

جداسازی ژن بتاکتوتیولاز (*bktB*) از باکتری *Ralstonia eutropha* PTCC1615

جهت اصلاح خصوصیات پلاستیک‌های تجزیه پذیر زیستی

محدثه محسن پور^{۱*}، نور امیر مظفری^۲، ناصر قائمی^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیشناسی، تهران، ایران: صندوق پستی: ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵

۳- دانشگاه تهران، دانشکده علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

mhdsmhs@yahoo.com

چکیده

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs)، ماکرومولکول‌های پلی‌استری هستند که به طور طبیعی توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند جایگزین مناسبی برای پلاستیک‌های مرسوم باشند. بر خلاف پلاستیک‌های مشتق شده از مواد نفتی که تجزیه آنها ده‌ها سال به طول می‌انجامد، PHAها در طول یک سال توسط انواعی از میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌شوند. نتیجه این تجزیه، دی‌اکسید کربن و آب است که به طبیعت برمی‌گردند. هدف از این تحقیق، جداسازی ژن بتاکتوتیولاز (*bktB*) از باکتری *Ralstonia eutropha* PTCC1615 سویه H۱۶ بوده است که در اصلاح خصوصیات بیوپلاستیک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنزیمی که توسط این ژن کد می‌شود، یک مرحله کلیدی را در تشکیل کوپلیمرهای تجزیه پذیر زیستی کنترل می‌کند. در این تحقیق، طراحی پرایمرهای اختصاصی به منظور جداسازی این ژن، انجام گرفت و ORF کامل این ژن توسط PCR از ژنوم باکتری *R. eutropha* جدا شد. صحت جداسازی به طور اولیه توسط Nested PCR و سپس توسط تعیین توالی مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به ویژگی‌های فیزیکی مثبت کوپلیمرها در صنعت، از جمله استحکام، انعطاف پذیری و سرعت تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌های محیط، جداسازی این ژن می‌تواند گامی مؤثر در جهت تولید پلاستیک‌های تجزیه پذیر زیستی با خصوصیات مطلوب تر باشد.

کلمات کلیدی: بیوپلاستیک، بتاکتوتیولاز، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها، کوپلیمر، *Ralstonia eutropha* PTCC1615.

مقدمه

با توجه به اینکه عده‌ای از میکروارگانسیم‌ها، پلی‌بتا‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) را به صورت کربن آلی ذخیره می‌کنند، می‌توان از آنها جهت تولید بیوپلیمرها استفاده نمود. مواد بیوپلیمری که توسط میکروارگانسیم‌ها ساخته می‌شوند، در چرخه‌های بیولوژیک قرار گرفته و به سرعت به محیط زیست برمی‌گردند. پس هیچگاه منابع آنها محدود و تمام شدنی نیست در حالی که مواد پلیمری و پلاستیکی امروزی از سوخت‌های فسیلی ساخته می‌شوند که با توجه به محدود بودن منابع نفتی باید به تدریج با بیوپلیمرهایی که از منابع تجدیدشونده ساخته می‌شوند، جایگزین گردند. از سوی دیگر 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 ارزش چندانی ندارند، کاری غیر اقتصادی است (۱۰ و ۱۲).

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB)، یک پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA) است که توسط سه آنزیم مسیر بیوسنتزی شامل بتاکتوتیولاز، استواستیل CoA ردوکتاز و PHB سنتاز تولید می‌شود. این سه آنزیم به ترتیب توسط *phbA*، *phbB* و *phbC* کد می‌شوند که در باکتری *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) به صورت یک اپران سه ژنی *phaCAB* قرار دارند. ابتدا دو مولکول استیل CoA توسط بتاکتوتیولاز با هم ترکیب شده و استواستیل CoA تشکیل می‌شود. استواستیل CoA توسط استواستیل CoA ردوکتاز به R-۳-هیدروکسی‌بوتیریل CoA، تبدیل می‌شود. مولکول حاصل توسط آنزیم PHB سنتاز، پلیمریزه

شده و PHB را تشکیل می‌دهد (۱، ۱۰ و ۱۱).

