جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هفتم ● شماره ۴ ● صفحات ۲۴۸ تا ۲۵۵ ● زمستان ۱۳۸۸

مهندسی متابولیک E. coli جهت تولید PHB و تسهیل فرآیند لیز باکتری با استفاده از ژن لیز E از فاژ φX174

دکتر هادی شیرزاد[۱]، *دکتر مجتبی سعادتی[۲]، روح الله نخعی سیستانی[۳]

تاریخ اعلام وصول: ۸۸/۱۱/۱۹ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۹/۲/۲۳

چکیده

سابقه و هدف: ژن‌های بیوسنتزی پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری رالستونیا یوتروفا درون یک اپران قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که می‌توان این اپران را در باکتری‌های گرم منفی دیگر نظیر E. coli کلون کرد و محصول مناسب به دست آورد. برای این منظور نیازی به تعویض پروموتر نیز نمی‌باشد، زیرا پروموتر اصلی اپران می‌تواند در E. coli نیز با کارآمدی، فعالیت نماید. استحصال گرانول‌های تولیدی یکی از مباحث مهم بیوتکنولوژیکی جهت تولید صنعتی این ماده می‌باشد، زیرا روش‌های مبتنی بر حلال، یا روش‌های فیزیکی علاوه بر بالابردن هزینه ساختار گرانول را نیز به هم می‌زنند. به همین در این مطالعه جهت استحصال گرانول‌ها از سیستم لیز E استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، به منظور به دست آوردن اپران phb و نیز ژن E از تکنیک PCR استفاده گردید. سپس هر کدام آنها توسط یک پلاسمید مجزا در باکتری E. coli کلون گردید. جهت کنترل فرآیند لیز نیز از پروموتر القا شیمیایی استفاده شد.

یافته‌ها: باکتری‌هایی که هر دو پلاسمید در آنها کلون شده بود اول PHB را در خود به مقدار زیاد بیان نمودند و دوم در زمان مناسب با افزایش القاگر، لیز شده گرانول‌های خود را به درون محیط کشت رها نمودند.

بحث و نتیجه‌گیری: می‌توان از این روش جهت تولید و استحصال مقرون به صرفه‌ی PHB استفاده نمود.

کلمات کلیدی: پلی هیدروکسی بوتیرات، سیستم لیز E، اپران phb

مقدمه

امروزه پلاستیک‌ها به دلیل خواص مفیدی که دارند در بسیاری از موارد کاربردهای گسترده‌ای پیدا کرده‌اند، اما بزرگ‌ترین مشکل در راه استفاده از آنها چگونگی دفع زباله‌های آنها می‌باشد [۱]. این پلی‌مرها دوام و پایداری بسیار زیادی دارند و اغلب در شرایط طبیعی قابل تجزیه شدن توسط فرآیندهای طبیعی نمی‌باشند. سوزاندن آنها ترکیبات سمی به محیط متصاعد می‌کند، دفع آنها در محیط‌های آبی معضلات زیست محیطی به همراه دارد و دفن آنها نیز به دلیل حجم بسیار زیاد استفاده از آنها، مکان‌های دفن زباله را پر می‌کند [۲]. از این رو پیدا کردن جایگزین‌های مناسبی برای آنها که هم به لحاظ خواص کارایی لازم را داشته باشند و هم بتوانند توسط فرآیندهای طبیعی تجزیه شوند، یکی از زمینه‌های مهم تحقیقاتی است.

برخی از باکتری‌ها این توانایی را دارند که ترکیبات پلی‌مری را سنتز نمایند که به لحاظ خواص مشابه برخی از انواع پلاستیک‌های صنعتی هستند. این ترکیبات را که تحت عنوان پلی هیدروکسی آلکانوآت‌ها می‌شناسند، از این مزیت نیز بهره می‌برند که توسط بسیاری از باکتری‌ها تجزیه می‌شوند [۳-۵]. لذا اول مشکل دفع زباله‌ها را حل می‌کنند، و دوم در بسیاری از موارد که پلاستیک‌های صنعتی

۱ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، دانشکده فنی- علوم پایه، گروه زیست، دانشجوی دکترا
۲ـ دانشیار، ایران، تهران، دانشگاه امام حسین (ع)، دانشکده فنی- علوم پایه، گروه زیست (*نویسنده مسوول)
تلفن: ۶۶۷۴۸۸۷۲-۰۲۱ آدرس الکترونیک: Saadati_m@yahoo.com
۳ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشجوی دکترا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

را نمی‌توان استفاده نمود، یا استفاده از آنها مشکلاتی را به همراه دارد، نظیر بسیاری از کاربردهای پزشکی، قابلیت استفاده دارند.

از باکتری‌هایی که می‌تواند چنین ترکیباتی را تولید کند باکتری Ralstonia eutropha می‌باشد. پلی‌مری که این باکتری تولید می‌کند پلی هیدروکسی بوتیرات یا به طور خلاصه PHB نام دارد. این پلیمر به لحاظ خواص بسیار مشابه پلاستیک‌های صنعتی پلی‌پروپیلنی است و با کمی تغییر می‌تواند در بسیاری موارد جایگزین مناسبی برای این دست از پلاستیک‌ها باشد. اپران سنتز PHB در این باکتری از سه ژن تشکیل شده است که به ترتیب قرارگیری عبارتند از: PHB پلی‌مراز (phbC)، بتاکتوتیولاز (phbA) و استواستیل کوآ دِهیدروژناز (phbB) [۵-۹].

