



جداسازی و کلونینگ سه ژن اپران ژنی پلی هیدروکسی بوتیرات تولیدکننده زیست ماده پلاستیکی تخریب پذیر

م. محسن پور^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

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک پلی هیدروکسی آلکانوات (PHA) است که در باکتری رالستونیا یوتروفا توسط سه آنزیم مسیر بیوسنتزی شامل بتا کتوتیولاز، استو-استیل کوآ-ردوکتاز وابسته به NADPH و PHB سینتاز تولید می شود. این سه آنزیم به ترتیب توسط *phbA*، *phbB* و *phbC* کُد می شوند. پلی هیدروکسی بوتیرات از لحاظ تجاری بسیار قابل توجه بوده، زیرا به عنوان زیست ماده پلاستیکی تخریب پذیر عمل می کند به طوری که در شرایط مناسب به طور کامل تجزیه شده و CO₂ و آب تولید می کند. در این تحقیق اپران سه ژنی PHB با طراحی پرایمر از ژنوم باکتری جداسازی و خالص سازی گردید و پس از کلون سازی صحت جداسازی هر سه ژن با PCR داخلی و واکنش های هضم آنزیمی اثبات شد. با کلون سازی ژن های مذکور در حامل بیانی باکتریایی و نیز حامل های انتقال ژن انتظار می رود بتوان پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات را به صورت مقرون به صرفه به عنوان زیست ماده پلاستیکی تخریب پذیر در گیاه تولید نمود.

واژه های کلیدی: زیست ماده پلاستیکی تخریب پذیر، پلی هیدروکسی بوتیرات، کلون سازی

مقدمه

آلکانوات ها، پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) بود که در باکتری باسیلوس مگاتریوم شناخته شد. سال ها بعد، مطالعات نشان داد که پلی هیدروکسی آلکانوات ها به عنوان پلاستیک های تجزیه پذیر زیستی دارای ارزش

تعدادی از باکتری ها پلی هیدروکسی آلکانوات (PHA) را به عنوان ترکیبات ذخیره انرژی در پاسخ به استرس های غذایی اندوخته می کنند. اولین ترکیب از پلی هیدروکسی

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 سنتز شده، تجزیه نخواهد شد (۸).

تحقیقات در زمینه تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات 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 آلکانوات در گیاهان، که بر پایه 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.

اقتصادی هستند (۸). پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک پلی‌هیدروکسی آلکانوات (PHA) است که در باکتری آلکالیژن 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. استواستیل کوآ توسط استواستیل کوآ-رداکتاز به ۳- R- 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 انسان‌ها منجر به انباشته شدن مقادیر زیادی مواد زائد غیرقابل تجزیه در زمین شده است. انباشته شدن پلاستیک‌های 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 تجزیه شدن 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

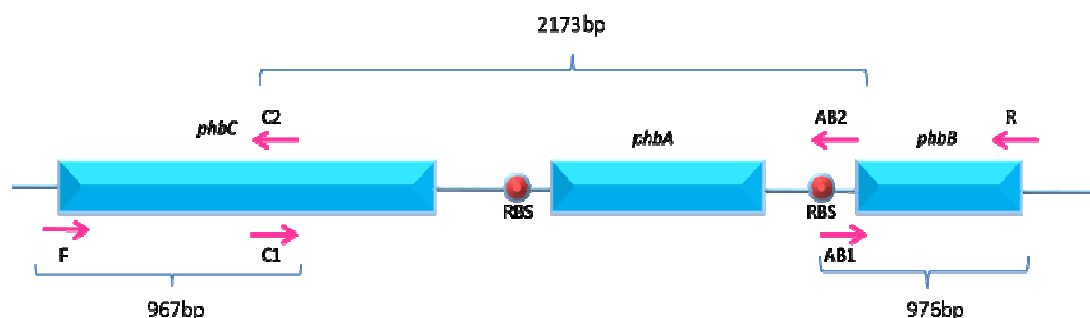
مواد و روشها

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 (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 ساختمانی ژنومی، دارای سه رپلیکون شامل دو کروموزوم و یک پلاسمید است. کروموزوم شماره ۱، دارای ژن های عملکردی اصلی باکتری مانند ژن های مربوط به فرایندهای همانندسازی، رونویسی، ترجمه و تجزیه اسیدهای آلی است. این کروموزوم دارای ۴۰۵۲۰۳۲ جفت باز است و ژن های مربوط به تولید لی هیدروکسی آلکانوات ها نیز در این کروموزوم قرار دارند. طول کروموزوم شماره ۲ باکتری، ۲۹۱۲۴۹۰ جفت باز است. پلاسمید این باکتری pHG1 نامیده می شود که دارای ۴۵۲۱۵۶ جفت باز است. این پلاسمید، اطلاعات ژنتیکی ضروری برای متابولیسم لیتوتروفی اختیاری و رشد بی هوازی اختیاری باکتری را حمل می کند و دارای ۴۲۰ ژن می باشد (۸ و ۹). ژن *PhbA*، بتاکتوتیولاز کد می کند که اولین آنزیم برای پیوند دو مولکول

استیل CoA به شکل استواسیتیل CoA است. مرحله بعد احیای استیل CoA به (R)-۳- هیدروکسی بوتیریل CoA است که توسط استیل CoA ردوکتاز کاتالیز می شود. این آنزیم توسط *PhbB* کد می شود و وابسته به NADPH است. مرحله بعدی پلیمریزاسیون مونومرهای (R)-۳- هیدروکسی بوتیریل CoA است که توسط PHA سنتاز کاتالیز می شود. این آنزیم به وسیله ژن *PhbC* کد می شود.

