

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

م. محسن‌پور^۱, ن. ع. بابائیان جلودار^۲ و م. توحیدفر^۳

۱- 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 بتاکتوپیولاز، استو-استیل کوا-ردوکتاز وابسته به PHB و NADPH و سینتاز تولید می‌شود. این سه آنزیم به ترتیب توسط *phbC* و *phbB* و *phbA* گُدد می‌شوند. پلی‌هیدروکسی بوتیرات از لحاظ تجاری بسیار قابل توجه بوده، زیرا به عنوان زیست مادهٔ پلاستیکی تخریب‌پذیر عمل می‌کند به طوری که در شرایط مناسب به طور کامل تجزیه شده و CO₂ و آب تولید می‌کند. در این تحقیق اپران سه 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 حامل بیانی باکتریایی و نیز حامل‌های انتقال ژن انتظار می‌رود بتوان پلی‌هیدروکسی بوتیرات را به صورت مقرون به صرفه به عنوان زیست مادهٔ پلاستیکی تخریب‌پذیر در گیاه تولید نمود.

واژه‌های کلیدی: زیست مادهٔ پلاستیکی تخریب‌پذیر، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، کلون‌سازی

آلکانوات‌ها، پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) بود که در باکتری باسیلوس مگاتریوم شناخته شد. سال‌ها بعد، مطالعات نشان داد که پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها به عنوان پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر زیستی دارای ارزش

مقدمه

تعدادی از باکتری‌ها پلی‌هیدروکسی آلکانوات (PHA) را به عنوان ترکیبات ذخیره انرژی در پاسخ به استرس‌های غذایی اندوخته می‌کنند. اولین ترکیب از پلی‌هیدروکسی

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 را سنتز شده، تجزیه نخواهد شد (۸).

تحقیقات در زمینه 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 پایه اکسیدکربن و نور است، یک روش مقرر 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 آلکانوآت (PHA) است که در باکتری آکالیثنر یوتروفوس (رالستونیا یوتروفما) توسط سه آنزیم مسیر بیوسنتزی شامل ۱- بتاکتوتیولاز- ۲- استو- استیل کوا- ردوکتاز وابسته به NADPH و ۳- PHB سینتاز تولید می‌شود که این سه آنزیم *phbC* و *phbB* و *phbA* به ترتیب توسط ژن‌های کوا توسط کد می‌شوند (۷). دو مولکول استیل- کوا توسط بتاکتوتیولاز به هم متصل می‌شوند تا استواستیل کوا تشکیل شود. استواستیل کوا توسط استواستیل کوا- رداکتاز به R- ۳- هیدروکسی بوتیرات- کوا، تبدیل می‌شود. این ماده ابتدا به PHB صورت منومر فعال است که سپس توسط 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 سومومی 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

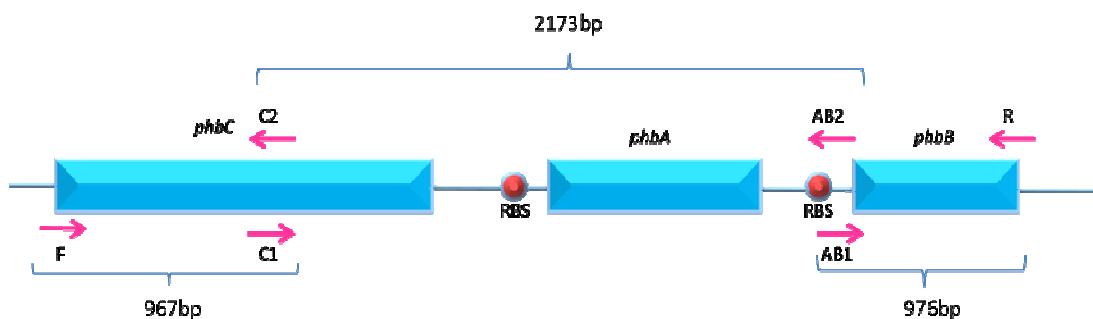
استیل CoA به شکل استواستیل CoA است. مرحله بعد احیای استیل CoA به ۳-(R)-هیدروکسی بوتیریل CoA است که توسط استیل CoA ردوکتاز کاتالیز می‌شود. این آنزیم NADPH توسط *PhbB* کد می‌شود و وابسته به است. مرحله بعدی پلیمریزاسیون مونومرهای ۳-هیدروکسی بوتیریل CoA است که توسط PHA سنتاز کاتالیز می‌شود. این آنزیم به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

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

مواد و روشها

ابتدا سوش باکتری *Alcaligenes eutrophus* (Ralstonia eutrophpha) از سازمان پژوهش‌های 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 DNeasy Plant Mini Kit (شرکت Qiagen) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از دریافت توالي ژنومی باکتری مذکور از بانک ژن (NCBI) و آنالیز آن، توالي سه ژن دخیل در تولید PHB شناسایی شد. باکتری *R. eutrophpha* 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 لی‌هیدروکسی‌آلکانات‌ها 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 بی‌هوایی 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



