ساخت سازه چندمنظوره کلروپلاستی برای ایجاد گیاهان تراریخته تولیدکننده بیوپلیمر زیست‌تخریب‌پذیر و مقاوم به شوری، خشکی و سرما

Construction of a Multifunctional Chloroplast Vector to Make Transgenic Plants Producing Biodegradable Biopolymer and Resistant to Salt, Drought and Cold Stresses

مطهره محسن‌پور [۱*] و مسعود توحیدفر [۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۳/۲۴

چکیده

هدف از تحقیق حاضر طراحی و ساخت ناقلین اختصاصی انتقال و بیان کلروپلاستی ژن‌های تولید کننده بیوپلیمر و ایجاد تحمل به تنش‌های غیرزنده بود. بدین‌منظور سه ژن درگیر در مسیر بیوسنتزی پلی‌هیدروکسی بوتیرات جداسازی شد و صحت جداسازی و عملکردی بودن ژن‌ها پس از بیان در وکتور بیانی و تولید باکتری نوترکیب تولیدکننده‌ی PHB اثبات گردید. سپس یک کاست بیانی القایی برای این گروه ژنی تحت پیشبر *groE* و پایانبر *Thr* طراحی و در راستای نشانگر *neo* ادغام شده با زیرواحد بزرگ *atpB* تحت پیشبر و پایانبر کلروپلاستی *psbA* و بین توالی‌های *loxP* همسانه‌سازی شد. کاست حاصل در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده کلروپلاستی چهارکیلوبازی که از ژنوم پلاستیدی جهت ایجاد امکان الحاق کاست‌ها به داخل ناحیه بین ژنی *trnI/trnA* ژنوم کلروپلاستی از طریق نوترکیبی همولوگ جداسازی شده بود، همسانه‌سازی گردید و دو ناقل پلاسمیدی نوترکیب تحت عنوان pFNPi(+) و pFNPi(-) ساخته شد. علاوه‌بر این ژن *badh* که با رفع سمیّت از بتائین آلدهید علاوه‌بر ایجاد مقاومت به شوری، خشکی، سرما به‌عنوان نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی نیز قابل استفاده است، پس از حذف اینترون‌ها، بهینه‌سازی کدونی، حذف جایگاه‌های شناسایی آنزیم‌های اندونوکلئاز داخلی که تحت پیشبر Prrn کلروپلاستی و 5'UTR T7gene10 قرار داده شده بود به وکتور کلروپلاستی مذکور اضافه گردید. سازه حاصل تحت عنوان pFBNPi مناسب برای انتقال ژن به باکتری و ژنوم پلاستیدی گیاه بوده و جهت ایجاد گیاهان مقاوم به شوری، خشکی، سرما و تولیدکننده‌ی بیوپلیمر زیست‌تخریب‌پذیر PHB مورد استفاده قرار خواهد گرفت.

واژه‌های کلیدی: بتائین آلدهید دهیدروژناز، بیان ژن در باکتری، سازه کلروپلاستی، بیوپلیمر PHB

۱ و ۲. پژوهشگر و عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

*: نویسنده مسوول Email: mthrhm@yahoo.com

مقدمه

مهندسی ژنتیک کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت منحصربه‌فرد را ارائه می‌دهد که شامل: بیان بالای تراژن دنیل و همکاران (Daniell *et al*, 2002)، مهندسی چند ژنی در یک رویداد انتقال ژن *دنیل* و همکاران (2002)، *دی‌کوزا* و همکاران، *رویز* و همکاران (De Cosa *et al*., 2001; Ruiz *et al*., 2003)، محدود نگه‌داشتن تراژن از طریق وراثت مادری *دنیل* (Daniell, 2002)، فقدان خاموشی ژن *دی‌کوزا و همکاران*، *لی* و همکاران (De Cosa *et al*., 2001; Lee *et al*., 2003)، فقدان اثرات مکانی *دنیل* و همکاران (Daniell *et al*., 2002) و پلیوتروپیک *لی* و همکاران (Lee *et al*., 2003) و فقدان DNA خارجی ناخواسته می‌باشد.

