et al.* 2011).

اتانول زیستی طی فرایندهای تخمیر مواد قندی حاصل می‌شود. تخمیر یک فرآیند بیولوژیک است که طی آن مخمر به عنوان یک کاتالیزور زنده باعث تبدیل کربوهیدراتها به اتانول و CO_2 می‌شود (Singh and Bishnoi 2012). در سالهای گذشته پژوهش‌های گسترده در مورد کاربرد مخمرها برای تولید اتانول انجام شده است. امروزه از روش‌های مختلف مولکولی نظیر روش همسانه‌سازی در ایجاد سویه‌های *S. cerevisiae* جهت بهبود راندمان تولید الکلی طی فرآیند تخمیر الکلی استفاده می‌شود (Rossi *et al.* 2010; Gutierrez-Lomeli *et al.* 2008). یکی از مهمترین روش‌ها کاربرد روش DNAی نوترکیب است که در سال ۱۹۹۳ توسط Barre و در سال ۱۹۹۸ توسط Dequin و Blonding معرفی و وارد عرصه رقابت با سایر روش‌های ژنتیک مولکولی شد (Pretorius *et al.* 2003).

بررسی‌ها نشان می‌دهد فرآورده نهایی سوخت و ساز هگزوزها از جمله گلوکز، فروکتوز و مانوز در *S. cerevisiae* در شرایط بی‌هوازی اتانول یا اسیدلاکتیک است و اولین مرحله تنظیمی سوخت و ساز هگزوزها عبور آنها از طریق انتشار تسهیل شده و وابسته به پروتئین‌های انتقال دهنده غشایی می‌باشد. بر طبق اطلاعات موجود خانواده انتقال دهنده هگزوزها در این گونه مخمر شامل پروتئین‌های Hxt1p-Hxt17p، Gal2p، Snf3p و Rgt2p می‌باشد. با افزایش فعالیت این انتقال دهنده‌ها، تجمع اتانول یا اسید لاکتیک در سلولها بیشتر می‌شود (Guillaume *et al.* 2007). انتقال دهنده‌های Hxt1 تا Hxt17 در انتقال گلوکز نقش دارند، Gal2 برای انتقال گالاکتوز، *SNF3* و *RGT2* به عنوان حسگر گلوکز عمل می‌کنند. این خانواده ژنی الگوی بیان متفاوتی داشته و تنظیم آنها به شدت تحت ویژگی قدرت جذب (kinitec) انتقال دهنده‌ها می‌باشد و گلوکز اولین فاکتور کنترل کننده بیان این ژن‌ها می‌باشد (Ozcan and Johnston 1999; Perez *et al.* 2005). بیان این خانواده ژنی در مخمرها مورد مطالعه قرار گرفته و تولید اتانول در سویه وحشی مخمر با سویه مهندسی شده مقایسه شده است. داده‌های بدست آمده نشان دادند که تظاهر بیش از حد این انتقال دهنده‌ها منجر به افزایش دریافت گلوکز می شود و با تنظیم کردن اولین مرحله مسیر بیوسنتز گلوکز می‌توان منجر به تجمع اسیدلاکتیک شد که یک افزایشی در حدود ۱۵٪ در تولید اتانول در مقایسه با سویه وحشی مشاهده شد (Gutierrez-Lomeli *et al.* 2008; Rossi *et al.* 2010).

پیام‌رسانی گلوکز بوسیله حسگرهای *SNF3* و *RGT2* آغاز می‌شود. در این مسیر مهارکننده (Repressor) رونویسی Rgt1 نقش مهمی دارد. در غیاب گلوکز این مهارکننده به پیشبر ژنهای *HXT* متصل و از رونویسی این ژن‌ها بویسیله یکسری مهارکننده دیگر از جمله Cyc8، Tup1، Mth1 و Std1 جلوگیری می‌کند (Lakshmanan *et al.* 2003). زمانی که گلوکز در محیط وجود دارد به حسگرهای *SNF3* و *RGT2* متصل و منجر به فسفریلاسیون Mth1 و Std1 بوسیله (Yeast casein kinase) Yck1/2 مخمری می‌شود. سپس Mth1 و Std1 در کمپلکس (SCF^{Gr1}-ubiquitin-Ligase) یوبی‌کوئیتینه شده و در نهایت در 26S پروتئازوم تخریب و تجزیه می‌شوند (شکل ۱). از طرفی pKA (protein kinase A) باعث فسفریلاسیون Rgt1 شده و در نتیجه آن Rgt1 فسفریله شده از پیشبر ژنها جدا و رونویسی ژنهای *HXT* صورت می‌گیرد (Kim *et al.* 2003).

میزان حضور این دو حسگر در غشای پلاسمایی از طریق اندوسیتوز و انتقال آنها به واکوئل سلول و در نهایت تخریب و

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

تجزیه در این اندامک سلولی کنترل می‌شود. با توجه به این مطلب *RGT2* میل ترکیبی کمی با گلوکز دارد و زمانی که میزان گلوکز در محیط بالاست، در سطح سلول پایدار می‌ماند و سیگنالینگ گلوکز از طریق آن صورت می‌گیرد. در حالی که *SNF3* میل ترکیبی زیادی با گلوکز دارد و زمانی که میزان گلوکز در محیط پایین است، پایدار می‌ماند. بنابراین یافته‌های جدید نشان می‌دهد گلوکز موجود در محیط و غلظت آن، سطح حسگرها را در غشای پلاسمایی مشخص می‌کند (Roy and Kim 2014). *RGT2* با ۷۳ درصد تشابه با *SNF3* حدود ۱۰۰kb پایین‌دست *SNF3* روی کروموزوم IV قرار دارد (Wolfl *et al.* 1996).

