دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

جداسازی و کلونینگ سه ژن اپران ژنی پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدکنندهٔ زیست ماده پلاستیکی تخریب‌پذیر

م. محسن‌پور[۱]، ن. ع. بابائیان جلودار[۲] و م. توحیدفر[۳]

۱ و ۲- دانشجوی دکتری و استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۲۸

چکیده

پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک پلی‌هیدروکسی آلکانوات (PHA) است که در باکتری رالستونیا یوتروفا توسط سه آنزیم مسیر بیوسنتزی شامل بتاکتوتیولاز، استو- استیل کوآ- ردوکتاز وابسته بـه NADPH و PHB سینتاز تولید می‌شود. این سه آنزیم به ترتیب توسط *phbA*، *phbB* و *phbC* کُـد مـی‌شـوند. پلـی هیدروکسـی بوتیرات از لحاظ تجاری بسیار قابل توجه بوده، زیرا به عنوان زیست ماده پلاستیکی تخریب‌پذیر عمل می‌کند به طوری که در شرایط مناسب به طور کامل تجزیه شده و CO_2 و آب تولید می‌کند. در این تحقیق اُپـران سـه ژنی PHB با طراحی پرایمر از ژنوم باکتری جداسازی و خالص‌سازی گردید و پس از کلون‌سازی صحت جداسازی هر سه ژن با PCR داخلی و واکنش‌های هضم آنزیمی اثبات شد. با کلون‌سازی ژن‌های مذکور در حامـل بیـانی باکتریایی و نیز حامل‌های انتقال ژن انتظار می‌رود بتوان پلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات را به صورت مقرون بـه صرفه به عنوان زیست ماده پلاستیکی تخریب‌پذیر در گیاه تولید نمود.

واژه های کلیدی: زیست ماده پلاستیکی تخریب‌پذیر، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، کلون‌سازی

مقدمه

تعـدادی از بـاکتری‌هـا پلـی‌هیدروکسـی آلکانوات (PHA) را به عنـوان ترکیبـات ذخیـره انرژی در پاسخ به استرس‌های غـذایی اندوختـه مـی کننـد. اولـین ترکیـب از پلـی‌هیدروکسـی آلکانوات‌ها، پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) بود که در باکتری باسیلوس مگاتریوم شـناخته شـد. سـال‌هـا بعـد، مطالعـات نشـان داد کـه پلـی‌هیدروکسـی آلکـانوات‌هـا بـه عنـوان پلاستیک‌های تجزیـه‌پـذیر زیسـتی دارای ارزش

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

اقتصادی هستند (۸). پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک پلی‌هیدروکسی آلکانوات (PHA) است که در باکتری آلکالیژنز یوتروفوس (رالستونیا یوتروفا) توسط سه آنزیم مسیر بیوسنتزی شامل ۱- بتاکتوتیولاز ۲- استو-استیل کوآ-ردوکتاز وابسته به NADPH و ۳- PHB سینتاز تولید می‌شود که این سه آنزیم به ترتیب توسط ژن‌های *phbA*، *phbB* و *phbC* کد می‌شوند (۷). دو مولکول استیل-کوآ توسط بتاکتوتیولاز به هم متصل می‌شوند تا استواستیل کوآ تشکیل شود. استواستیل‌کوآ توسط استواستیل‌کوآ-رداکتاز به R- ۳- هیدروکسی بوتیرات-کوآ، تبدیل می‌شود. این ماده ابتدا به صورت منومر فعال است که سپس توسط PHB سینتاز پلیمریزه شده و PHB را تشکیل می‌دهد (۶) (شکل ۱).