اگرچه این باکتری می‌تواند تا حجم بالایی از این پلی‌مر را تولید کند اما به دلیل دوره‌ی رشد طولانی و شرایط محیط کشت و مشکل بودن دست‌کاری‌های ژنتیکی مطالعات بسیاری برای کلون کردن اپران سنتز PHBی این باکتری در E. coli صورت گرفته است [۶، ۱۰، ۱۱]. این مطالعات نشان داده‌اند که پروموتر این اپران از رالستونیا یوتروفا می‌تواند با کارآیی بالایی در E. coli نیز سنتز ژن‌های خود را حمایت کند و مقادیر بالایی از محصول در باکتری میزبان تجمع یابد [۱، ۶، ۱۲].

مهم‌ترین مشکل در راه جایگزینی این دسته از پلی‌مرها به جای پلاستیک‌های صنعتی، هزینه‌ی بالای فرآیند تولید آنها می‌باشد که این امر حتی با استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت و میزبان‌های سریع رشدی نظیر E. coli نیز هنوز مرتفع نشده است [۱، ۱۳، ۱۴]. یکی از علل بالا بودن هزینه‌های تولید، هزینه‌های مربوط به فرآوری‌های پایین دستی، یعنی هزینه‌های مربوط به استحصال و خالص سازی است. استفاده از ترکیبات شیمیایی و آنزیم‌ها جهت لیز باکتری اول هزینه‌ی بالایی را به فرآیند تحمیل می‌کند و دوم خود به مراحل تخلیص می‌افزاید. روش‌های فیزیکی نیز مشکلات مربوط به دما و نیز بر هم زدن ساختار گرانول‌های حاوی پلی‌مر را به همراه دارد [۳، ۱۴].

سیستم هضم با واسطه‌ی ژن E از باکتریوفاژ Phi X ۱۷۴ در حال حاضر کاربرد زیادی در تولید شبح‌های باکتریایی دارد. محصول این ژن می‌تواند تونلی در غشاهای باکتری‌های گرم منفی ایجاد کند که در نتیجه کل محتوای سلولی به دلیل اختلاف فشار اسمزی به محیط تخلیه می‌گردد [۳، ۱۵]. می‌توان از همین سیستم تحت کنترل پروموتر القایی شیمیایی استفاده نمود تا باکتری را در زمان مناسب بی آنکه نیاز به شرایط پیچیده باشد لیز نمود و در نتیجه محصول تولیدی به محیط کشت وارد شود.

هدف این مطالعه نیز اول کلون کردن یک باره‌ی کل اپران بیوسنتزی PHB از رالستونیا یوتروفا به E. coli و دوم استفاده از این سیستم لیز E جهت کاستن هزینه‌های مربوط به استخلاص پلی‌مر تولیدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و پلاسمیدها و DNAی مورد استفاده در این تحقیق از سویه‌های E. coli DH ۵ α و BL ۲۱ و باکتری رالستونیا یوتروفا (Ralstonia eutropha) سویه‌ی ۱۲۶۹ ACM استفاده گردید که سویه‌های E. coli از بانک میکروبی انستیتو پاستور تهیه گردید و سویه‌ی رالستونیا از مرکز پژوهش‌های صنعتی خریداری گردید. محیط کشت مورد استفاده برای سویه‌های E. coli محیط مرسوم لوریا برتانی (Loria Bertani) بود و جهت کشت باکتری رالستونیا از محیط کشت پیا (PYEA) استفاده گردید.

به منظور کلون کردن اپران PHB از پلاسمید pUC ۱۸ استفاده گردید که از بانک پلاسمید انستیتو پاستور تهیه شد. جهت کلون کردن ژن لیز E نیز از پلاسمید pMR ۱۰۳ استفاده شد که از شرکت ATCC خریداری گردید.

DNAی فاژ فی ایکس ۱۷۴ (φX۱۷۴) نیز از شرکت سیناژن خریداری گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی (PCR) و تعیین توالی جهت تأیید باکتری رالستونیا یوتروفای خریداری شده توسط پرایمرهای عمومی ۱۶S rDNA واکنش PCR انجام پذیرفت و قطعه‌ی تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت بیونیر ارسال گردید. پرایمرها PCR به شرح زیر است:

Forward: ۵´- cct acg gga ggc agc ag - ۳´

Reverse: ۵´- gac gtc rtc cnc dcc ttc ctc - ۳´

که r= (a/g)، d= (a/g/t) و n= (a/t/c/g)

این پرایمرها قطعه‌ای به طول ۸۵۰ bp را تکثیر می‌کنند.

مخلوط PCR بر اساس الگوی عمومی مورد استفاده جهت تیوپ ۲۵ µl عبارت بود از: ۱۲ µl (۵۰ µl) MgC، ۰/۸ µl (۲ mM) dNTPs، ۲/۵ µl

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بافر X PCR ۱۰ µl ۲/۵، DNAی الگو (ژنومی) µl ۲، پرایمرها (۲۰ pmol) µl (۰/۵ +۰/۵)، Taq پلی‌مراز (۵ Unit/µl) µl ۰/۲۵، ddH ۲O µl ۱۶.