هدف این تحقیق همسانه‌سازی ژن *RGT2* در داخل پلاسمید pGEM-T و بررسی آن از نظر ترادف ژنی و آمینواسیدی می‌باشد. بعد از تایید صحت توالی، ژن مورد نظر با آنزیم برشی متناسب با پلاسمید بیانیpGBKT7 برش داده شد و جهت افزایش راندمان تولید اتانول در پلاسمید بیانی مخمر همسانه‌سازی شد. همچنین ویژگی‌های فیزیکی‌وشیمیایی توالی پروتئینی بدست 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

سویه مخمر *S. cerevisiae* سویه ایرانی بوده که در نانوایی و شیرینی‌پزی استفاده می‌شود و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. نژاد Top10 باکتری *Escherichia coli*، مارکر VC 1kb DNA Ladder و آنزیم و بافر T4 DNA ligase شرکت Vivantis، PCR Master Mix شرکت سیناژن، سیستم pGEM-T Vector شرکت Promega و پلاسمید pGBKT7 شرکت Clontech، آنزیم‌های برشی از شرکت سیناژن، آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین، کانامایسین و آغازگرهای

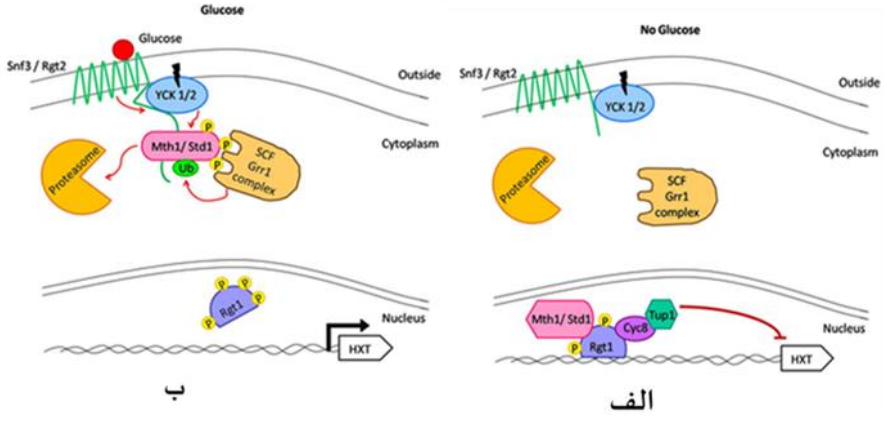
F_{ext}: 5’-**ATG**AACGATAGCCAAAACTG

F_{int}: 5´-TCATTTCCAGTTATCAGTGG

R_{int}: 5´-CAACTTTCCAGCGTTCTTGA

R_{ext}:5’-**TTA**TTGGGGGGAAGTGTATTG

استفاده شد. محیط کشت اختصاصی YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) حاوی دکستروز، پپتون و عصاره مخمر از شرکت Merck آلمان تهیه شده بود.



شکل ۱- الف- مسیر سیگنالینگ *SNF3*/*RGT2* در غیاب گلوکز. ب- مسیر سیگنالینگ *SNF3*/*RGT2* در حضور گلوکز (Gancedo 2008).

Figure 1- *SNF3*/*RGT2* signaling pathway in the absence of glucose (A), and in the presence of glucose (B)

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

pGEM-T یک پلاسمید خطی با T منفرد آویزان انتهایی در انتهاهای ´۳ است که به این شکل از حلقوی شدن پلاسمید جلوگیری کرده و کارایی واکنش لیگاسیون را با محصول PCR تکثیرشده با DNA پلیمرازهای معین مقاوم به حرارت که یک A به انتهاهای ´۵ آنها اضافه می‌کنند، افزایش می‌دهد. این پلاسمید شامل پیشبرهای T7 و SP6 آر ان ای پلیمراز در طرفین ناحیه سایت‌های برشی است. ناحیه سایت‌های برشی آن هم در داخل ناحیه کدکننده α–پپتید آنزیم β- گالاکتوزیداز واقع شده است (شکل ۲ الف).

پلاسمید pGBKT7 یک پلاسمید بیانی، حاوی توالی کدکننده دمین اتصال به DNA فاکتور رونویسی GAL4 (Galactose) مخمری و پیشبر ADHL (Alcohol dehydrogenase) است. این وکتور دارای چندین سایت برشی اختصاصی برای همسانه‌سازی بوده و امکان بیان در *E.coli* و *S.cerevisiae* را دارد. پلاسمید pGBKT7 حاوی ژن مقاومت به کانامایسین برای گزینش در محیط کشت *E.coli* و ژن TRP (Tryptophan) برای گزینش در محیط کشت مخمر می‌باشد (شکل ۲ ب).

کشت مخمر *S. cerevisiae*

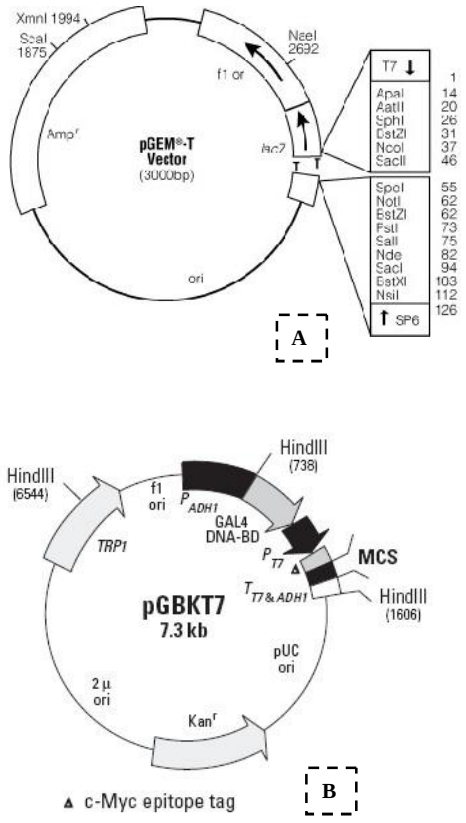
پس از کشت مخمر در محیط اختصاصی YPD حاوی ۱۰g دکستروز، ۲۰g پپتون، ۱۰g عصاره مخمر و ۱۵g آگار و رشد کلونی‌ها، تک کلونی‌ها با استفاده از لوپ به محیط کشت مایع منتقل و به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور در دمای $30^{\circ C}$ قرار داده و جهت استخراج DNA ژنومی استفاده شد.

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 (Harju *et al.* 2004) که حاوی 2% Triton X-100، 1%SDS، 100 mM NACL، 10 mM Tris-Hcl(pH 8.0) ، 1 mM EDTA است اضافه شد. میکروتیوب‌ها دو دقیقه در اتانول مطلق سرد و یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، این مرحله تکرار و ورتکس شد در ادامه با افزودن کلروفرم، ورتکس و سانتریفیوژ، فاز بالایی به تیوب جدید منتقل، و بر روی آن اتانول مطلق اضافه و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، در نهایت DNA مخمر با استفاده از روش‌های رسوب و خالص‌سازی اسیدنوکلئیک خالص شده و در ۵۰-۲۵ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز و خالص سازی محصول تکثیری