رشد جمعیت انسان ها منجر به انباشته شدن مقادیر زیادی مواد زائد غیرقابل تجزیه در زمین شده است. انباشته شدن پلاستیک های زائد در طبیعت بسیار مهم و نگران کننده است (۱، ۳ و ۱۰). تجزیه شدن پلاستیک‌های مرسوم ده‌ها سال به طول می‌انجامد و در طول مراحل تجزیه‌شدن نیز سمومی تولید می‌کنند. به همین دلیل، تولید پلاستیک‌ها از موادی که می‌توانند به راحتی در تعامل با طبیعت از بیوسفر حذف شوند، توجه زیادی را به سمت خود معطوف ساخته است (۲). توجه به بیوپلاستیک‌ها به کمبود ذخایر پتروشیمی نیز مرتبط است. زیرا صنعت جهان به شدت به سوخت‌های فسیلی به عنوان منابع انرژی برای پروسه‌های صنعتی و تولید مواد ساختمانی وابسته است. ولی سوخت‌های فسیلی منابع محدودی دارند و با توجه به افزایش مصارف اخیر و میزان اکتشاف این منابع، بر طبق شواهد موجود گفته می‌شود که میزان بهره برداری آنها از اکتشاف آنها به زودی پیشی خواهد گرفت (۱۱). این موضوع یک مشکل جهانی است زیرا اقتصاد ما هنوز وابستگی زیادی به منابع نفتی دارد.

باکتری *E. coli* می‌تواند از دامنه وسیعی از منابع کربن ارزان استفاده کند و به دلیل سهولت رشد و هزینه کم خالص‌سازی بیوپلیمر، به عنوان تولیدکننده اقتصادی PHB مطرح شده است. علاوه بر آن، از آنجایی که این باکتری آنزیم PHA دپلیمراز درون سلولی ندارد، PHA ی سنتز شده، تجزیه نخواهد شد (۸).

تحقیقات در زمینهٔ تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوآت به عنوان جایگزین ترکیبات پتروشیمی با استفاده از سیستم‌های گیاهی و باکتریایی ادامه دارد. در حالی که تخمیر باکتریایی، به منابع بیرونی کربن، مثل گلوکز تکیه دارد، سنتز پلی‌هیدروکسی الکانوآت در گیاهان، که بر پایهٔ دی اکسیدکربن و نور است، یک روش مقرون به صرفه‌تری برای تولید این بیوپلیمر، در مقادیر زیاد ارائه می‌دهد. هدف از این تحقیق جداسازی و کلون‌سازی ژن‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی بوتیرات بود.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