ژن‌های کلروپلاست توسط پیشبرهای اختصاصی کلروپلاست رونویسی شده و از سیگنال‌های پایانبر (Terminator) اختصاصی کلروپلاستی استفاده می‌کنند. اغلب ژن‌های کلروپلاست در گروه‌های ژنی رونویسی می‌شوند. این امر اجازه می‌دهد دو یا چند چارچوب بازخواندن (ORF) به درون یک ناقل، در توالی‌هایی تحت یک پیشبر (Promoter) وارد شوند. نشانگر انتخابی و ژن‌های دلخواه بین پیشبر و پایانبر، در مجاورت نواحی بدون رونویسی (UTR)'۵ و '۳ قرار داده می‌شوند *مالیگا* (Maliga, 2005). استفاده از نواحی تنظیمی مناسب در ساخت ناقل‌های کلروپلاستی می‌تواند نقش بسزایی در بیان مناسب ژن خارجی موردنظر ایفا کند. برای بیان تراژن‌های پلاستیدی معمولاً از یک کاست 5'PL (Promoter and Leader) و یک کاست T (پایانبر) استفاده می‌شود. کاست PL شامل یک پیشبر و توالی‌های کنترل‌کننده‌ی ترجمه است. توالی‌های کنترل‌کننده‌ی ترجمه ممکن است نواحی بدون ترجمهٔ '۵ از mRNA (5'UTR) و یا ناحیه‌ی کنترل ترجمه‌ی '۵ (TCR, Translation Control Region) باشند که شامل 5'UTR و یک قطعه‌ی پایانه‌ی N از ناحیه‌ی کدکننده را شامل می‌شود. ناحیه‌ی 5'UTR از mRNA معمولاً شامل یک ساختار ساقه-حلقه (Stem-Loop) است که برای پایداری mRNA موردنیاز می‌باشد و توالی هایی دارد که حرکت mRNAها را روی ریبوزوم تسهیل می‌کنند. کاست T، ناحیه‌ی بدون ترجمه‌ی '۳ از mRNA (3'UTR) را کد می‌کند که این قسمت نیز یک ساختار ساقه - حلقه را شامل می‌گردد. ناحیه‌ی بدون ترجمهٔ '۳ به‌عنوان یک پایانبر رونویسی عمل می‌کند و برای پایداری mRNA موردنیاز است *مونده* و همکاران (Monde *et al*, 2000).

رشد جمعیت انسان ها منجر به انباشته شدن مقادیر زیادی مواد زائد غیرقابل تجزیه در زمین شده است. انباشته شدن پلاستیک‌های زائد در طبیعت بسیار مهم و نگران‌کننده است *درائیک، گویلت، تامپسون* و همکاران (Derraik, 2002; Guillet 2002; Thompson *et al*., 2004). تجزیه‌شدن 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 به‌راحتی در تعامل با طبیعت از بیوسفر حذف شوند، توجه زیادی را به سمت خود معطوف ساخته است *گروز و کالرا* (Gross and Kalra, 2002). توجه به بیوپلاستیک‌ها به کمبود ذخایر پتروشیمی نیز مرتبط است. زیرا صنعت جهان به شدت به سوخت‌های فسیلی به‌عنوان 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 بهره‌برداری آن‌ها از اکتشاف آن‌ها به‌زودی پیشی خواهد گرفت *زاگار* (Zagar, 2000). این موضوع یک مشکل جهانی است زیرا اقتصاد ما هنوز وابستگی زیادی به منابع نفتی دارد. اولین ترکیب از پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها، پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) بود که در باکتری باسیلوس مگاتریوم شناخته شد. سال‌ها بعد، مطالعات نشان داد که پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها به‌عنوان پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر زیستی دارای ارزش اقتصادی هستند *سوریامونگکول* و همکاران (Suriyamongkol *et al*., 2007). پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA) است که در باکتری *Alkaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) 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 به‌ترتیب توسط ژن‌های *phbA*، *phbB* و *phbC* کد می‌شوند *اسلاتر* و همکاران (Slater *et al*., 1998). دو مولکول استیل-کوآ توسط بتاکتوتیولاز به هم متصل می‌شوند تا استواستیل‌کوآ تشکیل شود. استواستیل‌کوآ توسط استواستیل‌کوآ-رداکتاز به R- ۳- هیدروکسی بوتیرات-کوآ، تبدیل می‌شود. این ماده ابتدا به‌صورت منومر فعال است که سپس توسط PHB سینتاز پلیمریزه شده و PHB را تشکیل می‌دهد *سارول* و همکاران (Saruul *et al*., 2002). درحالی‌که تخمیر باکتریایی، به منابع بیرونی کربن، مثل گلوکز تکیه دارد؛ سنتز پلی‌هیدروکسی‌الکانوات در گیاهان، که بر پایه‌ی دی‌اکسیدکربن

و نور است، یک روش مقرون به صرفه‌تری برای تولید این بیوپلیمر، در مقادیر زیاد ارائه می‌دهد.