برنامه‌ی واکنش PCR عبارت بودند از: واسرشت سازی اولیه (Pre-denaturation) ۳ دقیقه در ۹۵ °C، واسرشت سازی ۱ (Denaturation) دقیقه در ۹۵ °C، اتصال پرایمرها ۳۰ ثانیه در ۵۸ °C، پلی‌مریزاسیون ۵۰ ثانیه در ۷۲ °C، گسترش نهایی (Final extension) ۵ دقیقه در ۷۲ °C که سه مرحله‌ی میانی به صورت چرخه‌ای ۳۵ بار تکرار گردید.

جهت تکثیر ایران phb از پرایمرهای زیر که بر اساس ناحیه‌ی همولوژی ژنوم سویه‌ی H ۱۶ طراحی شده بود و جهت کلون کردن در پلاسمید pUC ۱۸ جایگاه برش آنزیم محدوده‌ای EcoRI در طرفین آن قرار داده شده بود استفاده گردید:

Forward: ۵´- attaatgaattcttctcagcgctgtggcaggc- ۳´

Reverse: ۵´- attaatgaattcatgcgagcgctggctgagtg -۳´

شرایط مخلوط PCR عبارتند از: MgC ۱۲ (۵۰mM) µl ۰/۸، dNTPs (۲ mM) µl ۲/۵، بافر X PCR ۱۰ µl ۲/۵، DNAی الگو (ژنومی) µl ۲، پرایمرها (۲۰ pmol) µl (۰/۵ +۰/۵)، LA Taq پلی‌مراز (۵ Unit/µl) µl ۰/۲۵، ddH ۲O µl ۱۶.

برنامه‌ی واکنش PCR عبارتند از: واسرشت سازی اولیه ۳ دقیقه در ۹۵ °C، واسرشت سازی ۱ دقیقه در ۹۵ °C، اتصال پرایمرها ۳۰ ثانیه در ۵۷ °C، پلی‌مریزاسیون ۵ دقیقه در ۷۲ °C، گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C که سه مرحله‌ی میانی به صورت چرخه‌ای ۳۰ بار تکرار گردید.

جهت تکثیر ژن لیز E از پرایمرهای ذیل استفاده گردید که یک جایگاه برش NcoI در اپایانه‌ی ´۵ و یک جایگاه برش با آنزیم BamHI در پایانه‌ی ´۳ آن قرار داده شد. توالی پرایمرها به شرح زیر است:

Forward: ۵´- catgccatgggtacgctggactttgtgg-۳´

Reverse: ۵´-gcgcctagtcactccttccgcacgtaa-۳´

محتویات تیوپ PCR عبارتند از: MgC ۱۲ (۵۰mM) µl ۰/۸، dNTPs (۲ mM) µl ۲/۵، بافر X PCR ۱۰ µl ۲/۵، DNAی الگو (ژنومی) µl ۲، پرایمرها (۲۰ pmol) µl (۰/۵ +۰/۵)، Taq پلی‌مراز (۵ Unit/µl) µl ۰/۲۵، ddH ۲O µl ۱۶.

برنامه‌ی PCR عبارتند از: واسرشت سازی اولیه ۳ دقیقه در ۹۴°C، واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، اتصال پرایمرها ۳۰ ثانیه در ۶۳ °C، پلی‌مریزاسیون ۱ دقیقه در ۷۲ °C، گسترش نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ °C که سه مرحله‌ی میانی به صورت چرخه‌ای ۳۰ بار تکرار گردید.

کلیه‌ی پرایمرها به کمک نرم‌افزار GENE RUNNER نسخه‌ی ۳/۰۵ و نیز بررسی چشمی ناحیه‌ی مورد نظر طراحی گردیدند و به منظور نداشتن اشکالات ساختاری و برهم کنش‌های مزاحم با همان نرم‌افزار بررسی گردیدند. سپس جهت بررسی اختصاصیت توسط نرم‌افزار بلست (BLAST) در سایت NCBI بررسی شدند.

محصولات PCR پس از تکثیر بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند و جهت تأیید صحت کلون شدن جهت تعیین توالی به شرکت بیونیر ارسال گردیدند. سپس هضم آنزیمی طبق روش مرسوم انجام پذیرفت.

کلون نمودن

محصولات PCR پس از هضم آنزیمی مطابق روش کلرید کلسیم ذکر شده در کتاب کلون کردن مولکولی [۱۶] به وکتور مورد نظر پیوند (Ligation) داده شدند و سپس هر کدام از آنها به طور مجزا به باکتری E. coli DH۵α منتقل گردیدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب از این باکتری استخراج شدند و پس از تأیید از نظر داشتن قطعه‌ی الحاقی (Insert) به E. coli سویه‌ی (BL ۳) DE ۲۱ منتقل گردیدند.

استخراج DNA از ژل ۲۱

استخراج DNA از ژل توسط کیت Gel purification kit محصول شرکت بیونیر و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی آن شرکت انجام گرفت.

رنگ آمیزی باکتری‌ها

به منظور اطمینان از آلوده نبودن سویه‌ی رالستونیا یوتروفا از رنگ آمیزی گرم استفاده شد. روش رنگ آمیزی به طور خلاصه به شرح زیر است: سوسپانسیون باکتری تثبیت شدن روی لام را به ترتیب در معرض کریستال ویوله و لوگول قرار می‌دهیم. سپس نمونه را توسط استون الکل شستشو می‌دهیم و در معرض محلول سافرانین قرار می‌دهیم و در نهایت پس از شستشو و خشک کردن در زیر میکروسکوپ نمونه را بررسی می‌نماییم.