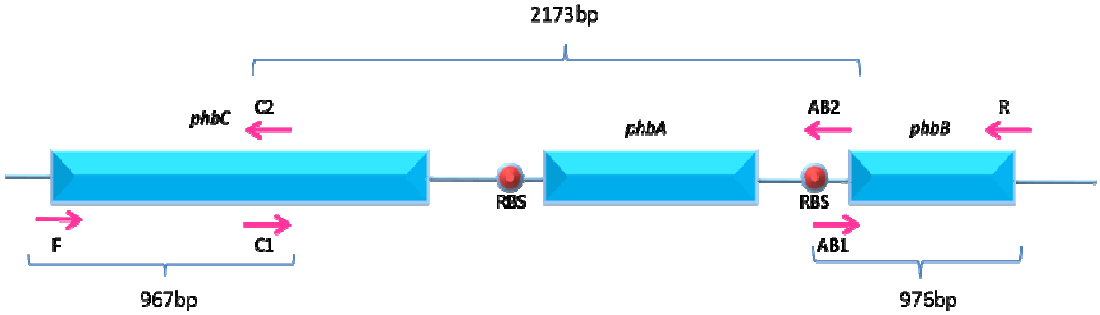
مواد و روشها

ابتدا سوش باکتری *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران (سایت PTCC.irost.org) تهیه شده و در محیط LB و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد کشت گردید. استخراج DNA از این باکتری با استفاده از کیت DNeasy Plant Mini Kit (شرکت Qiagen) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از دریافت توالی ژنومی باکتری مذکور از بانک ژن (NCBI) و آنالیز آن، توالی سه ژن دخیل در تولید PHB شناسایی شد. باکتری *R. eutropha* از نظر ساختمان ژنومی، دارای سه رپلیکون شامل دو کروموزوم و یک پلاسمید است. کروموزوم شماره ۱، دارای ژن‌های عملکردی اصلی باکتری مانند ژن‌های مربوط به فرایندهای همانندسازی، رونویسی، ترجمه و تجزیه اسیدهای آلی است. این کروموزوم دارای ۴۰۵۲۰۳۲ جفت باز است و ژن‌های مربوط به تولید لی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها نیز در این کروموزوم قرار دارند. طول کروموزوم شماره ۲ باکتری، ۲۹۱۲۴۹۰ جفت باز است. پلاسمید این باکتری pHG1 نامیده می‌شود که دارای ۴۵۲۱۵۶ جفت باز است. این پلاسمید، اطلاعات ژنتیکی ضروری برای متابولیسم لیتوتروفی اختیاری و رشد بی‌هوازی اختیاری باکتری را حمل می‌کند و دارای ۴۲۰ ژن می‌باشد (۸ و ۹). ژن *PhbA*، بتاکتوتیولاز کد می‌کند که اولین آنزیم برای پیوند دو مولکول استیلCoA به شکل استواستیلCoA است. مرحلهٔ بعد احیای استیل CoA به (R)-۳-هیدروکسی بوتیریلCoA است که توسط استیلCoA ردوکتاز کاتالیز می‌شود. این آنزیم توسط *PhbB* کد می‌شود و وابسته به NADPH است. مرحلهٔ بعدی پلیمریزاسیون مونومرهای (R)-۳- هیدروکسی بوتیریلCoA است که توسط PHAسنتاز کاتالیز می‌شود. این آنزیم به وسیلهٔ ژن *PhbC* کد می‌شود.

در مرحله بعد پرایمر های اختصاصی مناسب برای جداسازی این سه ژن با استفاده از نرم‌افزارOligo Tech طراحی و در نرم‌افزار Vector NTI مورد آنالیز قرار گرفتند. علاوه بر طراحی یک جفت آغازگر اختصاصی که هر سه ژن *phb*C، *phb*A و *phb*B را در یک واحد با طول ۴۰۷۸bp جدا می‌کند، دو جفت پرایمر داخلی نیز برای این اُپران طراحی شد، به طوری که مجموعهٔ سه جفت پرایمر قادر به تکثیر داخلی کل اُپران PHB باشد (شکل ۱). دو جفت پرایمر داخلی برای استفاده در PCR داخلی (Nested PCR) به منظور حذف مرحلهٔ توالی‌یابی طراحی گردیدند.

PCR با پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از آنزیم پلیمراز TLA (BioNeer)، که دارای خاصیت تصحیح‌کنندگی قوی و قادر به تکثیر طول زیاد است، انجام گرفت. محصول PCR حاصل از این آنزیم دارای انتهای صاف می‌باشد.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018



شکل ۱- نمای شماتیک ترتیب قرارگیری ژن‌ها در اپران PHB و محل اتصال پرایمرهای طراحی شده در اپران PHB.

محصول PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit (شرکت Roche) خالص‌سازی شد و در پلاسمید pJET1.2 (Fermentas) که ۲۹۷۴bp طول دارد، کلون‌سازی اولیه گردید. پس از انجام واکنش اتصال (Ligation)، پلاسمیدها، به باکتری‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* سویه XLI-Blue تراریزش شده و باکتری‌ها در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین به مدت یک شب در ۳۷C° رشد داده شدند. استخراج پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده در محیط مذکور انجام و بررسی‌های لازم به منظور دریافت سه ژن مورد نظر و جهت ورود آنها با استفاده از کلونی PCR، Nested PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت. بدین‌ترتیب وکتور نوترکیب موسوم به pJET-PHB، دریافت کننده ژن‌های *phbC* و*phbA* و *phbB* ساخته شد. کلیه مراحل همسانه‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های سمبروک و راسل (۵) انجام گردید.