اما هوموپلیمر PHB، به تنهایی یک بیوپلاستیک نسبتاً سفت و کم دوام (شکننده) است که فراوری آن مشکل می‌باشد. زیرا در 10°C بالاتر از نقطه ذوب (170°C) تجزیه می‌شود. کوپلیمرهایی که از هیدروکسی‌بوتیرات (HB) و یکی از مونومرهای زنجیره بلند مثل هیدروکسی‌والرات (HV) تشکیل می‌شوند، قابلیت انعطاف زیاد و دوام بیشتری دارند. بنابراین پلاستیک‌های متشکل از کوپلیمرهای P(HB-HV)، خصوصیات مطلوب‌تری دارند.

خواص فیزیکی این کوپلیمرها نسبت به درصد مولی ۳-هیدروکسی‌والرات (3HV)، بسیار حساس است. با افزایش درصد مولی 3-HV، درجه حرارت تجزیه، ثابت باقی مانده اما درجه حرارت ذوب به طور فزاینده‌ای کاهش می‌یابد. به همین طریق انعطاف پذیری و استحکام چندین برابر بهبود می‌یابد (۳ و ۶).

یک مرحله لازم در تولید این کوپلیمر، تشکیل بتا-کتووالریل CoA است. نقش اساسی در تولید بتاکتووالریل CoA بر عهده ژن *bktB* است که خارج از اپران سه ژنی تولید PHB در کروموزوم باکتری *R. eutropha* قرار دارد. ژن *bktB* آنزیم کتوتیولازی را کد می‌کند که با ترکیب استیل CoA و ترکیبات سه کربنه‌ای مانند پروپیونیل CoA باعث تشکیل والریل CoA می‌شود. پروپیونیل CoA می‌تواند از مسیر سنتز یا اکسیداسیون اسیدهای چرب و یا از طریق افزودن پروپیونیک‌اسید در محیط کشت باکتری فراهم شود (۲). سپس آنزیم PHA سنتاز باعث تشکیل هیدروکسی‌بوتیرات والرات و پلیمریزه شدن آن به صورت P(HB-HV) می‌شود. با توجه به این که کوپلیمر PHBV، خصوصیات فیزیکی بهتری نسبت به

(۲). درصد) و پروتئیناز K، به مدت ۲ ساعت در 56°C گرماگذاری شد. سپس هم حجم آن فنل / کلروفرم با نسبت ۱:۱ اضافه شد و پس از سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه)، سه فاز شامل فاز فنلی، فاز پروتئینی و فاز آبی قابل مشاهده بود که فاز آبی به میکروتیوب دیگری منتقل و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. مجدداً پس از سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه)، فاز آبی به میکروتیوب جدیدی منتقل شد. در مرحله بعد DNA موجود در فاز آبی با اضافه کردن الکل سرد ۹۶ درصد و سانتریفیوژ با دور بالا (۱۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) رسوب داده شد. سپس رسوب DNA با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد و در آب مقطر دو بار تقطیر حل شد (۱۰).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

PCR با طراحی پرایمرهای اختصاصی^۱ برای تکثیر ORF کامل ژن *bktB* مربوط به باکتری *R. eutropha* از DNA ژنومی این باکتری به عنوان DNA الگو انجام شد. پرایمرهای طراحی شده عبارت اند از: F: 5' CCT CAT GGA GAC 3' و R: 5' CTA ACC TCA AAA GTC 3' و 3' GAT ACG CTC 5'. طول قطعه مورد انتظار تکثیرشونده توسط این دو پرایمر ۱۲۰۹ bp خواهد بود. ترکیب واکنش ۲۰ میکرولیتری PCR شامل یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۱۵ نانوگرم DNA، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ μM)، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر MgCl_2 (۵ mM)، ۲ میکرولیتر بافر PCR 10x

PHB دارد پس کاربردهای اقتصادی بیشتری خواهد داشت (۴ و ۱۰). بنابراین، جداسازی ژن *bktB* که نقش اصلی را در تولید این کوپلیمر دارد، هدف اصلی این پژوهش بوده است که می‌تواند مقدمه‌ای برای استفاده از آن در تحقیقات دیگری برای تولید بیوپلاستیک با خصوصیات مطلوب تر باشد.