جهت بررسی صحت عملکرد اپران phb انتقال داده شده به E. coli و تولید گرانول‌های PHB از رنگ آمیزی توسط سودان سیاه استفاده

گردید که پروتکل آن اجمالاً به شرح زیر است: پس از تهیه‌ی گسترش باکتریایی آن را در معرض سودان سیاه به مدت ۱۰ دقیقه قرار می‌دهیم. پس از شستشو با آب و خشک کردن نمونه، آن را با زایلن شستشو می‌دهیم و در نهایت آن را در معرض سافرانین قرار می‌دهیم و پس از شستشو مورد مشاهده قرار می‌دهیم.

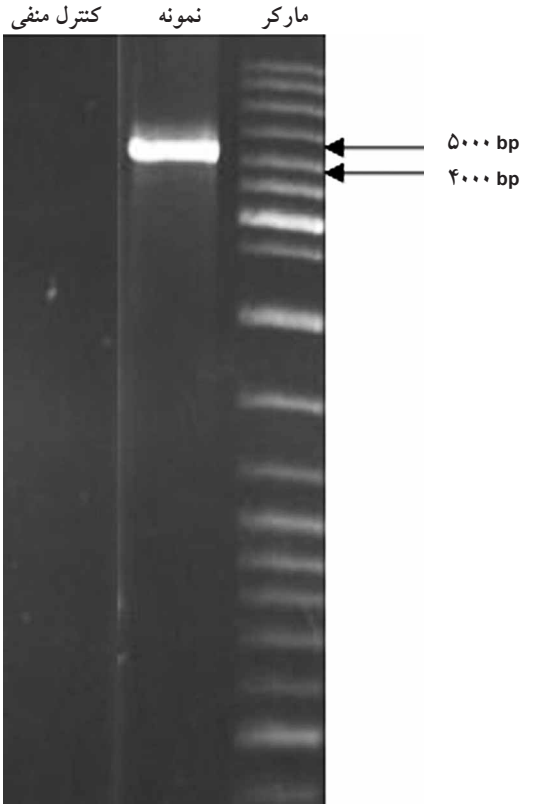
یافته‌ها

تأیید سویه‌ی باکتری

نتیجه‌ی رنگ آمیزی گرم سویه‌ی خریداری شده‌ی رالستونیا یوتروفا خلوص باکتری را تأیید می‌نمود ونتایج تعیین توالی حاکی از شباهت۹۹٪ با سویه‌ی H ۱۶ این باکتری داشت. (داده نشان داده نشده‌اند)

تکثیر اپران phb و ژن لیز E

پس از تکثیر اپران phb یک باند بر روی ژل آگارز به دست آمد (شکل ۱) که از ژل استخراج گردید. همچنین ژن E تکثیر گردید و یک باند در ناحیه‌ی مورد نظر به دست آمد (شکل ۲) که این باند نیز از ژل استخراج گردید. این محصولات استخراج شده جهت استفاده در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.



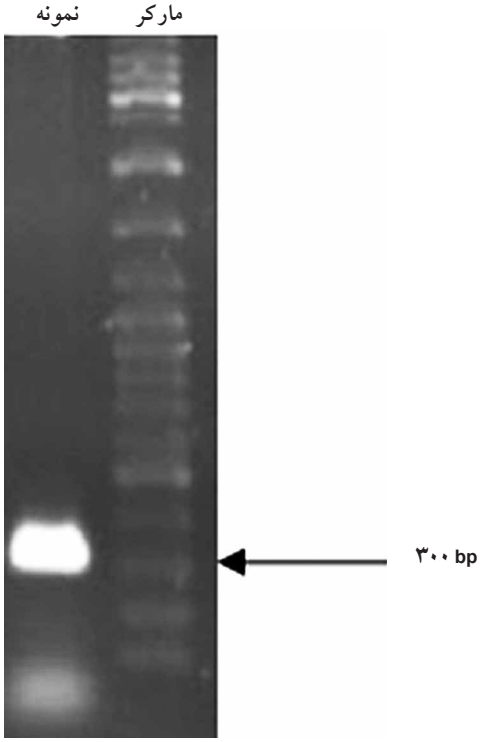
شکل ۱- نتیجه‌ی تکثیر اپران phb. باند تشکیل شده بین باندهای ۴۰۰۰، ۵۰۰۰ مارکر می‌باشد.