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

نتایج و بحث

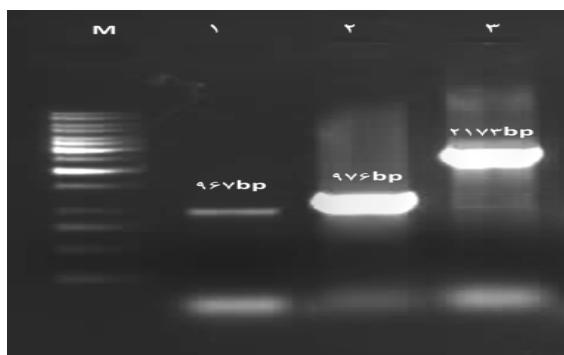
ظهور باندهای مورد انتظار با پرایمرهای داخلی، صحت طراحی پرایمرهای اختصاصی را اثبات نمود به طوری که کل اپران PHB به صورت سه قطعه مجزا تکثیر گردید. انجام PCR با پرایمرهای PHB-C2 و PHB-F و PHB-C1 انتظار ۹۶۷ bp را ظاهر نمود. پرایمرهای PHB-AB2 و PHB-AB1 قطعه‌ای با طول ۲۱۷۳ bp نشان دادند و تکثیر با پرایمرهای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

پس از انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی کل اپران PHB، باند مورد انتظار ۴۰۷۸ bp ظاهر و پس از خالص‌سازی در پلاسمید استخراج پلاسمید از کلونی‌های رشد کرده در محیط حاوی آمپیسیلین به 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 phbA، phbB و phbC ساخته شد. کلیه مراحل همسانه‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های سمبروک و راسل (۵) انجام گردید.

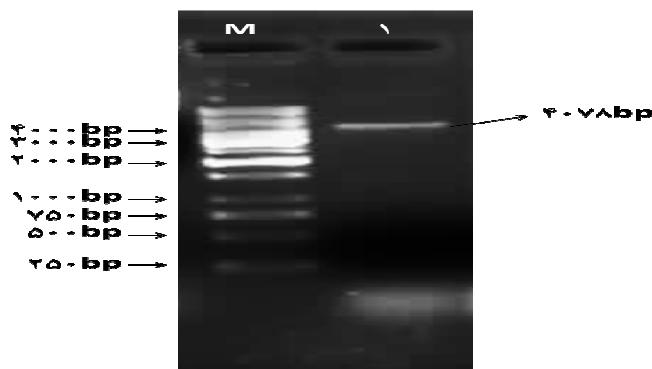
محصول PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، با استفاده از High Pure PCR Product (شرکت Roche) خالص‌سازی شد و در پلاسمید ۲۹۷۴ bp طول دارد، کلون‌سازی اولیه گردید. پس از انجام واکنش اتصال (Ligation)، پلاسمید‌ها، به باکتری‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* سویه XLI-Blue تراریزش شده و باکتری‌ها در محیط LB حاوی آمپیسیلین به مدت یک شب در ۳۷°C 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. بدین ترتیب وکتور نوترکیب موسوم به pJET-PHB، دریافت کننده ژن‌های phbA، phbB و phbC 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).

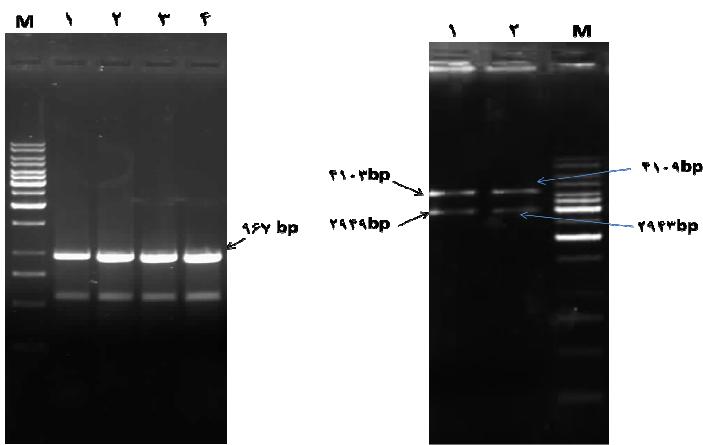
Nested PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت. ورود گروه ژنی PHB در دو جهت مختلف در وکتور امکان‌پذیر بود، بدان علت که این ژن‌ها می‌بایست تحت نواحی تنظیمی پیشبر و پایانبر قرار می‌گرفتند، لذا جهت مورد نظر ورود ژن‌ها در حامل، توسط هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و کلونی حاوی pJET-PHB با جهت مورد نظر انتخاب گردید.



شکل ۲- تکثیر سه قسمت داخلی از اپران PHB با الگوی ژنومی باکتری رالستونیا یوتروفاف، M نشانگر اندازه وزن ملکولی (Fermentas 1kb DNA Ladder)، 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-AB2 و PHB-C1 (باند مورد انتظار ۲۱۷۳bp را ظاهر نمود).



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



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 *Fermentaz* (۲) با آنزیمهای *EcoRV* و *HindIII*. نشانگر اندازه وزن ملکولی M.

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 کتابخانه‌های ژنومی از باکتری‌های تولید کننده 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 توالی‌های ژنومی و استفاده از نرم‌افزارها و آنالیزهای بیوانفورماتیکی، استفاده از توالی‌های ارزشمند

بدین ترتیب وکتور نوترکیب موسوم به *pJET-PHB* دریافت کننده ژن‌های *phbC* و *phbB* و *phbA* 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 می‌گردد (۴)، بنابراین به منظور تایید صحت جداسازی، دو جفت پرایمر داخلی طراحی گردید. استفاده از 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

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.

موجود در ژنوم موجودات مختلف، از جمله باکتری‌ها به سادگی امکان‌پذیر شده است. به طوری که در این تحقیق با آنالیز ژنوم رالستونیا یوتروفافا 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 قراردادن 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.

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. Srienc, 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. 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.

- جداسازی و کلونینگ سه ژن اپران ژنی پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید‌کننده زیست ماده پلاستیکی تخریب‌پذیر 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 Polyhydroxybutirate 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 Polyhidroxybutirate, 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