ابتدا آغازگرهای مناسب به منظور جداسازی ژن *RGT2* با استفاده از توالی موجود در NCBI با کد دسترسی (NM: 001180198.1) طراحی شدند. به دلیل طولانی بودن اندازه ژن از دو آغازگر رفت و برگشت داخلی برای توالی‌یابی کامل ژن استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر ژن مورد نظر از روی DNA و برای اثبات حضور ژن در وکتورها مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۲- شمایی از پلاسمیدهایی که در همسانه‌سازی ژن *RGT2* بکار گرفته شد: (الف) پلاسمید پایه pGEM-T برای همسانه‌سازی اولیه (ب) پلاسمید بیانی pGBKT7

Figure 2- The schematic map of vectors used for cloning of *RGT2* gene: (A) pGEM-T vector for primary cloning (B) pGBKT7 expression vector.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

برای تهیه ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR، ۴µl Master mix (5x)، ۲µl آغازگر رفت، ۲µl آغازگر برگشت و ۵۰ نانوگرم DNA، به ۱۴/۶µl آب مقطر استریل اضافه شد. برنامه استاندارد PCR شامل مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه مرحله تکثیر که شامل ۳۵ چرخه و هر چرخه شامل ۶۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ ثانیه دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۸۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله پایانی شامل ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نیمی از محصول تکثیری PCR روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد تا باندهای تکثیر شده، بررسی شوند. پس از آنکه باند مورد نظر مشاهده شد، باقی مانده فرآورده تکثیری PCR تایید شده خالص سازی و رسوب داده شد.

همسانه سازی در پلاسمید pGEM-T

برای اتصال دو قطعه‌ی DNA، مواد لازم برای ۱۰µl واکنش لیگاسیون شامل ۳۰۰ng–۱۰۰ (۵µl/.) پلاسمید pGEM -T، ژن *RGT2* (فرآورده تکثیری PCR خالص‌سازی شده) به نسبت ۳ برابر پلاسمید (۹۰۰ng یا ۱/۵µl)، (۵µl) بافر T4-DNA ligase×۲، ۵ واحد آنزیم T4-DNA ligase (۵µl/.) و ۲/۵µl آب مقطر استریل در تیوب استریل ۵ ml/. ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (رحیمی اسفنجانی و تاری نژاد ۲۰۱۳).

ترانسفورماسیون سلولهای باکتریایی به روش شوک حرارتی (Heat-shock)

برای ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی، ابتدا سلولهای مستعد باکتری از فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد و محصول واکنش لیگاسیون از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده و به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفتند، سپس نصف محصول واکنش لیگاسیون (۵µl) به روی ۵۰µl سلول مستعد *Escherichia coli* اضافه و به آرامی مخلوط شدند و به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها ۴۲ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند و به سرعت ۲ دقیقه به روی یخ منتقل شدند. در ادامه ۸۵۰ میکرولیتر محیط کشت LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک به نمونه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت با سرعت ۱۸۰rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار قرارگرفتند. در نهایت حدود ۲۰۰-۲۰ µl از سلولهای باکتریایی ترانسفورم شده، روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب و X-Gal و IPTG کشت شدند و به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس کلونی‌های سفید رنگ با انجام PCR روی آنها تایید شدند و با استفاده از روش استخراج پلاسمید که به اختصار Miniprep نامیده می‌شود، مورد استخراج پلاسمید قرارگرفتند (رحیمی اسفنجانی و تاری نژاد ۲۰۱۳). با انجام PCR دیگری روی پلاسمیدهای استخراج شده و تایید آنها، برای توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی کره‌جنوبی ارسال شدند.

همسانه‌سازی در پلاسمید pGBKT7

پلاسمید pGEM-T (شکل ۲ الف) و ژن *RGT2* موجود در آن با آنزیم‌های برشی *Pst*I و *Nco*I برش یافته و روی ژل آگارز با نقطه‌ی ذوب پایین (Low Melting Point Agarose) الکتروفورز و بررسی شد (سایت‌های برشی *Pst*I و *Nco*I در طرفین MCS پلاسمید pGEM-T قرار داشت)، باند مربوط به ژن از ژل جداسازی و خالص سازی شد. اتصال و لیگاسیون ژن *RGT2* با پلاسمید pGBKT7 (شکل ۲ ب) که توسط دو آنزیم برشی *Pst*I و *Nco*I خطی شده بود، انجام و در نهایت پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد *Top10* انتقال یافت و در مرحله بعد باکتری‌ها روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین گزینش شدند. در ادامه تعدادی کلونی به عنوان کلونی‌های نوترکیب انتخاب و با انجام PCR روی آنها تایید شدند. در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب انجام گرفته و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی توالی

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtParam و ProtScale تعیین گردید. توالی اسیدآمینه‌ای به دست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه pBLAST مرکز ملی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* 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 Rgt2p و انواع ژن‌هایی انتقال دهنده هگزوز با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 انجام شد. توالی‌های پروتئینی از سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* که برای تهیه همردیف‌سازی چندگانه مورد استفاده قرار گرفتند به همراه شماره دستیابی در جدول (۱) ذکر شده‌اند.

جدول ۱- شباهت توالی اسیدآمینه‌ای Rgt2p با سایر توالی‌های اسیدآمینه‌ای آن در سویه‌های دیگر مخمر

Table 1- Amino acid similarity of obtained Rgt2p with other amino acid sequences in different yeast strains

شماره دستیابی Acc. number	نام اختصاصی ژن gene	نام سویه Yeast strain	درصد تشابه Similarity	درصد یکسانی Identity
CAY78369.1	Rgt2p	Saccharomyces cerevisiae EC1118	99	99
ED708408.1	Rgt2p	S. c P301	100	99
EHN08207.1	Rgt2p	S. c x S kudriavzevii VIN7	99	99
EEU08513.1	Rgt2p	S. c JAY291	99	99
NP 010143.1	Rgt2p	S. c S288c	99	99
EWG86946.1	Rgt2p	S. c R008	99	99
GAA22109.1	Rgt2p	S. c Kyokai no. 7	99	99
EGA59412.1	Rgt2p	S. c FostersB	99	99
EHN033394.1	Rgt2p	S. c x S kudriavzevii VIN7	87	99
EGA79645.1	Rgt2p	S. c Vin 13	99	76
EEU05315.1	Snf3p	S. c JAY291	64	89
EWG91618.1	Snf3p	S. c P301	64	89
GAA22058.1	Snf3p	S. c Kyokai no. 7	64	89

نتایج و بحث

تکثیر ژن *RGT2*

پس از استخراج DNA ژنومی مخمر، ژن *RGT2* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در دستگاه PCR تکثیر شد. محصول PCR یک باند ۲۲۹۲ جفت بازی روی ژل آگارز بود که با ژن *RGT2* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مطابقت داشت (شکل ۳).