نتایج و بحث

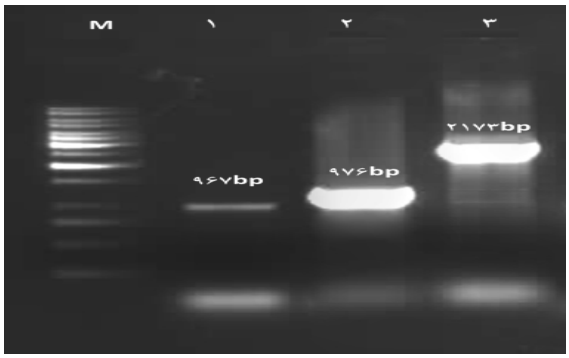
ظهور باندهای مورد انتظار با پرایمرهای داخلی، صحت طراحی پرایمرهای اختصاصی را اثبات نمود به طوری که کل اُپران PHB به صورت سه قطعه مجزا تکثیر گردید. انجام PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-C2 باند مورد انتظار bp ۹۶۷ را ظاهر نمود. پرایمرهای PHB-C1 و PHB-AB2 قطعه‌ای با طول bp ۲۱۷۳ نشان دادند و تکثیر با پرایمرهای PHB-R و PHB-AB1 قطعه مورد انتظار bp ۹۷۶ را ظاهر کردند (شکل ۲).

پس از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی PHB-F و PHB-R طراحی‌شده برای جداسازی کل اپران PHB، باند مورد انتظار bp ۴۰۷۸ ظاهر و پس از خالص‌سازی در پلاسمید pJET1.2 کلون‌سازی اولیه گردید (شکل ۳). استخراج پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده در محیط حاوی آمپی‌سیلین انجام و بررسی‌های لازم به منظور دریافت سه ژن مورد نظر و جهت ورود آنها با استفاده از کلونی PCR،

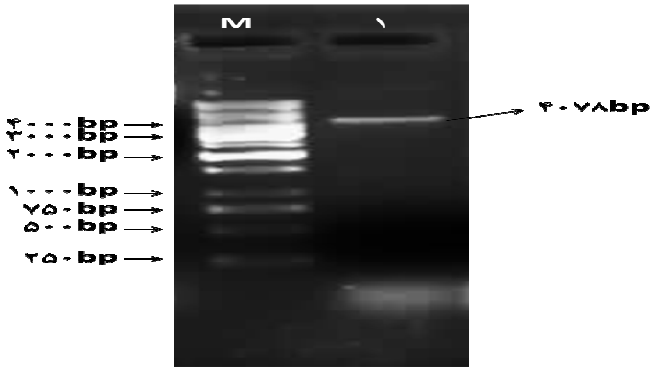
Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

Nested PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت. ورود گروه ژنی PHB در دو جهت مختلف در وکتور امکان‌پذیر بود، بدان علت که این ژن‌ها می‌بایست تحت نواحی تنظیمی پیشبر و پایانبر قرار می‌گرفتند، لذا جهت مورد نظر ورود ژن ها در حامل، توسط هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و کلونی حاوی pJET-PHB با جهت مورد نظر انتخاب گردید.

باندهای مورد انتظار برای گروه ژنی pJET-PHB در هضم آنزیمی مشترک با آنزیم‌های *Xho*I و *Xba*I عبارت بود از ۴۱۰۳ و ۲۹۴۹ جفت باز و باندهای مورد انتظار در هضم آنزیمی مشترک با آنزیم‌های *Eco*RV و *Hind*III در صورت ورود PHB در جهت صحیح در حامل pJET عبارت از ۴۱۰۹ و ۲۹۴۳ جفت باز بود (شکل ۴).