مواد و روشها

در این تحقیق از باکتری *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) سویه H۱۶ (PTCC1615)، با شماره ATCC17699 استفاده شد که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی عفونی ایران تهیه گردید.

کشت باکتری

باکتری *R. eutropha* که به صورت لیوفیلیزه تهیه شده بود، در محیط کشت مایع (LB) Luria (LB) و Bertani در محیط کشت LB آگار کشت داده شد و در 28°C به مدت یک شب گرماگذاری گردید.

استخراج DNA

DNA ژنومی باکتری *R. eutropha* با استفاده از روش فنل / کلروفرم استخراج شد. در این روش ابتدا یک میلی‌لیتر از محیط کشت مایع LB که باکتری به مدت یک شب (در انکوباتور شیکردار با دمای 28°C) در آن رشد کرده بود، با استفاده از سانتریفیوژ (۷۰۰۰ دور به مدت ۷ دقیقه) رسوب داده شد. پس از خالی کردن محلول رویی و اضافه کردن بافر لیزکننده (حاوی NaCl (۱ مولار)، Tris-HCl (۱ مولار)، EDTA (۵٪، pH=۸)، SDS

۱. از نرم افزار Oligo Tech برای طراحی پرایمرها استفاده شد.

۲. پرایمرها توسط شرکت سیناژن سنتز شدند.

۹۴°C و ۳۰ چرخه، هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن ۹۴°C، یک دقیقه دمای چسبیدن ۶۰°C و ۳ دقیقه دمای تکثیر ۷۲°C و سپس ۵ دقیقه دمای تکثیر نهایی ۷۲°C انجام شد. محصول PCR Nested با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد در کنار نشانگر اندازه وزن مولکولی 1Kb DNA Ladder (Fermentas) مورد بررسی قرار گرفت. سپس محصول PCR حاوی تک باندها، برای تعیین توالی فرستاده شد.^۵

برای خالص سازی قطعه ۱۲۰۹ bp از روی ژل آگارز از میکروتیوب های حاوی فیلترهای جاذب DNA^۶ استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل آگارز روی دستگاه UV منتقل شد و محدوده بالا و پایین باندها مورد نظر با اسکالپل تیز و تمیز، با روشن کردن لحظه ای UV به سرعت برش زده شد. و پس از خاموش کردن UV، قطعه مورد نظر با دقت از روی ژل جداسازی شد. وزن این قطعه، ۵۰ میلی گرم بود که درون یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری استریل قرار داده شد. سپس سه حجم از محلول binding Gel buffer به آن اضافه و در بن ماری ۶۰°C به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. در این مدت هر ۲ تا ۳ دقیقه، محتویات میکروتیوب توسط ورتکس مخلوط شد. بعد از حل شدن قطعه ژل، رنگ محلول که نشان دهنده pH آن است مورد بررسی قرار گرفت. رنگ زرد، pH < ۷/۵ را نشان می داد. برای خالص سازی DNA از روی ژل آگارز باید قطعه کوچکتري از ژل که

(۱۵ میلی مول MgCl₂، ۵۰۰ میلی مول KCl، ۱۰۰ میلی مول Tris-HCl) بود.

برنامه PCR با ۷ دقیقه دمای اولیه واسرشته شدن ۹۴°C و ۳۵ چرخه، هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن ۹۴°C، یک دقیقه دمای چسبیدن ۵۹°C و ۳ دقیقه دمای تکثیر ۷۲°C و سپس ۱۰ دقیقه دمای تکثیر نهایی ۷۲°C انجام شد.