نزدیک به ۴۰ درصد زمین‌های قابل کشت را به‌علت مسائل شوری نمی‌توان استفاده نمود. بنابراین توسعه گیاهان تراریخته متحمل در برابر نمک زیاد، برای افزایش تولید غذای جهان ضروری است. تعدادی از گیاهان به‌طور طبیعی، ترکیبات آلی دارای وزن مولکولی پایین را تولید می‌کنند که متأسفانه این مواد در محصولات مهم گیاهی تولید نشده و تجمع نمی‌یابد. بتائین ازجمله این مواد می‌باشد که به گیاه برای غلبه بر شوری محیط توسط تنظیم فشار اسمزی در سیتوپلاسم سلولی و حفاظت پرتئین‌ها از تجزیه و انحطاط کمک می‌کند *روبینوز و جونز* (Robinson and Jones, 1986). ازجمله مزایای استفاده از ژن بتائین آلدهید دهیدروژناز (BADH) به‌عنوان ژن نشانگر گزینشگر تکثیر سریع گیاهان حاصل از تراریزش و کارآیی بالای ترانسفورماسیون نسبت به استفاده از سایر نشانگرها، مطرح می‌باشد. به موارد بالا این مزیت مهم را نیز باید اضافه نمود که ژن مذکور گیاهان را در برابر شوری، خشکی و سرما متحمل می‌کند *چن* و همکاران؛ *فیتزجرالد* و همکاران؛ *کومار* و همکاران (Chen *et al*., 2008; Fitzgerald *et al*., 2009; Kumar *et al*., 2004). مراحل انتخاب شامل تبدیل بتائین‌آلدهید (BA) سمی، توسط آنزیم BADH به گلایسین‌بتائین غیرسمی بود که به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی نیز عمل می‌کند. گیاهان تراریخته می‌توانند در محیطی با مقدار مؤثر فیتوتوکسین رشد کنند زیرا این گیاهان با کُدکردن آدنیل‌دهیدروژناز از فیتوتوکسین سمی رفع سمیّت می‌کنند و بدین ترتیب می‌توان آنها را انتخاب کرد. در انتخاب کشنده، گیاهان تراریخته زنده می‌مانند و انتخاب می‌شوند.

هدف از این تحقیق طراحی و ساخت سازه‌هایی بود که مناسب برای انتقال ژن به باکتری و ژنوم پلاستیدی گیاه بوده و بتوان آن‌ها را جهت تولید بیوپلیمر زیست‌تخریب‌پذیر PHB و نیز ایجاد گیاهان مقاوم به شوری، خشکی، سرما مورد استفاده قرار خواهد داد.

مواد و روش‌ها

ساخت دو وکتور انتقال ژن به کلروپلاست حاوی اپران PHB: pFNPi(+) و pFNPi(-)

سه ژن اپران PHB از باکتری *Alkaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) با طراحی آغازگرهای اختصاصی جداسازی (محسن‌پور و همکاران، ۱۳۹۰a) و پس از همسانه‌سازی اولیه در ناقل pJET (Fermentas) و تأیید صحت جداسازی ژن‌ها در وکتور بیانی pET28a همسانه‌سازی مجدد گردید. تولید PHB در باکتری میزبان BL21 با کروماتوگرافی گازی تأیید و پلیمر مذکور از این باکتری استخراج گردید (محسن‌پور و همکاران، ۱۳۹۰b). پس از تأیید پلاسمید نوترکیب pJET-PHB، اُپران PHB از این پلاسمید توسط دو آنزیم *Xba*I و *Xho*I جداسازی و خالص‌سازی گردید و پس از برش پلاسمید نوترکیب پلاستیدی pNGi (محسن‌پور و همکاران، ۱۳۹۱b) با آنزیم‌های *Xho*I و *Nhe*I و خروج *gfp*، در این ناقل همسانه‌سازی و تحت پیشبر *groE* قرار گرفت. پس از تراریزشِ مخلوط اتصال به باکتری‌های مستعد، کلونی‌های نوترکیب روی محیط حاوی دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) رشد کردند. پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به pNPi توسط واکنش‌های مختلف PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت و تأیید شد. سرانجام کاست جدید PHB با آنزیم *Sph*I از pNPi جدا و پس از هضم وکتور نوترکیب pJET-FR (محسن‌پور و همکاران، ۱۳۹۱a) با آنزیم *Sph*I و فسفرزدایی با آلکالین فسفاتاز، در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده به کلروپلاست (FR) همسانه‌سازی شد و دو پلاسمید نوترکیب موسوم به pFNPi(+) و pFNPi(-) حاصل گردیدند.

کلیه مراحل بر اساس دستورالعمل‌های سمبروک و راسل (2001) انجام گردید.