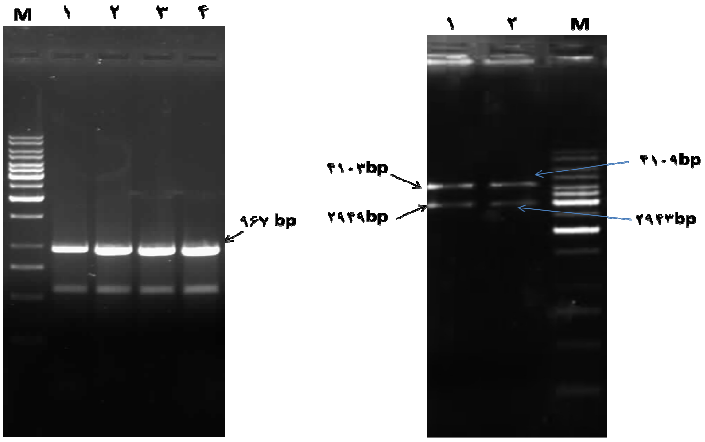


شکل ۲- تکثیر سه قسمت داخلی از اپران PHB با الگوی ژنومی باکتری رالستونیا یوتروفا، M. نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی 1kb DNA Ladder (Fermentas)، ۱- انجام واکنش PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-C2 (باند مورد انتظار ۹۶۷ bp را ظاهر نمود)، ۲- انجام واکنش PCR با پرایمرهای PHB-R و PHB-AB1 (قطعه مورد انتظار ۹۷۶ bp را ظاهر کرد)، ۳- انجام واکنش PCR با پرایمرهای PHB-C1 و PHB-AB2 (باند مورد انتظار ۲۱۷۳bp را ظاهر نمود).



شکل ۳- تکثیر کل اپران PHB با استفاده از PCR، M. نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی 1kb DNA Ladder (Fermentas)، ۱- انجام واکنش PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-R (باند مورد انتظار ۴۰۷۸bp را ظاهر نمود).

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018



الف ب

شکل ۴- واکنش‌های کلونی PCR و هضم آنزیمی کلونی‌های حاصل از اتصال pJET با PHB، الف- چاهک‌های ۱ تا ۴ کلونی PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-C2، ب- واکنش هضم آنزیمی: (۱) با آنزیم‌های *Xba*I و *Xho*I، (۲) با آنزیم‌های *Eco*RV و *Hind*III، M. نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی 1kb DNA Ladder (Fermentaz).

بدین‌ترتیب وکتور نوترکیب موسوم به pJET-PHB، دریافت کننده ژن‌های *phbC* و*phbA* و *phbB* ساخته شد.

با توجه به اینکه Nested PCR یک روش سریع و قابل اطمینان برای تأیید محصول PCR است و باعث افزایش حساسیت تشخیص محصول صحیح به میزان $۱۰^{۴}$ برابر می‌گردد (۴)، بنابراین به منظور تایید صحت جداسازی، دو جفت پرایمر داخلی طراحی گردید. استفاده ترکیبی از پرایمرهای داخلی و پرایمرهای انتهایی در تمام حالات، باندهای مورد انتظار را ظاهر نمود و نیاز به هزینه اضافی به منظور توالی‌یابی قطعه چهار کیلوبازی را منتفی نمود. هضم آنزیمی نیز تأیید دیگری بر صحت جداسازی قطعات بود. از آنجایی که تکثیر با آنزیم پلیمرازی انجام گرفت که دارای خاصیت تصحیح کنندگی بود، لذا خطری از نظر اشتباه آنزیم پلیمراز در هنگاه تکثیر و جداسازی توالی موردنظر وجود نداشت. جداسازی و کلون‌سازی ژن‌های مذکور توسط محققین مختلفی در دنیا و از باکتری‌های مختلف گزارش شده است (۸) ولی تاکنون گزارشی از کلون‌سازی کامل هر سه ژن PHB در داخل کشور وجود ندارد. جداسازی ژن‌های تولید کننده PHB در تحقیقات گذشته پس از ساخت کتابخانه های ژنومی از باکتری‌های تولیدکننده این زیست ماده پلاستیکی و ساب کلون کردن‌های متعدد به منظور یافتن محدوده ژن‌های مسیر بیوسنتز پلی‌هیدروکسی بوتیرات انجام گرفته بود (۷) ولی امروزه با دسترسی به بانک‌های داده توالی های ژنومی و استفاده از نرم‌افزارها و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، استفاده از توالی‌های ارزشمند

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

موجود در ژنوم موجودات مختلف، از جمله باکتری‌ها به سادگی امکان‌پذیر شده است. به طوری که در این تحقیق با آنالیز ژنوم رالستونیا یوتروفا توانستیم با موفقیت سه ژن تولید کنندهٔ پلی‌هیدروکسی بوتیرات را جداسازی و کلون نماییم.