سپس محصول PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد در کنار نشانگر اندازه وزن مولکولی 1Kb DNA Ladder (Fermentas) بررسی شد. در مرحله بعد یک پرایمر داخلی رو به جلو^۳ با توالی 5' GCC AAG GAA TAC GAC CTC 3' طراحی شد که این پرایمر، همراه با پرایمر رو به عقب^۴ قبلی، قطعه ای از درون ژن مورد نظر را تکثیر خواهد نمود. بنابراین تکثیر قطعه ای به طول ۶۹۶ bp از داخل ژن *bktB* توسط این پرایمرها مورد انتظار بود. به این منظور محصول PCR رقیق سازی شد و Nested PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی داخلی و محصول PCR به عنوان الگو انجام گرفت.

ترکیب واکنش ۲۵ میکرولیتری Nested PCR شامل یک واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۱ میکرولیتر محصول PCR رقیق سازی شده، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ μM)، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر MgCl₂ (۵ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x PCR (۱۵ میلی مول MgCl₂، ۵۰۰ میلی مول KCl، ۱۰۰ میلی مول Tris-HCl) بود. برنامه PCR با ۵ دقیقه دمای اولیه واسرشته شدن

۵. تعیین توالی توسط شرکت تکاپوزیست در شرکت میلزن فرانسه به

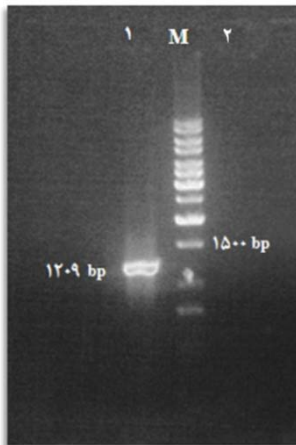
روش توالی یابی خودکار انجام شد.

۶. میکروتیوب های فیلتردار و بافرها توسط شرکت تکاپوزیست از

شرکت بایونیر تهیه شد.

3. Forward
4. Reverse

اختصاصی برای تکثیر ORF کامل ژن *bktB* از ژنوم باکتری *R. eutropha* با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد باند مورد انتظار را با طول ۱۲۰۹ bp ظاهر نمود (شکل ۱).



شکل ۱: (۱) محصول PCR با طول ۱۲۰۹ bp، (M) نشانگر اندازه وزن مولکولی (1Kb DNA Ladder (Fermentas)، (۲) کنترل منفی

بررسی محصول Nested PCR تکثیر شده با پرایمرهای داخلی اختصاصی برای تکثیر قطعه‌ای از درون ژن *bktB* نیز، با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد باند مورد انتظار با طول ۶۹۶ bp نشان داد (شکل ۲).

حاوی غلظت بالایی از DNA باشد، جدا شود و روشن کردن لحظه‌ای UV به دلیل جلوگیری از ایجاد جهش احتمالی صورت گرفت. کنترل pH محلول پس از حل شدن قطعه ژل آگارز در اتصال DNA به فیلتر بسیار مؤثر است. اگر pH محلول بیشتر از ۷/۵ باشد، رنگ محلول نارنجی یا قرمز می‌شود که می‌توان با افزودن استات سدیم (۳ مولار، pH = ۵)، آن را کاهش داد. در مرحله بعد محلول حاصل به میکروتیوب حاوی فیلتر اتصال DNA منتقل شد و پس از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه)، محلول زیری دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشوی ژل برای حذف نمک‌های موجود و ناخالصی‌های DNA اضافه شد. پس از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه)، محلول زیری دور ریخته و دو مرحله قبل مجدداً تکرار شد. فیلتر جاذب DNA در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه خشک شد و در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل قرار داده شد. سپس ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به آن اضافه و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱ دقیقه)، DNA خالص متصل شده به فیلتر، شسته شده و در آب حل می‌شود (۱۰).