کلونینگ

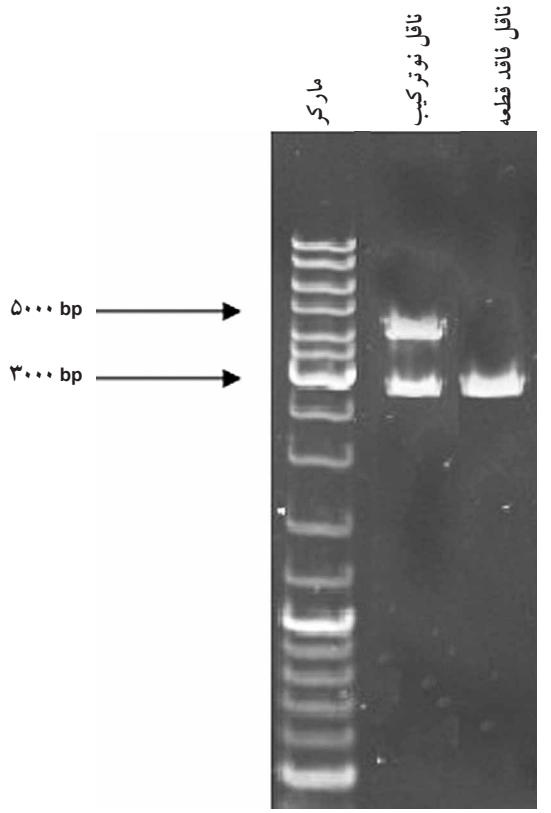
اپران phb در ناقل pUC ۱۸ کلون گردید و تأیید وجود الحاق در ناقل از طریق هضم آنزیمی و مقایسه با ناقل بدون الحاق انجام گرفت. (شکل۳) به طریق مشابه ژن لیز E نیز در ناقل بیانی ۱۰۳ pMR کلون گردید و وجود الحاق در آن مورد بررسی قرار گرفت. (شکل ۴) در نهایت هر دو پلاسمید با همدیگر به E. coli سویه‌ی (BL ۳) DE ۲۱ انتقال داده شدند. (شکل ۵)

القا ژن لیز E

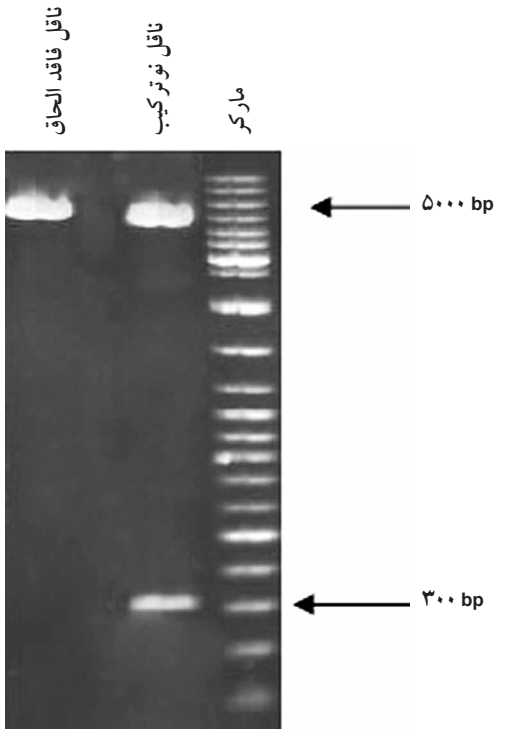
جهت بررسی القاء ژن E از کشت باکتری تراریخته شده و باکتری که تنها با ناقل فاقد الحاق تراریخته شده بود در OD یکسان نمونه گیری شد و سپس به هر دو نمونه مقدار یکسانی از IPTG اضافه گردید و در ادامه در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه‌ای OD نمونه بررسی گردید. (شکل ۶)



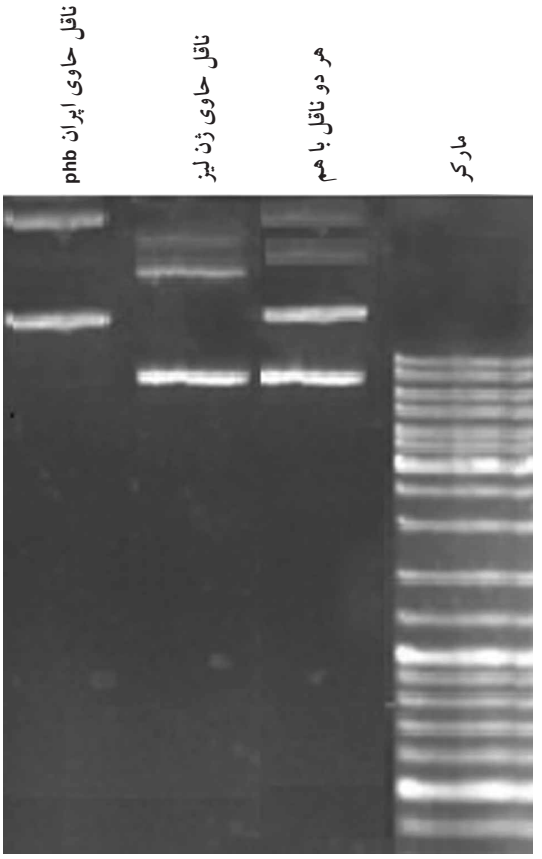
شکل ۲- نتیجه تکثیر ژن لیز E. باند ۳۰۰ که مورد انتظار است تشکیل شده است.