ساخت وکتور حاوی اپران پلی‌هیدروکسی بوتیرات و ژن بتائین‌آلدهید دهیدروژناز

ژن *badh* از منشأ اسفناج پس از دستکاری‌های متعدد توالی از جمله حذف اینترون‌ها، بهینه‌سازی کدونی، از بین بردن جایگاه‌های آنزیمی داخلی و اتصال به ناحیهٔ بدون ترجمهٔ ‘۵ (5’UTR) مربوط به *T7* gene10 فاژی با استفاده از SOEing PCR تحت پیشبر قوی کلروپلاستی Prrn قرار داده شده بود (محسن‌پور و همکاران، ۱۳۹۱a, b). کاست ژن *badh* پس از برش با آنزیم *Sph*I با طول ۱۹۳۴ جفت‌باز از روی ژل آگارز خالص‌سازی گردید و در مرکز توالی هدف‌گیری‌کننده به ژنوم کلروپلاستی با طول حدود ۴Kb از ناقل pJET-FR که با آنزیم مذکور برش خورده و توسط تیمار با آنزیم آلکالین فسفاتاز برای جلوگیری از خوداتصالی پلاسمیدی فسفرزدایی شده بود، همسانه‌سازی مجدد گردید. سپس پلاسمید نوترکیب حاصل از مراحل قبل موسوم به pFB (محسن‌پور و همکاران، ۱۳۹۱b, c) توسط آنزیم *Sph*I تحت هضم آنزیمی ناقص قرار گرفت. هدف از هضم ناقص خطی‌کردن این پلاسمید بود و در صورت هضم

کامل کاست ژنی *badh* از ناقل خارج می‌گردید. قطعه حاصل از خطی شدن این پلاسمید با طول ۸۷۷۵ جفت باز از روی ژل آگارز جدا و خالص‌سازی گردید.

برای ساخت سازه‌ای کلروپلاستی که کاست *badh* را به عنوان نشانگر ایمن غیر آنتی‌بیوتیکی دارا بوده و گروه ژنی PHB را نیز دربرداشته باشد، سازه نوترکیب pFNPi(+) با آنزیم *Sph*I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و قطعه حاوی کاست گروه ژنی PHB و ژن *neo* از روی ژل آگارز جداسازی و خالص‌سازی گردید. واکنش اتصال این قطعه به حامل pFB که با هضم آنزیمی ناقص *Sph*I خطی گردیده بود، انجام شد. هضم آنزیمی تک آنزیمی و ناقص دستیابی به چهار مدل سازه را پس از تراریزش مخلوط اتصال به سلول‌های مستعد *E. coli* سویه XLI-Blue امکان‌پذیر می‌نمود. کلونی‌های نوترکیب روی محیط حاوی دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۷۵ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) رشد کردند و توسط واکنش‌های مختلف PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی حضور و جهت قرارگیری قطعات ژنی نسبت به هم قرار گرفتند.

آنالیز اسپکتروفتومتری برای بررسی بیان بیوپلیمر PHB

یک کلونی از باکتری نوترکیب حاوی پلاسمید pFBNPi و یک کلونی نیز از باکتری فاقد پلاسمید (XLI-Blue) در ۵ میلی لیتر محیط LB رشد داده شد. آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر به کشت حاوی پلاسمید اضافه شد و به‌مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۷۰rpm قرار داده شدند. سپس یک میلی‌لیتر از کشت شبانه در ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع رقیق‌سازی شد و در دور و دمای مذکور قرار گرفت تا OD600nm به ۰/۶ برسد و شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای باکتری حاوی پلاسمید اعمال و پس از ۳ الی ۴ ساعت قرارگرفتن در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کشت‌های مایع باکتری توسط سانتریفیوژ رسوب داده شده و با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. سپس رسوب با قرار دادن در آون ۴۰ درجه به‌مدت یک شب خشک شد. رسوب حاصل در کلروفرم گرم قرار داده شد و پس از صاف‌کردن اجازه داده شد تا کلروفرم تبخیر گردد و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک به آن اضافه و توسط دستگاه NanoDrop 2000c Spectrophotometer در طول موج ۲۳۵ نانومتر تحت خوانش قرار گرفت. تمامی مراحل برای باکتری نوترکیب *E. coli* BL21، حاوی پلاسمید نوترکیب pET-PHB نیز انجام ولی به جای شوک حرارتی القای تولید PHB توسط IPTG (۰/۲ میلی‌مولار) انجام شد.