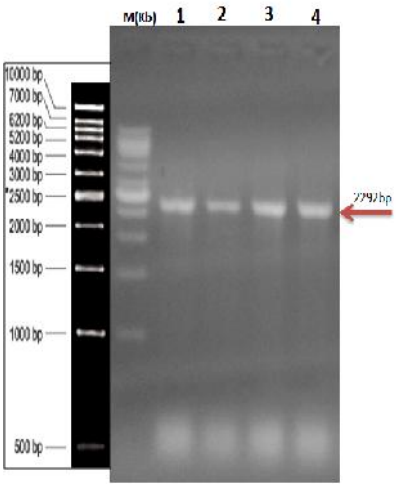
همسانه‌سازی DNA تکثیر شده در پلاسمید pGEM-T

DNA تکثیر شده از واکنش PCR برای ژن *RGT2* پس از خالص سازی از روی باقی مانده محصول PCR در وکتور pGEM-T همسانه سازی شد. در این وکتور غیرفعال شدن α–پپتید با وارد شدن DNA الحاقی، اجازه شناسایی نوترکیب‌ها (کلونی‌های سفید) را از طریق غربالگری سفید–آبی می‌دهد. با استناد به این ویژگی پلاسمید، تعدادی از کلونی‌های نوترکیب (سفید) انتخاب و درستی واکنش لیگاسیون با PCR روی آن کلونی‌ها تایید شد (شکل ۴).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

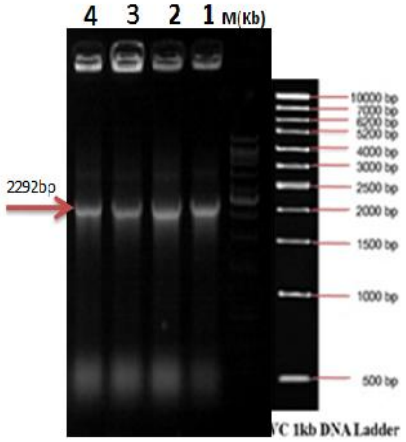
مراحل تایید کلونی‌ها برای حضور ژن پس از تراریزش *E. coli* با پلاسمید pGEM-T+ RGT2

با توجه به اینکه توالی‌یابی قطعه DNA همسانه‌سازی شده برای ژن *RGT2* هنوز مشخص نشده بود، بنابراین تعدادی از کلونی‌های رشد کرده پس از واکنش تراریزش با پلاسمید pGEM-T+ RGT2 برای تایید وجود قطعه کلون شده در سه مرحله آزمایش شدند. بدین ترتیب که ابتدا کلونی‌های انتخاب شده به روش PCR و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در همسانه‌سازی، مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۴). در مرحله دوم، تعدادی از کلونی‌هایی که در PCR مثبت بودند برای استخراج پلاسمید انتخاب شدند. پس از استخراج پلاسمید، PCR دیگری روی DNA پلاسمید استخراج شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی استفاده شده در همسانه‌سازی انجام شد (شکل ۵). در نهایت برش آنزیمی پلاسمید pGEM-T+RGT2 با دو آنزیم برشی *Pst*I و *Nco*I که در دو طرف سایت برش اختصاصی قرار دارند انجام شد. نتیجه این واکنش نشان داد که قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۲۲۹۲ جفت باز در این پلاسمید همسانه‌سازی شده است (شکل ۶).



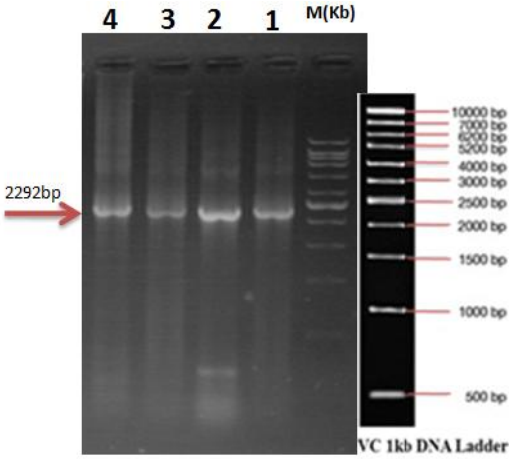
شکل۳- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNA ژن *RGT2* با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، باند ۲۲۹۲ جفت بازی که با اندازه مورد انتظار مطابقت داشت.۱ ، ۲، ۳ و ۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر ۱kb.

Figure 3- Electrophoresis of PCR product resulting from RGT2 gene amplification with specific designed primers, 2292bp band Corresponds to expected size. 1, 2, 3, 4 are four independent replications. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.



شکل۴- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از کلونی‌های نوترکیب رشد کرده روی محیط انتخابی پس از تراریزش با محصول لیگاسیون با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *RGT2*، مشاهده باند ۲۲۹۲bp حضور قطعه همسانه‌سازی شده در کلونی ها را تایید می کند. ۱، ۲، ۳ و۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر.

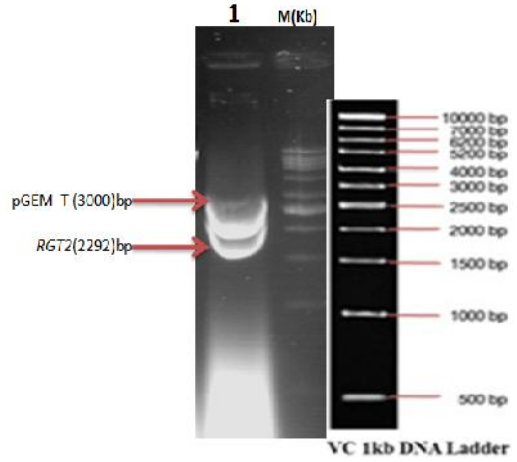
Figure 4- Electrophoresis of PCR product by using specific primers of *RGT2* gene on recombinant colonies after transformation with ligation product and growing on selectable media, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned vector into colonies. 1, 2, 3, 4 are four independent replications. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.



شکل۵- تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن *RGT2*، مشاهده‌ی باند ۲۲۹۲bp حضور قطعه همسانه‌سازی شده در کلونیها را تایید می کند. ۱، ۲، ۳ و۴ چهار تکرار مستقل هستند. M(Kb) مارکر.