جداسازی این ژن‌ها راه را برای بیان این بیوپلیمر در میزبان‌های مختلف از طریق قرار دادن آنها تحت نواحی تنظیمی مناسب باز خواهد نمود. استفاده از باکتری‌های نوترکیب و نیز گیاهان تراریخته باعث خواهد شد که هزینه تولید این بیوپلیمر نسبت به میزبان‌های طبیعی آن کاهش یابد.

در نهایت با توجه به قیمت بالای نفت خام و محدود بودن منابع آن، استفاده از منابع نفتی برای تولید مواد پلاستیکی، که هم آلوده کننده محیط زیست هستند و هم در جامعه ما ارزش چندانی ندارند، کاری غیر اقتصادی است. بنابراین با توجه به اینکه پلی‌هیدروکسی بوتیرات بسیاری از ویژگی‌های پلاستیک‌های نفتی را دارد، می‌تواند جایگزین مناسب و ایمنی برای پلاستیک‌های تجزیه ناپذیرکنونی باشد. لذا جداسازی و کلون‌سازی ژن‌های دخیل در سنتز PHB گام اولیه موثری در راستای هدف مذکور خواهد بود.

منابع

1. Derraik, J.G. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Mar Pollut Bull. 44: 842-852.
2. Gross, R.A. and B. Kalra. 2002. Biodegradable Polymers for the Environment. Science, 297: 803-807.
3. Guillet, J. 2002. Plastics and environment. *In:* Scott G, editor. Degradable Polymers: Principles and Applications. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher; pp: 413-448.
4. Mc-pherson, M.J., S.G. Moller, R. Beynon and C. Howe. 2000. PCR The Basics from Background to Bench. Springer-Verlag Telos, 1st edition: 276 pp.
5. Sambrook, J. and D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Chapter1: 1.1-1.170.
6. Saruul, P., F. Srienc, D.A. Somers and D.A. Samac. 2002. Production of a biodegradable plastic polymer, poly-ß-hydroxybutyrate, in transgenic alfalfa. Crop Sci., 42: 919-927.
7. Slater, S., K.L. Houmiel, M. Tran, T.A. Mitsky, N.B. Taylor and S.R. Padgette. 1998. Multiple β-ketothiolases mediate poly (β-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. J Bacteriol. 180: 1979-1987.
8. Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney and S. Shah. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. Biotechnology Advances. 25: 148-175.

9. Tabandeh, F. and E. Vasheghani-Farahani. 2003. Biosynthesis of Poly (β-hydroxybutyrate) as a Biodegradable Polymer. Iranian Polym. J. 12: 37.
10. Thompson, R.C., Y. Olsen, R.P. Mitchell, A. Davis, S.J. Rowland and A.W.G. John. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? Science, 304: 838.
11. Zagar, J. 2000. The end of cheap conventional oil. The Proceedings of Energy Efficiency Policy Synoposium. www.hawaii.gov/dbedt/ent/ symposium/zagar.pdf.

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

Downloaded from jcb.sanru.ac.ir at 18:12 +0430 on Saturday July 21st 2018

Isolation and Cloning of Three Genes of Polyhydroxybutirate Operon Producing Biodegedable Plastic

M. Mohsenpour[1], N.A. Babaeian Jelodar[2] and M. Tohidfar[3]

1 and 2- Ph.D. Student and Professor of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

Abstract

Polyhydroxybutyrate (PHB) is a polyhydroxy alkanote (PHA) which produces in *ralstonia eutropha* by three enzymes, including Beta-ketothiolase, NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase and PHB synthase. These three enzymes are encoded by *phbA*, *phbB* and *phbC* respectively. There is considerable interest in Polyhidroxybutirate, since it can be used as biodegradable plastic, which under optimal conditions are degraded completely to CO_2 and H_2O. In this research *phb* operon was isolated from *ralstonia* genome using polymerase chain reaction. Specific primers were designed for PHB isolation. The PCR product was purified and cloned. Accuracy of isolation and cloning of three PHB genes were verified by nested PCR and digestion reaction. It is expected that cloning of PHB genes in expression and transformation vectors can be caused to cost effective production of Polyhydroxybutyrate as a bio-degradable plastic in plants.

Keywords: Biodegradable plastic, Polyhydroxybutyrate, Cloning