نتایج و بحث

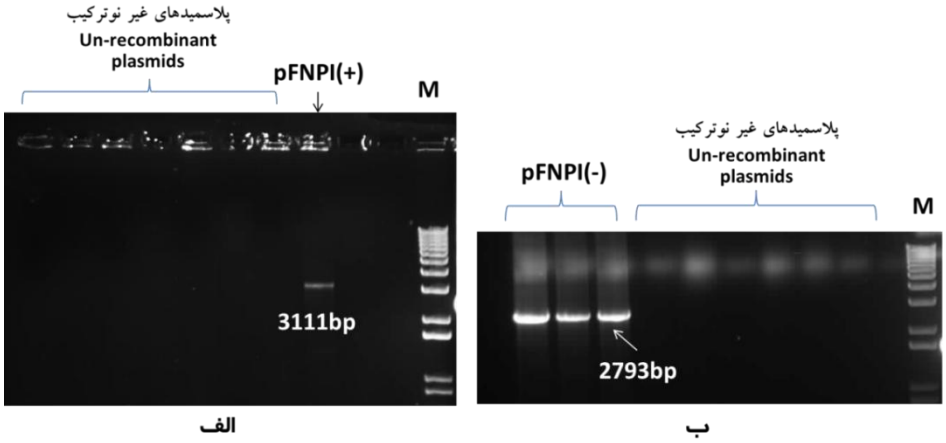
همسانه سازی PHB در وکتورهای پلاستیدی

پس از جداسازی کاست PHB با آنزیم *Sph*I از pNPi و همسانه‌سازی آن در مرکز توالی (FR توالی هدف‌گیری‌کننده به کلروپلاست)، کاست مذکور در دو جهت در مرکز FR پلاستیدی الحاق گردید و دو پلاسمید نوترکیب موسوم به pFNPi(+) و pFNPi(-) حاصل گردیدند (شکل ۱ و ۲). در pFNPi(+) کاست PHB به‌صورت هم‌جهت با FR قرار دارد ولی در pFNPi(-) این دو قطعه به‌صورت ناهمسو قرار گرفته‌اند (شکل ۲).

هضم آنزیمی ناقص پلاسمید نوترکیب pFB با آنزیم *Sph*I پس از اتصال با کاست *neoPHBi* دستیابی به چهار مدل سازه را امکان‌پذیر می‌ساخت. (الف) قرار گرفتن گروه ژنی PHB در بالا دست ژن *badh* و به‌صورت هم‌راستا با FR؛ (ب) قرار گرفتن گروه ژنی PHB در پایین دست ژن *badh* و به صورت هم‌راستا با FR؛ (ج) قرار گرفتن گروه ژنی PHB در بالادست ژن *badh* به صورت ناهمسو با FR و (د) قرارگرفتن گروه ژنی PHB در پایین‌دست ژن *badh* و به صورت ناهمسو با FR (شکل ۳).

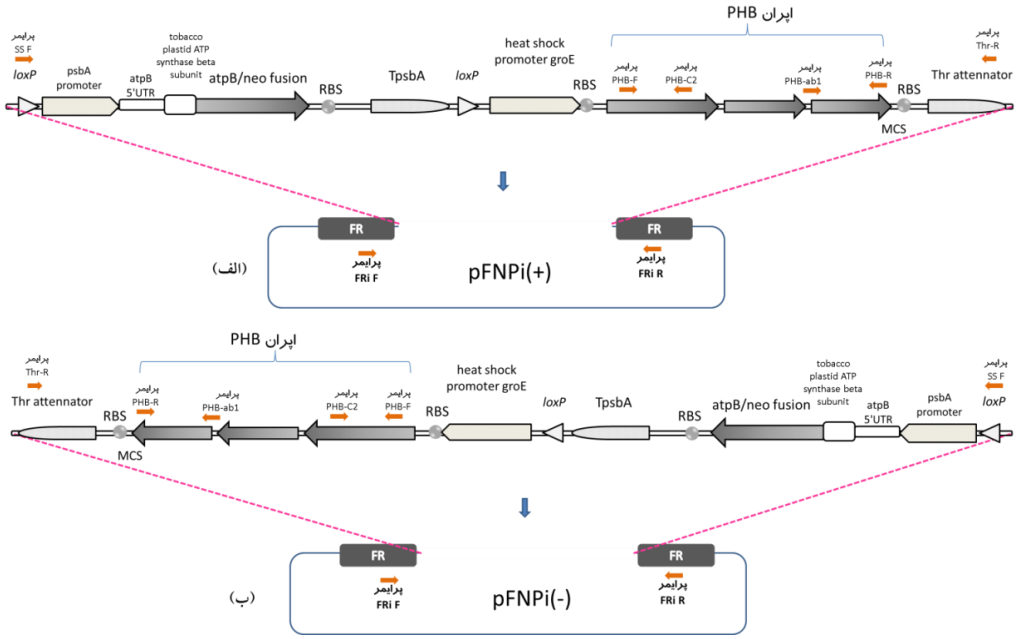