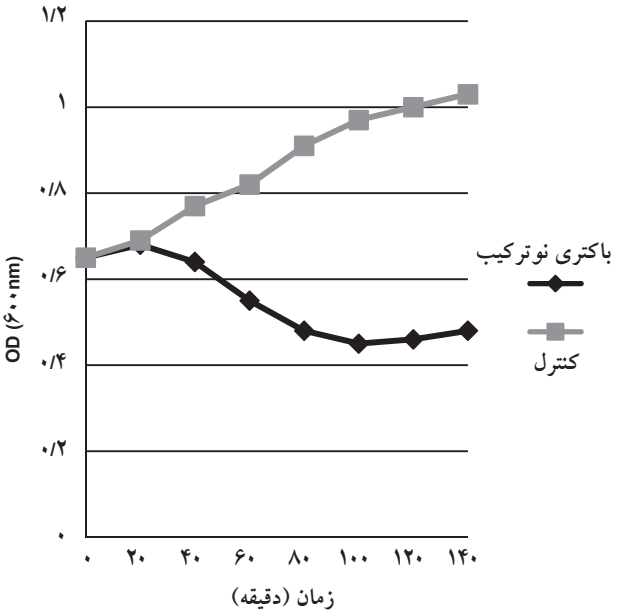
شکل ۳- تأیید وجود الحاق در ناقل نوترکیب. باند ۳۰۰۰ نوکلئوتیدی مربوط است به ناقل و باند بین ۴۰۰۰-۵۰۰۰ نوکلئوتید مربوط است به الحاق.



شکل ۴- بررسی وجود الحاق در ناقل. باند ۳۰۰ نوکلئوتیدی مربوط است به ژن لیز و باند ۵۰۰۰ نوکلئوتیدی مربوط به ناقل می‌باشد.



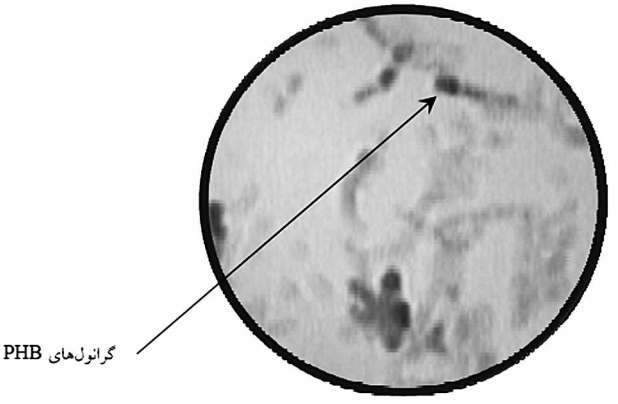
شکل ۵- همان طور که در شکل دیده می‌شود در ستون (line) مربوط به هر دو ناقل، باندهای مربوط به هر دو ناقل که در ردیف‌های مجاور به عنوان شاخص ارائه شده‌اند دیده می‌شود.



شکل ۶- نمودار مربوط به لیز باکتری در اثر القا. منحنی قرمز کنترل و منحنی آبی باکتری تراریخته با ژن E را نشان می‌دهد. زمان صفر زمانی است که القاگر به هر دو نمونه اضافه می‌شود.

بررسی تولید PHB

جهت بررسی تولید PHB در باکتری نوترکیب از رنگ آمیزی سودان سیاه استفاده شد. (شکل ۷)



شکل ۷- رنگ آمیزی باکتری‌های نوترکیب دارنده‌ی اپران phb. لکه‌های سیاه رنگ گرانول‌های PHB را نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری

برای تولید پلاستیک‌های سازگار با محیط زیست با منشأ زیستی روش‌های گوناگونی در دست است. برای مثال این امکان وجود دارد که سویه‌های طبیعی تولید کننده‌ی این ترکیبات را به صورت صنعتی کشت نماییم. این امر اگرچه در ابتدا جالب توجه به نظر می‌رسد، اما مشکلات حین فرآیند مانع از تولید گسترده‌ی صنعتی با هزینه‌ی قابل قبول می‌گردد و تا کنون عمده مانع بر سر راه استفاده‌ی تجاری از این ترکیبات و جایگزین شدن کامل آنها به جای پلاستیک‌های صنعتی همین مسأله‌ی هزینه بوده است. سویه‌های تولید کننده‌ی طبیعی این ترکیبات دوره‌ی رشد طولانی دارند و برای ذخیره کردن این ترکیبات بایستی محیط کشت آنها را از شرایط بهینه خارج نمود که این امر خود دوره‌ی رشدی آنها را طولانی‌تر نیز می‌نماید. همچنین استحصال محصول نیز در آنها به آسانی صورت نمی‌گیرد. و روش‌های مهندسی ژنتیک نیز برای آنها بهینه سازی نشده است. به علاوه آنها معمولاً مسیرهایی نیز برای هضم پلی‌استرهای تولید شده دارند که طبیعتاً به کاهش میزان محلول می‌انجامد [۶، ۱۰، ۱۱].

راه حل جایگزین این است که ژن‌های بیوسنتزی این پلی‌مرها را به میزبان‌های مناسبی انتقال دهیم که اول به سهولت قابل دست ورزی باشند و دومً روش‌های مهندسی ژنتیک و نیز استحصال محصول در آنها بهینه شده باشد. یکی از این ارگانیزم‌ها E. coli است. E. coli علاوه بر موارد یاد شده دوره‌ی رشدی کوتاهی دارد و سوبستراهای ارزان قیمت برای آن جهت تولید صنعتی محصول تهیه شده است. همه‌ی اینها نوید تولید ارزان قیمت‌تر این محصول را می‌دهد. مطالعات بسیاری نشان داده است که E. coli در صورت انتقال ژن‌های مورد نیاز توانایی تولید این پلی‌مرها را دارد. به علاوه بررسی‌های ساختار پروموتر اپران phb حاکی از این است که این اپران با استفاده از پروموتر خود می‌تواند در E. coli با کارآمدی بالایی بیان شود [۵-۱۱].