Figure 5- Electrophoresis of PCR product by using specific primers of *RGT2* gene on extracted recombinant plasmid, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned fragment into colonies. 1, 2, 3, 4 are four independent replications. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

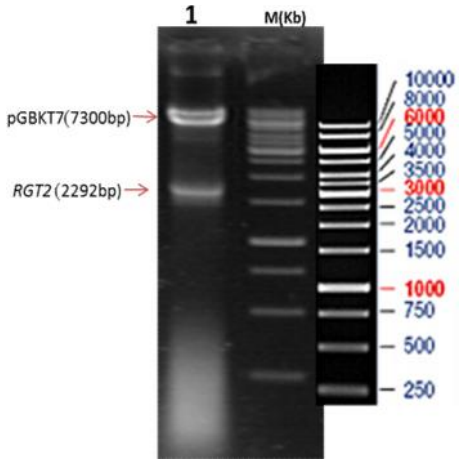


شکل۶- تصویر الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب استخراج شده با آنزیم‌های برشی *PstI* و *NcoI*. مشاهده باند ۲۲۹۲bp حضور قطعه همسانه‌سازی شده را تایید می کند. M(Kb) مارکر.

Figure 6- Electrophoresis of recombinant plasmid digested with *PstI* and *NcoI* restriction enzymes, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned fragment. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.

.

بنابراین، تعداد چهار عدد از نمونه‌های DNA پلاسمید حاصل برای تعیین توالی به مرکز توالی‌یابی ارسال شد. نتایج توالی یابی با دو آغازگر T7 و SP6 برای ژن *RGT2* بر روی پلاسمید pGEM-T نمایانگر این بود که موقعیت قرارگیری آن روی سایت برشی اختصاصی (MCS) پلاسمید در جهت معمولی می‌باشد و کدون آغاز ATG در سمت T7 قرار دارد و یک پروتئین با ۷۶۳ اسیدآمینه را رمز می‌نماید. در ادامه این ژن با استفاده از سایت‌های برشی *PstI* و *NcoI* در پلاسمید pGBKT7 همسانه‌سازی شد. برای تایید قطعه همسانه‌سازی شده از برش آنزیمی با دو آنزیم برشی *PstI* و *NcoI* که در دو طرف MCS پلاسمید pGBKT7 قرار دارد استفاده شد (شکل ۷). بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش‌بینی شده پروتئین Rgt2p با فرمول مولکولی $C_{3737}H_{5805}N_{97701126}S_{23}$، به ترتیب برابر ۸۳/۱۷۳ کیلودالتون و ۵/۶۸ بوده و شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۶/۳۹ می باشد که در رسته پروتئین‌های پایدار تقسیم‌بندی می‌شود.

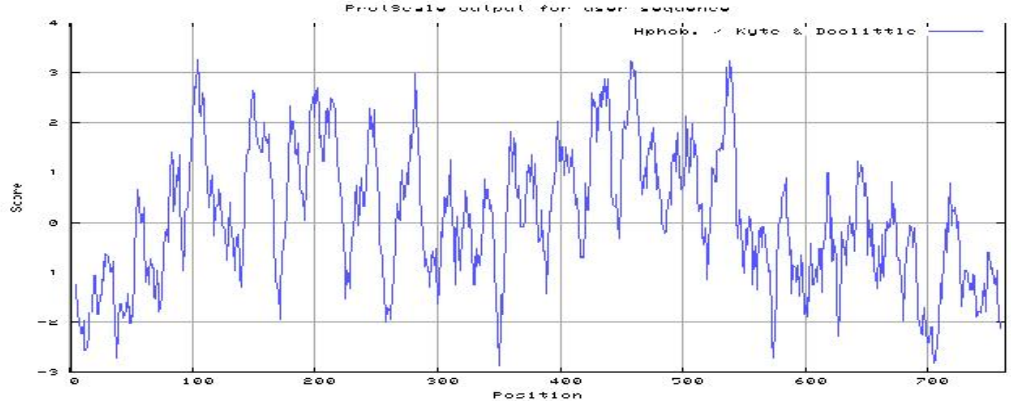


شکل ۷- تصویر الکتروفورز برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب (pGBKT7+*RGT2*)استخراج شده با آنزیم‌های برشی *PstI* و *NcoI*. مشاهده‌ی باند ۲۲۹۲bp حضور فیزیکی قطعه همسانه‌سازی شده را تایید می کند. M(Kb) مارکر ۱kb.

Figure 7- Electrophoresis of recombinant plasmid (pGBKT7+*RGT2*) digested with *PstI* and *NcoI* restriction enzymes, the observation of 2292bp band confirmed physical presence of cloned fragment. M(Kb) is 1kb DNA ladder 500 to 10000bp.

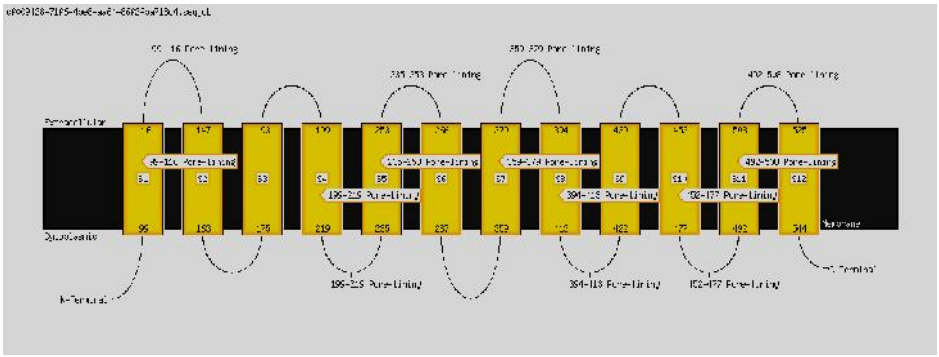
همچنین شاخص Aliphatic (به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت) و نیمه عمر این پروتئین در محیط *in vivo* محاسبه شده بوسیله برنامه ProtParam، به ترتیب ۹۵/۳۳ و در حدود ۲۰ ساعت محاسبه شد که بیانگر پایداری و مقاوم بودن پروتئین در برابر حرارت می باشد (Gasteiger *et al.* 2005). شاخص Hydropathy محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Kyte و Doolittle نشان داد که پروتئین Rgt2p، به دلیل خاصیت احیاءکنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز می‌باشد (Kyte and Doolittle 1982) (شکل ۸). C ترمینال گسترش یافته از این پروتئین شامل ۲۱۸ اسید آمینه است که از غشای پلاسمایی به سمت سیتوپلاسم قرار دارد. حسگر *RGT2* دارای ۱۲ دامنه انتقال دهنده درون غشایی است که در شکل نشان داده شده است (شکل ۹). پیام رسانی و سیگنالینگ گلوکز از طریق اتصال گلوکز به یکی از دامنه‌های غشایی که به عنوان گیرنده سیگنال عمل می‌کند ایجاد می‌شود (Ozcan *et al.* 1998).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]



شکل ۸– بررسی شاخص Hydropathic توالی پروتئین Rgt2p

Figure 8- Survey on Hydropathic index of Rgt2 protein sequence.