در مرحله بعد پرایمرهای اختصاصی مناسب برای جداسازی این سه ژن با استفاده از نرم افزار Oligo Tech طراحی و در نرم افزار Vector NTI مورد آنالیز قرار گرفتند. علاوه بر طراحی یک جفت آغازگر اختصاصی که هر سه ژن *phbA*، *phbB* و *phbC* را در یک واحد با طول ۴۰۷۸bp جدا می کند، دو جفت پرایمر داخلی نیز برای این آپران طراحی شد، به طوری که مجموعه سه جفت پرایمر قادر به تکثیر داخلی کل آپران PHB باشد (شکل ۱). دو جفت پرایمر داخلی برای استفاده در PCR داخلی (Nested PCR) به منظور حذف مرحله توالی یابی طراحی گردیدند.

PCR با پرایمرهای اختصاصی و با استفاده از آنزیم پلیمرز TLA (BioNeer)، که دارای خاصیت تصحیح کنندگی قوی و قادر به تکثیر طول زیاد است، انجام گرفت. محصول PCR حاصل از این آنزیم دارای انتهای صاف می باشد.



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

نتایج و بحث

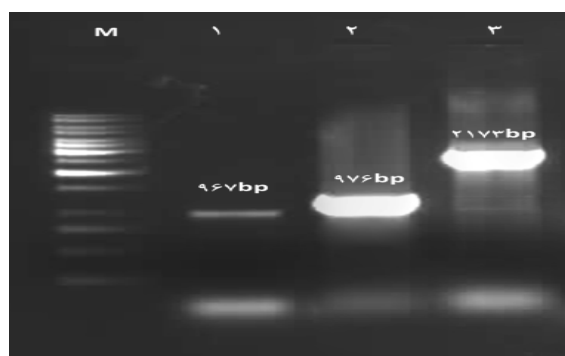
ظهور باندهای مورد انتظار با پرایمرهای داخلی، صحت طراحی پرایمرهای اختصاصی را اثبات نمود به طوری که کل اپران PHB به صورت سه قطعه مجزا تکثیر گردید. انجام PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-C2 باند مورد انتظار ۹۶۷ bp را ظاهر نمود. پرایمرهای PHB-C1 و PHB-AB2 قطعه‌ای با طول ۲۱۷۳ bp نشان دادند و تکثیر با پرایمرهای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

پس از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی PHB-F و PHB-R طراحی شده برای جداسازی کل اپران PHB، باند مورد انتظار ۴۰۷۸ bp ظاهر و پس از خالص‌سازی در پلاسמיד pJET1.2 کلون‌سازی اولیه گردید (شکل ۳). استخراج پلاسמיד 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،

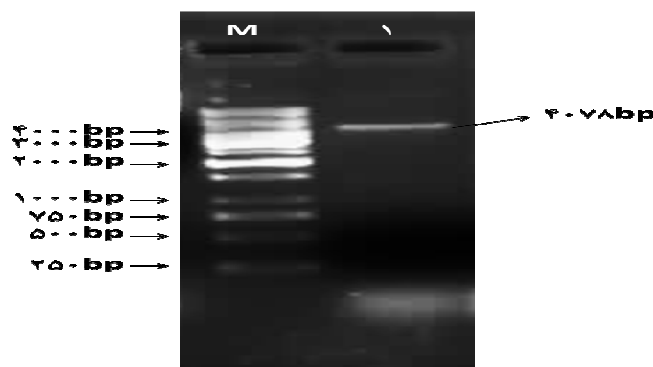
محصول PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، با استفاده از High Pure PCR Product Purification Kit (شرکت Roche) خالص‌سازی شد و در پلاسמיד pJET1.2 (Fermentas) که ۲۹۷۴bp طول دارد، کلون‌سازی اولیه گردید. پس از انجام واکنش اتصال (Ligation)، پلاسמידها، به باکتری‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* سویه XLI-Blue تراریزش شده و باکتری‌ها در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین به مدت یک شب در ۳۷°C رشد داده شدند. استخراج پلاسמיד 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. بدین ترتیب 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.

باند‌های مورد انتظار برای گروه ژنی pJET-PHB در هضم آنزیمی مشترک با آنزیم‌های *XbaI* و *XhoI* عبارت بود از ۴۱۰۳ و ۲۹۴۹ جفت باز و باند‌های مورد انتظار در هضم آنزیمی مشترک با آنزیم‌های *EcoRV* و *HindIII* در صورت ورود PHB در جهت صحیح در حامل pJET عبارت از ۴۱۰۹ و ۲۹۴۳ جفت باز بود (شکل ۴).