نتایج

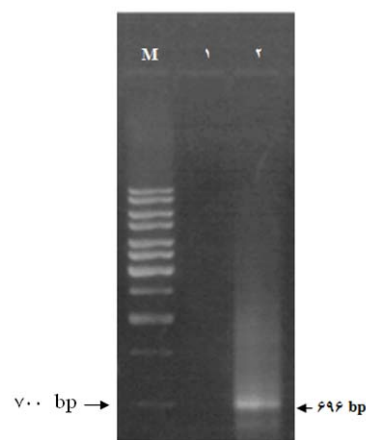
با استفاده از پرایمرهای رو به جلو و رو به عقب طراحی شده برای تکثیر ORF کامل ژن *bktB* و پرایمر داخلی رو به جلو مناسب برای Nested PCR، بهینه‌سازی PCR برای تکثیر ژن مورد نظر و Nested PCR برای تأیید اولیه صحت جداسازی صورت گرفت.

بررسی محصول PCR تکثیر شده با پرایمرهای

در برنامه Blast^۷ نوکلئوتیدی مورد جستجو قرار گرفت. برای بررسی نتایج تعیین توالی با استفاده از Blast نوکلئوتیدی موجود در سایت NCBI (آدرس الکترونیکی:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

به این صورت عمل شد که ابتدا توالی مورد نظر در پنجره Enter Query Sequence به فرمت FASTA وارد گردید و بعد از اعمال تنظیمات مورد نظر با انتخاب گزینه Nucleotide Collection (nr/nt) Highly similar و انتخاب برنامه (megablast) sequence توالی مورد نظر در بین تمام توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مورد جستجو قرار گرفت. نتایج Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی شده در شکل ۳ نشان داده شده است. توالی ردیف اول (Query) مربوط به نتیجه حاصل از تعیین توالی قطعه ۱۲۰۹ bp است و توالی ردیف دوم مربوط به توالی است که بیشترین تطابق را با توالی مورد جستجو دارد. در این بررسی توالی مربوط به ناحیه‌ای از کروموزوم شماره یک باکتری *R. eutropha* تطابق کامل با توالی مورد جستجو را نشان داد.



شکل ۲: (M) نشانگر اندازه وزن مولکولی 1Kb DNA Ladder (Fermentas)، (۱) کنترل منفی (۲) محصول Nested PCR با طول ۶۹۶ bp