نتایج آزمایشات تعیین هویت سویه‌ی رالستونیایی که در اختیار ما قرار داشت حاکی از مشابهت ۹۹٪ با سویه‌ی H ۱۶ این باکتری بود که در بیشتر فعالیت‌های صنعتی جهت تولید پلاستیک‌های زیستی از آن استفاده می‌شود. به همین دلیل اینکه جهت طراحی پرایمر به منظور به دست آوردن اپران phb از توالی این باکتری استفاده گردد به نظر منطقی بود. پس از طراحی نیز نتیجه آزمایشات، انتظارات را برآورد نمود و قطعه‌ای با اندازه‌ی دلخواه به دست آمد که آزمون تعیین توالی جزیی دو طرفه نیز صحت قطعه‌ی به دست آمده را تأیید نمود. به همین دلیل این توالی که حاوی توالی پروموتری و نیز پایان رونویسی باکتری مبدأ نیز بود در ناقل pUC ۱۸ الحاق شد و در میزبان کلون گردید. بررسی باکتری نوترکیب با رنگ آمیزی سودان سیاه حاکی از تولید گرانول‌های PHB بود. در مطالعات بسیار دیگری نیز انتقال ژن‌های این اپران منجر به تولید قابل ملاحظه‌ی پلی‌مر در باکتری میزبان انجامیده بود [۱۷، ۱۸]. در برخی از این مطالعات هر کدام از ژن‌های بیوسنتزی به طور مجزا انتقال داده شده بودند، اما برخی دیگر نظیر مطالعه‌ی حاضر هر سه ژن را با یکدیگر انتقال داده بودند. نکته‌ی شایان توجهی که در این مطالعات آمده است این است که اول پلی‌مر بخش اعظم وزن خشک باکتری را تشکیل می‌دهد، و دوم کیفیت این پلی‌مر به لحاظ وزن مولکولی بهتر از پلی‌مری است که در ارگانیزم مبدأ تولید می‌گردد [۱، ۹، ۱۷]. بخش اعظم هزینه‌ی تولید پلی‌مرهای زیستی مربوط به استحصال محصول است. روش‌های گوناگونی جهت لیز کردن و خارج نمودن PHB وجود دارد. اما این روش‌ها کیفیت پلی‌مر را پایین می‌آورند، خود هزینه‌ای به فرآیند می‌افزایند، و در پاره‌ای موارد خود آلودگی

را اضافه می‌کنند که بایستی مورد پالایش و حذف قرار گیرند و حتی بدتر از آن باعث آلودگی زیست محیطی گردند [۱۰، ۱۹-۲۱]. روش لیز باکتری توسط ژن لیز Eروش بسیار مناسبی است که معایب روش‌های دیگر را ندارد. چرا که در این روش نیازی به اضافه کردن ترکیبات بسیاری جهت لیز باکتری‌ها نیست و از آنجا که روش بسیار ملایمی است به تخریب گرانول‌های PHB نیز نمی‌انجامد. بلکه در این روش تونلی در غشا باکتری ایجاد می‌شود و اختلاف فشار اسمزی درون و بیرون باکتری سبب خروج ناگهانی محتویات باکتری به محیط می‌شود. خود این امر یک مرحله تصفیه‌ی محصول از غشاهای سلولی و اندوکسین باکتریایی را به همراه دارد [۲۲]. به علاوه اینکه این گرانول‌ها تمایل دارند تا به یکدیگر متصل شوند که باز هم ادامه‌ی مراحل تصفیه را تسهیل می‌کند [۳]. مطالعات میکروسکوپ الکترونی اشباح باکتریایی ایجاد شده حاکی از کارآیی بالای خروج گرانول‌ها از باکتری‌ها است [۳]. بررسی OD نمونه پس از القا نشان می‌دهد که غلظت باکتری پس از فعال شدن ژن لیز به سرعت کاهش می‌یابد. البته در ادامه OD نمونه شروع به افزایش یافتن می‌نماید. این نتایج مشابه مطالعه‌ی دیگری است که با این روش انجام گرفته است و علت آن تجمع یافتن گرانول‌های PHB در محلول است که خود دارای جذب می‌باشند [۳]. البته در آن مطالعه از القای حرارتی استفاده شده است که در آن روش باکتری بایستی در دمای ۳۰ °C رشد داده شود که سرعت رشد باکتری را کند می‌نماید و در نتیجه فرآیند تولید را طولانی‌تر می‌نماید. اما در روشی القای شیمیایی که در این مطالعه به کار گرفته شده است باکتری در دمای بهینه‌ی رشد خود رشد می‌نماید و لذا سرعت رشد آن طبیعی خواهد بود. البته باید دید هزینه‌ی القاگر شیمیایی در مقایسه با هزینه‌ی ناشی از طولانی‌تر شدن دوره‌ی رشد باکتری چه نسبتی دارد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از دکتر علی مجیدی، رئیس بهداری کل ناجا که این مطالعه با حمایت ایشان انجام پذیرفت. همچنین با تشکر از سرکار خانم شادی باقری که در انجام برخی از مراحل کار یاریمان نمودند.