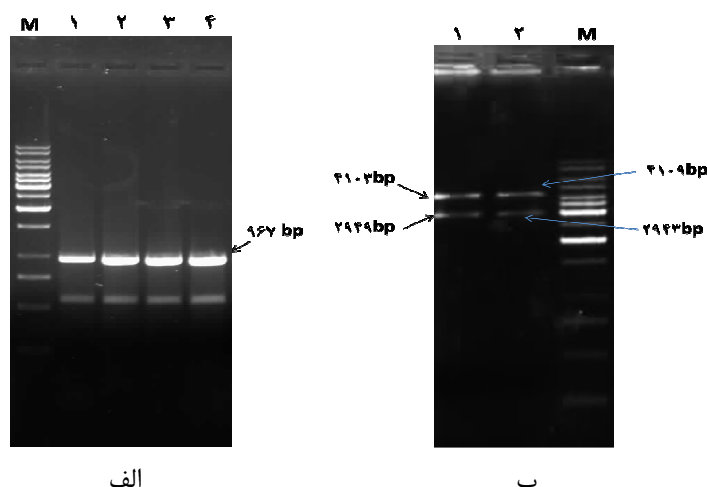
Nested PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت. ورود گروه ژنی PHB در دو جهت مختلف در وکتور امکان‌پذیر بود، بدان علت که این ژن‌ها می‌بایست تحت نواحی تنظیمی پیشبر و پایانببر قرار می‌گرفتند، لذا جهت مورد نظر ورود ژن‌ها در حامل، توسط هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و کلونی حاوی pJET-PHB با جهت مورد نظر انتخاب گردید.



شکل ۲- تکثیر سه قسمت داخلی از اپران PHB با الگوی ژنومی باکتری رالستونیا یوتروفا، M. نشانگر اندازه وزن ملکولی 1kb DNA Ladder (Fermentas)، ۱- انجام واکنش PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-C2 (باند مورد انتظار ۹۷۶ 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 اندازه وزن ملکولی 1kb DNA Ladder (Fermentas)، ۱- انجام واکنش PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-R (باند مورد انتظار ۴۰۷۸bp را ظاهر نمود).



شکل ۴- واکنش های کلونی PCR و هضم آنزیمی کلونی های حاصل از اتصال pJET با PHB، الف- چاهک های ۱ تا ۴ کلونی PCR با پرایمرهای PHB-F و PHB-C2، ب- واکنش هضم آنزیمی: (۱) با آنزیم های *XbaI* و *XhoI*، (۲) با آنزیم های *EcoRV* و *HindIII*، M. نشانگر اندازه وزن ملکولی 1kb DNA Ladder (Fermentaz).

تصحیح کنندگی بود، لذا خطری از نظر اشتباه آنزیم پلیمراز در هنگام تکثیر و جداسازی توالی موردنظر وجود نداشت. جداسازی و کلون سازی ژن های مذکور توسط محققین مختلفی در دنیا و از باکتری های مختلف گزارش شده است (۸) ولی تاکنون گزارشی از کلون سازی کامل هر سه ژن PHB در داخل کشور وجود ندارد. جداسازی ژن های تولید کننده PHB در تحقیقات گذشته پس از ساخت کتابخانه های ژنومی از باکتری های تولیدکننده این زیست ماده پلاستیکی و ساب کلون کردن های متعدد به منظور یافتن محدوده ژن های مسیر بیوسنتز پلی هیدروکسی بوتیرات انجام گرفته بود (۷) ولی امروزه با دسترسی به بانک های داده توالی های ژنومی و استفاده از نرم افزارها و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، استفاده از توالی های ارزشمند

بدین ترتیب وکتور نو ترکیب موسوم به pJET-PHB، دریافت کننده ژن های *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 10^4 برابر می گردد (۴)، بنابراین به منظور تأیید 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 توالی یابی 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

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 کننده 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 نو ترکیب 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 ناپذیر کنونی 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*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. Chapter1: 1.1-1.170.
6. Saruul, P., F. Srien, D.A. Somers and D.A. Samac. 2002. Production of a biodegradable plastic polymer, poly- β -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. Padgett. 1998. Multiple β -ketothiolases mediate poly (β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol.* 180: 1979-1987.
8. Suriyamongkol, P., R. Weslake, S. Narine, M. Moloney and S. Shah. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. *Biotechnology Advances.* 25: 148-175.

جداسازی و کلونینگ سه ژن اپران ژنی پلی هیدروکسی بوتیرات تولیدکننده زیست ماده پلاستیکی تخریب پذیر ۵۰

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.

Isolation and Cloning of Three Genes of Polyhydroxybutyrate Operon Producing Biodegradable Plastic

M. Mohsenpour¹, N.A. Babaeian Jelodar² and M. Tohidfar³

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 Polyhydroxybutyrate, since it can be used as biodegradable plastic, which under optimal conditions are degraded completely to CO₂ and H₂O. 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