باند ۱۲۰۹ bp حاصل از الکتروفورز محصول PCR از روی ژل آگارز جدا و خالص سازی شد و بررسی ژن خالص شده، با الکتروفورز یک میکرولیتر از آن روی ژل آگارز یک درصد در کنار نشانگر اندازه وزن مولکولی 1Kb DNA Ladder (Fermentas)، باند ۱۲۰۹ bp را ظاهر نمود. قطعه ۱۲۰۹ bp به صورت دوطرفه با استفاده از پرایمرهای رو به جلو و رو به عقب تعیین توالی شد و

```

>|emb|AM260479.1| Ralstonia eutropha H16 chromosome 1
Length=4052032

Score = 1967 bits (1065), Expect = 0.0
Identities = 1069/1069 (100%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      GGCACCGGCGGAGCTGGGCGCACTGGTGGTGC GCGAGGCGCTGGCGCGCGCGCAGGTGTC 60
            |||
Sbjct 1565726 GGCACCGGCGGAGCTGGGCGCACTGGTGGTGC GCGAGGCGCTGGCGCGCGCGCAGGTGTC 1565785

Query 61     GGGCGACGATGTCGGCCACGTGGTATTTCGGCAACGTGATCCAGACCGAGCCGCGCGACAT 119
            |||
Sbjct 1565786 GGGCGACGATGTCGGCCACGTGGTATTTCGGCAACGTGATCCAGACCGAGCCGCGCGACAT 1565845

Query 120    GTATCTGGGCGCGCTCGCGGCCGTC AACGGCGGGGTGACGATCAACGCCCCGCGCGTGAC 179
            |||
Sbjct 1565846 GTATCTGGGCGCGCTCGCGGCCGTC AACGGCGGGGTGACGATCAACGCCCCGCGCGTGAC 1565905

Query 180    CGTGAACCGCCTGTGCGGCTCGGGCCGTCAGGCCATTGTCAGCGCCGCGCAGACCATCCT 239
            |||
Sbjct 1565906 CGTGAACCGCCTGTGCGGCTCGGGCCGTCAGGCCATTGTCAGCGCCGCGCAGACCATCCT 1565965

Query 240    GCTGGGCGATACCGACGTCGCCATCGGGCGGCGCGGAAAGCATGAGCCGCGCACCGTA 299
            |||
Sbjct 1565966 GCTGGGCGATACCGACGTCGCCATCGGGCGGCGCGGAAAGCATGAGCCGCGCACCGTA 1566025

Query 300    CCTGGCGCCGCGCAGCGCGCTGGGGCGCACGCGATGGGCGACGCGCGCTGGTGCACATGAT 359
            |||
Sbjct 1566026 CCTGGCGCCGCGCAGCGCGCTGGGGCGCACGCGATGGGCGACGCGCGCTGGTGCACATGAT 1566085

Query 360    GCTGGGTGCGCTGCACGATCCCTTC CATCGCATCCACATGGGCGTGACCGCGGAGAAATGT 419
            |||
Sbjct 1566086 GCTGGGTGCGCTGCACGATCCCTTC CATCGCATCCACATGGGCGTGACCGCGGAGAAATGT 1566145

Query 420    CGCCAAGGAATACGACATCTCGCGCGCGCAGCAGGACGAGGCCGCGCTGGAATCGCACCG 479
            |||
Sbjct 1566146 CGCCAAGGAATACGACATCTCGCGCGCGCAGCAGGACGAGGCCGCGCTGGAATCGCACCG 1566205

Query 480    CCGCGCTTCGGCAGCGATCAAGGCCGGCTACTTCAAGGACAGATCGTCCCGGTGGTGGAG 539
            |||
Sbjct 1566206 CCGCGCTTCGGCAGCGATCAAGGCCGGCTACTTCAAGGACAGATCGTCCCGGTGGTGGAG 1566265

Query 540    CAAGGGCCGCAAGGGCGACGTGACCTTCGACACCGACGAGCACGTGCGCCATGACGCCAC 599
            |||
Sbjct 1566266 CAAGGGCCGCAAGGGCGACGTGACCTTCGACACCGACGAGCACGTGCGCCATGACGCCAC 1566325

Query 600    CATCGACGACATGACCAAGCTCAGGCCGGTCTTCGTCAAGGAAAACGGCACGGTCAACGGC 659
            |||
Sbjct 1566326 CATCGACGACATGACCAAGCTCAGGCCGGTCTTCGTCAAGGAAAACGGCACGGTCAACGGC 1566385

Query 660    CGGCAATGCGCTCGGGCCGTAACGACGCGCCGCGCGCGGTGGTGGATGATGGAGCGCGCGA 719
            |||
Sbjct 1566386 CGGCAATGCGCTCGGGCCGTAACGACGCGCCGCGCGCGGTGGTGGATGATGGAGCGCGCGA 1566445

Query 720    AGCCGAGCGCCGCGGCCGCTGAAAGCCGCTGGCCCCGCTGGTGTGCTACGGCCATGCCGGCGT 779
            |||
Sbjct 1566446 AGCCGAGCGCCGCGGCCGCTGAAAGCCGCTGGCCCCGCTGGTGTGCTACGGCCATGCCGGCGT 1566505

Query 780    GGACCCGAAAGGCCATGGGCATCGGCCCGGTGCGCGGACGAAAGATCGCGCTGGAGCGCGC 839
            |||
Sbjct 1566506 GGACCCGAAAGGCCATGGGCATCGGCCCGGTGCGCGGACGAAAGATCGCGCTGGAGCGCGC 1566565

Query 840    CGGCCTGCAGGTGTCGGACCTGGACGTGATCGAAGCCAACGAAAGCCTTTGCCGACAGGC 899
            |||
Sbjct 1566566 CGGCCTGCAGGTGTCGGACCTGGACGTGATCGAAGCCAACGAAAGCCTTTGCCGACAGGC 1566625

Query 900    GTGCGCCGTGACCAAGGCGCTCGGTCTGGACCCGGCCAAAGGTTAACCCGAAAGGCTCGGG 959
            |||
Sbjct 1566626 GTGCGCCGTGACCAAGGCGCTCGGTCTGGACCCGGCCAAAGGTTAACCCGAAAGGCTCGGG 1566685

Query 960    CATCTCGCTGGGCCACCCGATCGGGCGCCACCGGTGCCCTGATCACGGTGAAGGCGCTGCA 1019
            |||
Sbjct 1566686 CATCTCGCTGGGCCACCCGATCGGGCGCCACCGGTGCCCTGATCACGGTGAAGGCGCTGCA 1566745

Query 1020   TGAGCTGAACCGCGTGCAGGGCCGCTACGCGCTGGTGACGATGTGCATC 1068
            |||
Sbjct 1566746 TGAGCTGAACCGCGTGCAGGGCCGCTACGCGCTGGTGACGATGTGCATC 1566794