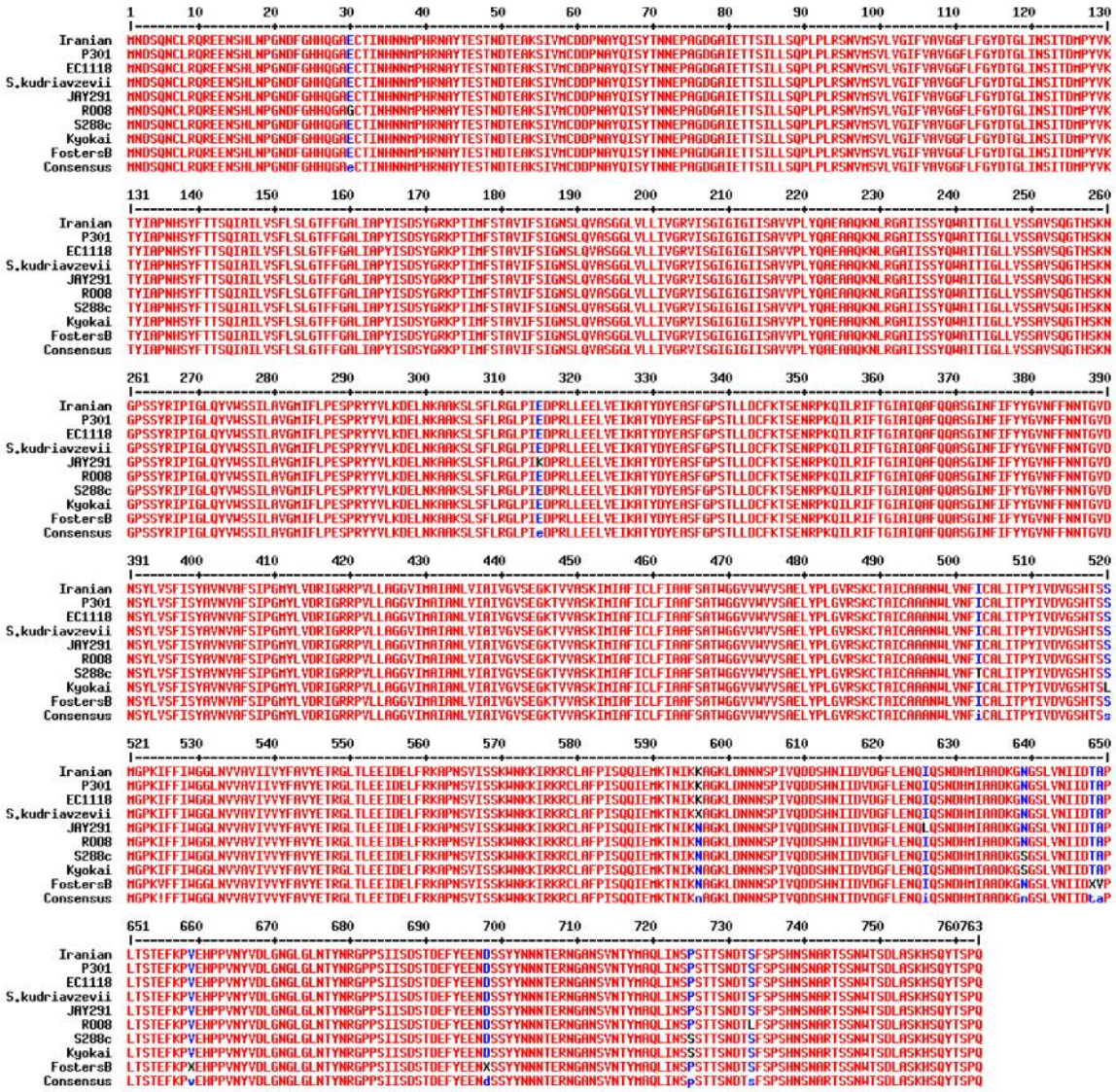


شکل۹– توپولوژی دو بعدی از حسگر گلوکز Rgt2p. دامنه‌های انتقال دهنده از ۱ تا ۱۲ شماره گذاری شده‌اند.

Figure 9- Two dimension topology of Rgt2p glucose sensor. Protein transduction domains are numbered from 1 to 12.

توالی پروتئینی بدست آمده با سایر Rgt2p از سویه‌های دیگر مخمر *S. cerevisiae* که بیشترین شباهت را داشتند با استفاده از نرم افزار آنلاین MultAlin مقایسه شد (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) (شکل ۱۰). نتایج بدست آمده نشان داد که پروتئین بدست آمده بالاترین تشابه را با Rgt2p از مخمر *S. cerevisiae* سویه P301 به میزان ۱۰۰٪ تشابه و ۹۹٪ یکسانی (similarity and identity) دارد. همچنین با سویه‌های EC1118، S. c. x S kudriavzevii VIN7، JAY291، S288c، R008، Kyokai no. 7، FostersB به میزان ۹۹٪ تشابه و ۹۹٪ یکسانی دارد (جدول ۱). بررسی درخت فیلوژنتیکی هم که با استفاده از نرم افزار MEGA4 رسم شده است نشان می‌دهد ژن مورد بررسی ارتباط خیلی نزدیک با سایر ژن‌های همتای خود در سویه‌های دیگر مخمر *S. cerevisiae* دارد (شکل ۱۱).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

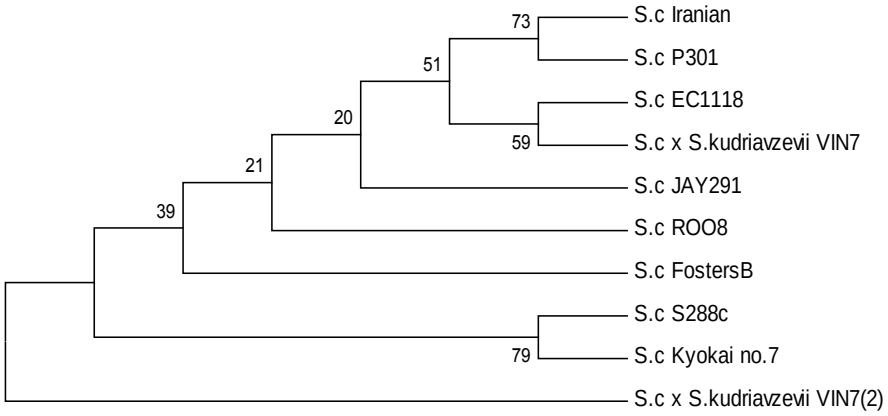


شکل ۱۰- همردیفی مقایسه‌ای توالی اسیدآمینه‌ای Rgt2p همسانه‌سازی شده در پلاسمید pGEM-T با توالی اسیدآمینه‌ای سایر Rgt2p های سویه‌های دیگر مخمر *S. cerevisiae* موجود در NCBI با استفاده از برنامه‌ی Multialign. ردیف آخر توالی‌های مورد توافق را پس از مقایسه نشان می‌دهد.