از آن‌جایی‌که از نواحی تنظیمی کاملاً مستقل برای هر یک از ژن‌ها در کاست‌ها استفاده گردیده بود و اپران PHB، ژن *badh* و ژن *neo* هر کدام پیشبر، پایانبر و UTRهای جداگانهٔ متفاوتی را حمل می‌کردند، لذا امکان کراس‌های داخل ملکولی و نگرانی از حذف قطعه از کاست‌ها به‌دلیل نوترکیبی همولوگ از بین می‌رفت. این امر این مزیت را فراهم می‌آورد که بتوان هر دو ژن را به صورت هم‌جهت در مرکز FR قرار داد. از آن‌جایی‌که FR کلروپلاستی مورد استفاده در وکتورهای کلروپلاستی ساخته شده در این تحقیق ناحیه بین ژنی *trnI/trnA* ژنوم کلروپلاستی بوده که بخشی از اپران 16S/23SrRNAی کلروپلاستی را شامل می‌شود و این اپران تحت یک پیشبر قوی کلروپلاستی با عنوان Prrn بیان می‌شود. بنابراین علاوه‌بر رونوشتی که هر یک از ژن‌ها در اثر بیان از طریق نواحی تنظیمی خودشان (پیشبرخودشان) می‌توانستند داشته باشند یک رونویسی اضافه نیز از پیشبر قرارگرفته در بالادست توالی که بر روی ژنوم وحشی کلروپلاستی پس از الحاق در بالا دست آنها قرار می‌گیرد نیز حاصل می‌شود که اگر جهت ژن‌ها به‌صورت ناهمسو با FR باشد، رونوشت‌های سنس و آنتی‌سنس ممکن است منجر به خاموشی ژن‌ها گردد. لذا از بین چهار حالت ممکن مذکور در طراحی کاست حاوی گروه ژنی PHB و ژن نشانگر BADH با استراتژی‌های هضم آنزیمی کلونی‌هایی جستجو گردید که حالت هم‌سو یعنی حالت