```

شکل ۳: قسمتی از نتایج Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی شده

بحث

طول هر سه پرایمر طراحی شده، ۱۸ نوکلئوتید بود و هر کدام دارای ۵۰ درصد A+T و ۵۰ درصد C+G بودند. دمای T_m هر سه پرایمر $64/5^{\circ}C$ بود که انجام واکنش PCR را امکان پذیر می ساخت. همچنین این پرایمرها از نظر عدم تشکیل هومودایمر، هتروداایمر و توالی مکمل داخلی مورد بررسی قرار گرفتند.

با توجه به این که 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، بنابراین به منظور بررسی اولیه صحت جداسازی، طراحی پرایمر داخلی صورت گرفت. در این روش محصول PCR اول به عنوان DNA الگو برای PCR دوم با پرایمرهای داخلی مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین واکنش دوم باید محصول کوچکتری نسبت به واکنش اول ایجاد کند (۵). باند حاصل از Nested PCR صحت قطعه جدا شده را به طور اولیه اثبات نمود (شکل ۲).

تعیین توالی قطعه مورد نظر برای اطمینان از صحت توالی جدا شده برای استفاده در اهداف بعدی مورد نیاز بود. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم افزار Chromas مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که اندازه باند، ۱۲۰۹ bp و بیشترین طول قابل خوانش در تعیین توالی، ۹۵۰ bp بود، بنابراین قطعه مورد نظر به صورت دو طرفه توالی یابی شد که نتایج حاصل بر هم منطبق بود. همچنین بعضی از نوکلئوتیدهای ناخوانای انتهای توالی خوانده شده توسط پرایمر رو به جلو در توالی خوانده شده با پرایمر رو به عقب مشخص شدند (و بالعکس).

مقایسه و بررسی نتایج Blast نوکلئوتیدی قطعه توالی یابی شده، با توالی های موجود در بانک ژن انطباق

نوکلئوتیدهای این توالی را با cds ژن *bktB* اثبات نمود (شکل ۳). ابتدا این مقایسه نشان داد که این ژن با ناحیه ای از کروموزوم شماره یک باکتری *Ralstonia eutropha* با شماره دستیابی^۱ AM260479.1 که توسط Pohlmann و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده بود (۷)، هومولوژی کامل دارد. به طوری که قطعه توالی یابی شده، با نوکلئوتید ۱۵۶۵۷۲۶ تا ۱۵۶۶۷۹۴ کروموزوم شماره یک این باکتری منطبق بود که حضور این ژن را در کروموزوم مذکور تأیید می کرد. آنالیزهای بعدی نشان داد که این ناحیه از کروموزوم شماره یک، مربوط به ژن *bktB* با شماره دستیابی AF026544 است که توسط Slater و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش شده بود (۹).