Figure 10- The obtained *Rgt2* Amino Acid sequence was aligned with other sequences of the same protein in *S. cerevisiae* by using of Multialign program. The last row shows the consensus sequences after alignment.

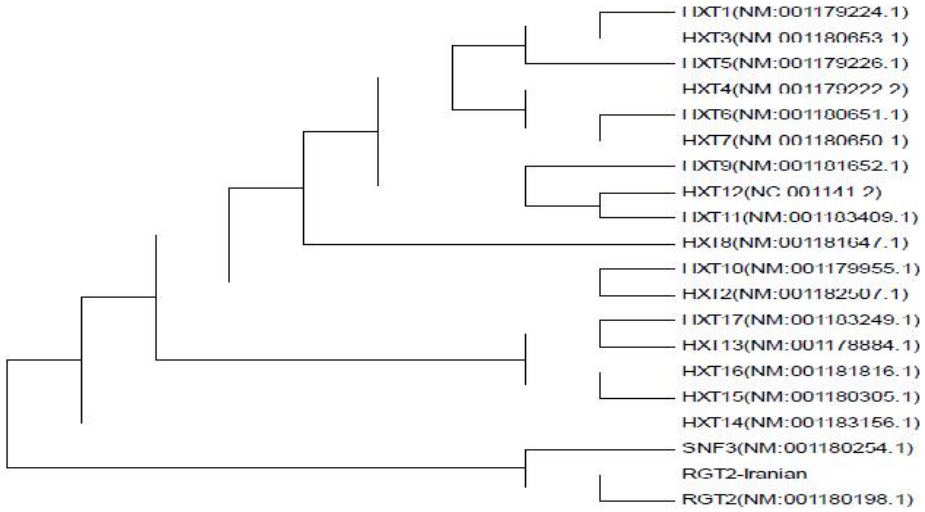
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]



شکل ۱۱- درخت فیلوژنتیکی توالی اسیدآمینه‌ای Rgt2p توالی‌یابی شده با سایر ژن‌های همتای خود در سویه‌های دیگر *S. cerevisiae* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شد.

Figure 11- Phylogenic tree of *Rgt2* amino acid sequence with other peer genes existed in NCBI for other strain of *S. cerevisiae*. This tree was drawn by MEGA4 software



شکل ۱۲- درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن *RGT2* مخمر *S. cerevisiae* سویه ایرانی با سایر ژن‌های انتقال‌دهنده‌های هگزوز *S. cerevisiae* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 رسم شد. کد دسترسی هر ژن داخل پرانتز آورده شده است.

Figure 12- Phylogenic tree of *RGT2* gene sequence from Iranian strain of *S. cerevisiae* with other hexose transporter genes existed in NCBI. This tree was drawn by MEGA4 software and accession number of each gene was brought into parenthesis.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

به منظور آشکارسازی و کشف روابط خویشاوندی ژن *RGT2* با ژن‌های خانواده انتقال‌دهنده هگزوز، آنالیز کلاستر انجام شد. براین اساس مشخص شد ژن *RGT2* ارتباط نزدیکی با ژن‌های این خانواده دارد و بیشترین ارتباط و شباهت را با ژن *SNF3* از این خانواده‌ی ژنی دارد (شکل ۱۱). نتایج BLAST در سطح پروتئین نشان داد پروتئین مورد بررسی شباهت ۶۴٪ (یکسانی ۸۹٪) با Snf3p حسگر مهم دیگر گلوکز در مخمر *S. cerevisiae* دارد (جدول ۱).

خانواده ژنی انتقال‌دهنده‌های هگزوز روی پلاسمیدهای مختلف همسانه‌سازی و افزایش تولید اتانول در سویه مهندسی شده در مقایسه با سویه وحشی مخمر مشاهده شده است. به طور مثال Rossi و همکاران (۲۰۱۰) از بین این انتقال دهنده‌ها *HXT7* و *HXT1* را همسانه‌سازی و افزایش تولید اتانول را در سویه مهندسی شده مشاهده کردند. در سال ۲۰۱۲ نیز *HXT7*، *HXT1* و *GXS1*، *GXF1* (انتقال‌دهنده‌ی زایلوز) از *Condida intermedia* را به پلاسمید pUPG1 همسانه‌سازی و به مخمر MT8-1/XkdXI منتقل کردند. در نهایت نتیجه کار با پلاسمید شاهد مقایسه و افزایش تولید اتانول مشاهده شد. این نتایج به طور آشکار نشان می‌دهند که افزایش بیان انتقال دهنده‌ها در مخمر می‌تواند توانایی تولید اتانول را بوسیله تسهیل مصرف گلوکز بهبود بخشد (Takanori *et al*. 2012). در ایران نیز ژن *HXT2* از طریق بهینه سازی PCR از ساکارومایسس سرویزیه سویه ایرانی جدا و در پلاسمید pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. این ژن با شماره دسترسی JQ 323554.1 در بانک جهانی ژن ثبت شده است (Amiri *et al*. 2011).

توالی ژن *RGT2* ابتدا در پلاسمید پایه‌ی pGEM-T همسانه‌سازی شد تا محدوده استفاده ازآنزیم‌های برشی برای همسانه‌سازی افزایش یابد. برای بیان این ژن نیاز به یک پیشبر قوی نظیر ADH-promoter و GAPDH-promoter (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) می‌باشد که این پیشبرها باعث افزایش میزان جذب قندهای هگزوز توسط سلول‌های مخمر و افزایش تولید الکل طی فرآیند تخمیری می‌شوند. در ادامه این ژن در پلاسمید pGBKT7 که حامل ADH-promoter است همسانه‌سازی شد. این پلاسمید برای بیان پروتئین در مخمر بسیار مناسب می باشد و از آن برای انتقال ژن *RGT2* جهت بیان آن در مخمر استفاده خواهد شد.