شماره‌ی "الف" یا "ب" را حاصل نماید. برش با آنزیم *XbaI* انتظار باندهای ذیل را برای هر حالت امکان‌پذیر می‌نمود:
باندهای ۸۷۴۲ و ۶۰۲۹ جفت باز برای حالت "الف"؛ باندهای ۹۶۵۴ و ۵۰۱۸ برای حالت "ب"؛ باندهای ۷۹۶۳ و ۹۷۰۹ برای حالت "ج" و باندهای ۱۱۵۸۸ و ۳۰۸۴ برای حالت "د". به‌دلیل اینکه تشخیص حالت "الف" و "ب" روی ژل آگارز مشکل می‌باشد (شکل ۴) لذا آنزیم *NotI* برای تشخیص تفاوت بین این دو حالت مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۵).



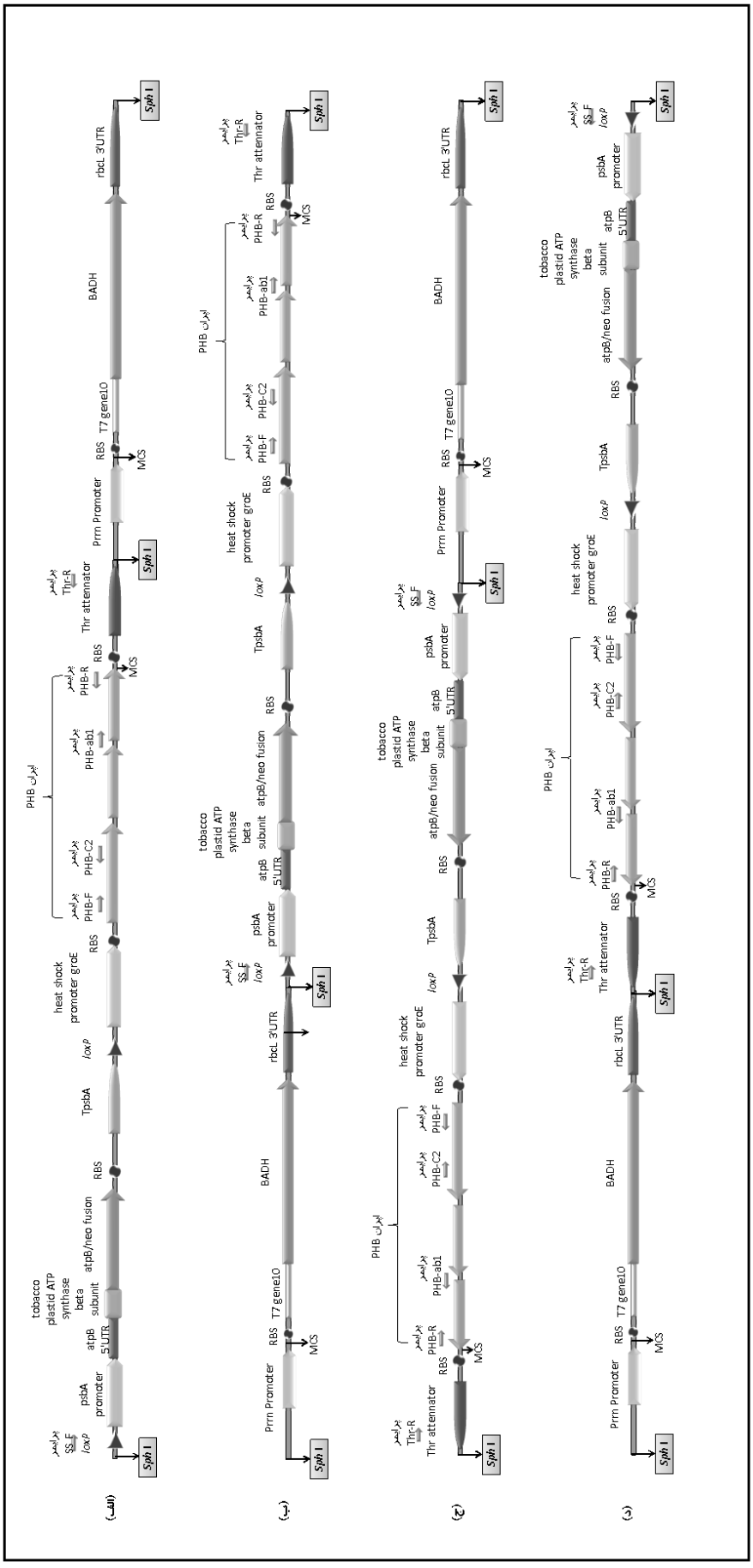
شکل ۱: آنالیز PCR برای تشخیص حامل‌های پلاستیدی نوترکیب pFNPi
الف. PCR با پرایمرهای PHB-C2 و FRi-F منجر به تشخیص یک کلونی نوترکیب حاوی پلاسمید pFNPi با ظهور باند ۳۱۱۱bp گردید که کاست PHB را به‌صورت هم‌جهت با FR دریافت کرده است
ب. PCR با پرایمرهای PHB-C2 و FRi-R منجر به تشخیص ۳ کلونی نوترکیب حاوی پلاسمید pFNPi با ظهور باند ۲۷۹۳bp گردید که کاست PHB را به‌صورت غیر هم‌جهت با FR دریافت کرده بودند
M. نشانگر اندازهٔ وزن ملکولی DNA، 1Kb Plus Ladder (Invitrogen)

Fig. 1: PCR analysis for recognition of recombinant pFNPi plastid vector
a. PCR using PHB-C2 and Fri-F primers was led to recognition of a recombinant colony containing pFNPi plasmid that presented 3111bp band. This vector has been received PHB cassette as direct orientation with FR fragment
b. PCR using PHB-C2 and Fri-R primers was led to recognition of 3 recombinant colony containing pFNPi plasmid that presented 2793bp band. This vector has been received PHB cassette as indirect orientation with FR fragment
M. 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)



شکل ۲: نمای شماتیک دو سازه کلروپلاستی حاوی گروه ژنی PHB ساخته شده در این تحقیق. الف. سازه pFNPi(+)؛ ب. سازه pFNPi(-)

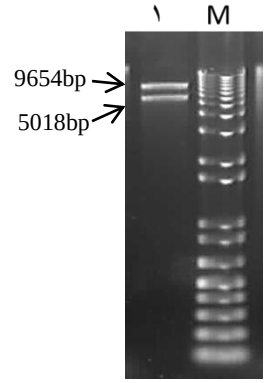
Fig. 2: Schematic view of two chloroplast vector containing PHB operon that was constructed in this research. a. pFNPi(+) vector; b. pFNPi(-) vector



شکل ۳: نمای شماتیک چهار حالت ممکن برای ورود کاست *neoPHB* به حامل نوترکیب pFB (pFBNPi).