ژن *bktB* را می توان پس از کلون سازی تحت یک پیشبر خودسرشت قرار داد. با انتقال این کاست ژنی به باکتری تولید کننده پلی هیدروکسی آلکانوات، انتظار می رود که بیان آنزیم بتا کتوتیولاز برتری که توسط این ژن کد می شود، موجب گردد تا میزان تولید کوپلیمر P(HB-HV) نسبت به هوموپلیمر PHB افزایش یابد.

افزایش تولید کوپلیمر، خصوصیات بیوپلاستیک حاصل را از نظر انعطاف پذیری و استحکام، بهبود می بخشد و علاوه بر این، استخراج و فرآوری آن را ساده تر خواهد نمود. زیرا دمای ذوب و تجزیه PHB، تنها $10^{\circ}C$ با یکدیگر اختلاف دارند، ولی اختلاف این دو دما در کوپلیمر P(HB-HV) بیشتر است. همچنین با تولید کوپلیمر درصد متبلور شدن پلاستیک به طور قابل توجهی کاهش می یابد. در نتیجه انعطاف پذیری و

- background to bench. Springer-Verlag Telos, 1st edition: 276.
6. Noda, I.; Green, P.R.; Satkowski, M.M. and Schechtman, L.A., 2005. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biomacromolecules*. 6: 580–586.
 7. Pohlmann, A.; Fricke, W.F.; Reinecke, F.; Kusian, B.; Liesegang, H.; Cramm, R.; Eitinger, T.; Ewering, C.; Potter, M.; Schwartz, E.; Strittmatter, A.; Voss, I.; Gottschalk, G.; Steinbuechel, A.; Friedrich, B. and Bowien, B., 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotech* 24 (10): 1257-1262.
 8. Sambrook, J. and Russel, D.W., 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
 9. Slater, S.; Houmiel, K.L.; Tran, M.; Mitsky, T.A.; Taylor, N.B. and Padgette, S.R., 1998. Multiple β -ketothiolases mediate poly (β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol*. 180: 1979–87.
 10. Suriyamongkol, P.; Weselake, R.; Narine, S.; Moloney, M. and Shah, S., 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants. *Biotechnology Advances*. 25: 148–175.
 11. Tokiwa, Y. and Calabia, B.P., 2004. Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett*. 26: 1181–1189.
 12. Volova, T., 2004. Polyhydroxyalkanoates: plastic material of the 21st century. Chapter 6: Applications of PHAs. New York, USA: Nova Scientific Publishers Inc. 205–221.

استحکام چندین برابر بهبود می‌یابد (۶ و ۱۰). بنابراین جداسازی این ژن می‌تواند گام مؤثر اولیه در جهت دستیابی به بیوپلاستیک‌هایی با خصوصیات مطلوب‌تر باشد.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان به خاطر در اختیار قرار دادن امکانات اجرای این پژوهش تشکر می‌نمایم.

منابع

1. Chen, G.Q., 2005. Polyhydroxyalkanoates. In: Smith R, editor. *Biodegradable polymers for industrial applications*. Cambridge, England: CRC press. 32–56.
2. Green, P.R.; Kemper, J.; Schechtman, L.; Guo, L.; Satkowski, M. and Fiedler, S., 2002. Formation of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*. 3: 208–213.
3. Khanna, S. and Srivastava, A.K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. 40: 607–619.
4. Luengo, J.M.; Garcia, B.; Sandoval, A.; Naharro, G. and Olivera, E.R., 2003. Bioplastics from microorganisms. *Curr Opin Microbiol*. 6: 251–260.
5. Mc pherson, M.J.; Moller, S.G.; Beynon, R. and Howe, C., 2000. *PCR The Basics from*