References

1- Suriyamongkol P. et al. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. Biotechnology Advances, 2007. 25: p. 28.
2- Available from: <http: //en.wikipedia.org/wiki/Bioplastic> <http: //www.bioplastics24.com/content/view/1342/2/lang, en/>.
3- Resch S et al. Aqueous release and purification of poly (b-hydroxybutyrate) from Escherichia coli. Journal of Biotechnology, 1998; 65: 10.
4- Rawte T, Mavinkurve S. Characterization of polyhydroxy alkanoates – Biodegradable plastics from marine bacteria. Current Science, 2002;83: 3.
5- Matsusaki H, et al. Cloning and Molecular Analysis of the Poly (3-hydroxybutyrate) and Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in Pseudomonas sp. Strain 61-3. Journal of Bacteriology, 1998;180: 9.
6- Madison LL, Huisman GW, Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999; 63: 33.
7- Peoples OP, Sinskey AJ, Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) Biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16 The Journal of Biological Chemistry, 1989;248 (25): 6.
8- Anderson AJ, Dawes EA, Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews, 1990; 54: 23.
9- Zhang Li, Qi Q, The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli. Bioresource Technology, 2007; 98: 8.
10- Punrattanasin W. The Utilization of Activated Sludge Polyhydroxyalkanoates for the Production of Biodegradable Plastics, in Environmental Science and Engineering. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University: Blacksburg, VA. 2001;p. 131.
11- Reddy CSK, et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource Technology, 2003;87: p. 10.
12- Kalousek S, Lubitz W. High-level poly (beta-hydroxybutyrate) production in recombinant Escherichia coli in sugar-free, complex medium.. can J. microbiol, 1995. 41 (1): p. 6.
13- Choi JI, Lee SY, Han K, Cloning of the Alcaligenes latus Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Genes and Use of These Genes for Enhanced Production of Poly (3-hydroxybutyrate) in Escherichia coli. Applied And Environmental Microbiology, 1998;64: p. 7.
14- Hori K, et al. Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. Applied Microbiology And Biotechnology, 2002; 59: p. 6.

15- Young KD, Young R. Lytic Action of Cloned phiX174 Gene E. Journal of Virology, 1982; 44: p. 10.
16- Sambrook J, Russell DW, Molecular Cloning a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. third ed. Vol. 1. 2001.
17- Zhang H, et al. Production of Polyhydroxyalkanoates in Sucrose-Utilizing Recombinant Escherichia coli and Klebsiella Strains. Applied And Environmental Microbiology, 1994. 60 (4): p. 8.
18- Kidwell J, Valentin HE, Dennis D. Regulated Expression of the Alcaligenes eutrophus pha Biosynthesis Genes in Escherichia coli. Applied And Environmental Microbiology, 1995. 61 (4): p. 8.
19- Hejazi P, Vasheghani-Farahani E, Yamini Y. Supercritical Fluid Disruption of Ralstonia eutropha for Poly (beta-hydroxybutyrate) Recovery Biotechnol. Prog. 2003; 19: p. 5.
20- Chen, Y, et al. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from Alcaligenes eutrophus by surfactant–chelate aqueous system. Process Biochemistry, 1999;34: p. 5.
21- Ojumu TV, Yu J, . Solomon BO, Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African Journal of Biotechnology, 2004; 3 (1): p. 7.
22- Schroll G, et al. Heterologous phiX174 gene E-expression in Ralstonia eutropha: E-mediated lysis is not restricted to gamma-subclass of proteobacteria. Journal of Biotechnology, 1998; 66: p. 7.

Inverted metabolic engineering of E.coli to produce PHB and simplifying of lysis process, using gene E from phage PhiX174

Shirzad. H; MD[1], *Saadati. M; PhD[2], Sistani. R, N; Mcs[3]

Received: 8 Feb 2010 Accepted: 13 May 2010

Abstract

Background: The polyhydroxybutyrate biosynthetic genes of Ralstonia eutropha are organized in single operon. There are many studies which show that this operon could be cloned in gram negative bacteria like E. coli. As its original promoter could work efficiently in E. coli, there is no need to change it with host ones. Granule extraction is one of the most important considerations of industrial production of PHB. Solvent base or physical approaches increase the cost of production and compromise the integrity of PHB granules. Therefore, E mediated lysis was used in this study to extract the granules.

Materials and Methods: In this study, the whole operon of phb from Ralstonia eutropha and E gene from phage phiX174 were obtained by PCR technique, and cloned transferred to E. coli by separate plasmids. To control the lysis process, the chemical inducible system was used.

Results: Bacterial cells which have both plasmids could produce high levels of PHB, and their PHB content could be released into the medium, nearly perfectly, at the correct time by adding IPTG as a chemical inducer.

Conclusion: This method could be used to produce and extract PHB with more cost effectiveness in industrial scales.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, Ralstonia eutrophia, Phage phiX174, Biodegre adable Plastics

1- Researcher, Emam Hossein University, Basic Science Faculty, dept of biology, medical doctor, PhD Student, Iran, Tehran
2- (*Corresponding author) Associate Professor, Emam Hossein University, Basic Science Faculty, dept of biology, Iran, Tehran
Tel: 021-66748872 E-mail: Saadati_m@yahoo.com
3- Researcher, Tarbiat Modarres University, PhD Student, Iran, Tehran