نتیجه‌گیری نهایی

براساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی (همردیفی مقایسه‌ای، بلاست، درخت فیلوژنتیکی) مشخص شد قطعه توالی‌یابی شده شباهت زیادی با توالی ژن *RGT2* مخمر *S. cerevisiae* سویه‌های دیگر ثبت شده در NCBI دارد. این اولین گزارش از جداسازی و همسانه‌سازی این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است. این مطالعه راهی برای پیشرفت تولید پلاسمیدهای نوترکیب و بیان این ژن برای مطالعه آینده است. امید است با بررسی بیشتر روی این ژن و سایر ژنهای انتقال‌دهنده هگزوز احتمالاً در آینده مخمر نوترکیب جهت افزایش راندمان تولید الکل طی تخمیر *S. cerevisiae* تهیه نمود.

تشکر و قدردانی: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بخاطر تامین مالی این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

Amiri S, Tarinejad A, Sharifi Sirchi Gh. 2011. Cloning and DNA sequence analysis of the glucose transporter2 gene from Iranian *Saccharomyces cerevisiae*. Iranian Journal of koomesh 2:138-143. (In Farsi with English abstract).

De Bari I, De Canio P, Cuna D, Liuzzi F, Capece A, Romano P. 2013. Bioethanol production from mixed sugars by Scheffersomyces stipitis free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. New biotechnology 30: 591-597.

Gancedo JM. 2008. The early steps of glucose signalling in yeast. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews 32: 673-704.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S,Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. pp: 571-607. In: John M, Walker, editor. The proteomics protocols handbook. Totowa, NJ: Humana Press.

Gutierrez-Lomeli M, Torres-Guzman JC, Gonzalez-Hernandez GA, Cira-Chavez LA, Pelayo-Ortiz C, Ramirez-Cordova Jde J. 2008. Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. Journal of Business 93: 363-371.

Guillaume C, Delobel P, Sablayrolles JM, Blondin B. 2007. Molecular basis of Fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. Applied and environmental Microbiology 8: 2432–2439.

Harju S, Fedosyuk H, Peterson KR. 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Gab. Bio Med Central Biotechnology 21: 4-8.

Kim JH, Polish J, Johnston M. 2003. Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. Molecular and Cellular Biology 23: 5208-5216.

Kyte J and Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157:105–132.

Lakshmanan J, Mosley AL, Ozcan S. 2003. Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. Current Genetics 44: 19-25.

Lee KH, Choi IS, Kim YG, Yang DJ, Bae HJ. 2011. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused Saccharomyces cerevisiae immobilized calcium alginate beads. Bioresource Technology 102: 8191-8198.

Ozcan S, Dover J, Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. European Molecular Biology Organization Journal 17: 2566-2573.

Ozcan S, Johnston M. 1996. Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes HXT2 and HXT4 to low levels of glucose. Molecular and Cellular Biology 16: 5536-5545.

Ozcan S, Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 554-569.

Perez M, Luyten K, Michel R, Riou CH, Blondin B. 2005. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research 5: 351-361.

Pretorius S, Toit M, Rensburg P. 2003. Designer Yeasts for the Fermentation Industry of the 21st Century. Food Technology and Biotechnology 41 (1) 3–10.

Rahimi Esfanjani N, Tarinejad AR. 2013. Isolation of partial cDNA of transferrin gene (TTf) from Bam wheat cultivar under salinity stress treatment. Biosafety and Genetic Engineering journal. 2(1): 59-70. (In Farsi with English abstract).

Rossi G, Sauer M, Porro D, Branduardi P. 2010. Effect of HXT1 and HXT7 hexose transporter overexpression on wild-type and lactic acid producing *Saccharomyces cerevisiae* cells. Microbial Cell Factories 9: 1-10.

Roy A, Kim JH. 2014. Endocytosis and vacuolar degadation of the yeast cell surface glucose sensors Rgt2 and Snf3. Journal of Biological Chemistry 289: 7247-7256.

Singh A, Bishnoi RN. 2012. Optimization of ethanol production from microwave alkali pretreated rice straw using statistical experimental designs *by Saccharomyces cerevisiae*. Industrial Crops and Products 37: 334-341.

Takanori T, Tomonori I, Chiaki O, Naoto O, Takayuki O, Akihiko K. 2012. Sugar consumption and ethanol fermentation by transporter-overexpressed xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* harboring a xyloseisomerase pathway. Journal of Bioscience and Bioengineering 114(2): 209-211.

Wolfl S, Hanemann V, Saluz H P. 1996. Analysis of a 2675bp segment from the left arm of yeast chromosome IV. Yeast 12: 1549-1554.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol4, Number1, Spring and summer 2015, Bi-seasonal

Cloning and investigation of *RGT2* gene charecteristics from an Iranian strain of *Saccharomyces cerevisiae*

Azizi[1] S. and A.R. Tarinejad*[2]

1. MSc. in Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University

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

* Corresponding Author, Email: atarinejad@yahoo.com

ABSTRACT

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has 20 genes that encode Hexose Transporter proteins, including *HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3* and *RGT2*. Two of these genes (*SNF3* and *RGT2*) act as glucose sensors while the *HXT1-HXT17* genes function in direct transportation of glucose. Earlier research has shown that alcohol fermentation can be augmented by increasing the expression of these genes, resulting in increasing ethanol production. The aim of this study was the identification and isolation of the Restores Glucose Transport 2 (*RGT2*) gene from *Saccharomyces cerevisiae* genome. Specific primers were employed in PCR so as to clone *RGT2* into a vector under a suitable expression promoter for recombinant yeast. After gene amplification, ligation was achieved between the amplified fragments and pGEM-T vector and the recombinant colonies were identified by the blue-white screening method. Candidate recombinant plasmids were sequenced. The nucleotide sequence of the open reading frame was found to be 2292 bp long with a deduced amino acid of 763 residues. The estimated molecular mass and the predicted isoelectric point of the deduced polypeptide were 83.173 kDa and 5.68 respectively. The deduced protein sequence showed a high similarity to *RGT2* sequences in the NCBI database, especially with P301 strain of *Saccharomyces cerevisiae* (100 % similarity). Finally, the *RGT2* gene was cloned into the pGBKT7 expression vector which is suitable for protein expression in yeast via the restriction sites *Nco*I and *Pst*I. A phylogenic study of the *RGT2* gene and other hexose transporter families showed that this gene has the most similarity with *SNF3*. Therefore, by isolation, cloning and sequence identification and transformation of this gene into yeast, ethanol production via alcohol fermentation can be increased.

Key Words

Cloning, *RGT2*, Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-22]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.1.9]