پلاسمید نوترکیب pFBNPi ساخته شده در این تحقیق حالت "ب" حاوی ژن‌های *neo*، *badh* و گروه ژنی PHB به‌صورت همسو با FR کلروپلاستی می‌باشد

Fig. 3: Schematic view of four possible forms for insertion of *neoPHB* cassette into recombinant pFB vector (pFBNPi). The recombinant pFBNPi plasmid that constructed in this study is B (ب) form that *badh, neo* and PHB genes have direct orientation with



شکل ۴: آنالیز هضم آنزیمی با آنزیم *Xba*I
M. نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1Kb Ladder شرکت Invitrogen)؛
۱. پلاسمید نوترکیب pFBNPi
Fig. 4: Digest analysis using *Xba*I enzyme.
M. 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
1. pFBNPi recombinant plasmid

برش سازه نوترکیب pFBNPi با آنزیم *Not*I در صورتی‌که اپران PHB در بالادست کاست BADH قرار گرفته باشد سه باند ۵۶۴۹، ۵۰۷۲ و ۳۹۵۱ جفت بازی را ظاهر می‌کند. این درحالی است که برش با این آنزیم در صورت قرار گرفتن اپران PHB در پایین‌دست کاست BADH باندهای ۷۰۰۶، ۳۹۵۱ و ۳۷۱۵ را ظاهر خواهد نمود. باند ۳۹۵۱ در هر دو حالت ثابت بوده و نشان‌دهنده‌ی وجود دو جایگاه آنزیم *Not*I یکی در ژن *phbC* و دیگری در انتهای اپران PHB و قبل از پایان‌بر Thr می‌باشد. اما وجود یک جایگاه شناسایی برای آنزیم *Not*I در وکتور پایه pJET جهت قرار گیری کاست‌های کلون‌شده را قابل ردیابی خواهد کرد. کلون نوترکیب pFBNPi (شکل ۵) باند ۷ کیلوبازی را به وضوح نشان داد و این درحالی بود که دو باند ۳/۷ و ۳/۹ کیلوبازی روی هم افتاده و به‌صورت تک باند ولی عریض‌تر و شارپ‌تر از باند ۷ کیلوبازی روی ژل مشاهده شدند. بدین‌ترتیب کلون نوترکیب موردنظر که در آن کاست اپران PHB و *neo* در پایین‌دست کاست BADH قرار دارد و هر سه کاست به‌صورت همسو با FR کلروپلاستی قرار گرفته‌اند شناسایی گردید. پلاسمید نوترکیب pFB نیز با آنزیم *Not*I برش داده شد و به‌عنوان کنترل در کنار کلون مذکور مورد آزمایش قرار گرفت که ظهور تک باند ۸۷۷۵ جفت بازی سازه‌ای را نشان می‌داد که اپران PHB را دریافت نکرده است (شکل ۵).

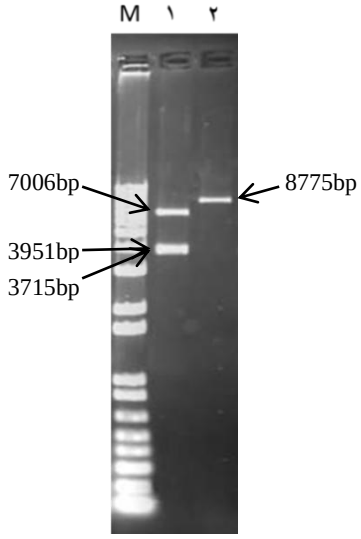
نتایج مربوط به آنالیز اسپکتروفتومتری برای بررسی تولید PHB به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی شد (جدول ۱) و جدول تجزیه واریانس وجود اختلاف معنی‌دار بین باکتری‌ها را از نظر تولید PHB در سطح احتمال ۱ درصد اثبات نمود (جدول ۲). برای اثبات اختلاف بین انواع باکتری‌ها از مقایسه میانگین به روش دانکن استفاده شد و نتایج نشان داد که باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب کلروپلاستی ساخته شده در این تحقیق (pFBNPi) با باکتری سویه XLI-Blue که PHB تولید نمی‌کند (کنترل منفی) اختلاف معنی‌داری داشته و با باکتری حاوی پلاسمید pET-PHB که تولیدکننده‌ی PHB است (کنترل مثبت) فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

معنی‌دار شدن تفاوت pFBNPi با کنترل منفی و عدم معنی‌دار شدن تفاوت آن با کنترل مثبت تولید PHB را توسط این پلاسمید نوترکیب نشان می‌دهد.

باکتری *E. coli* می‌تواند از دامنه‌ی وسیعی از منابع کربن ارزان استفاده کند و به‌دلیل سهولت رشد و هزینه کم خالص‌سازی بیوپلیمر، به‌عنوان تولیدکننده‌ی اقتصادی PHB مطرح شده است. علاوه‌بر آن، از آنجایی که این باکتری آنزیم PHA دِپلیمراز درون سلولی را ندارد، PHAی سنتز شده، تجزیه نخواهد شد.

در تحقیقات مختلف ژن‌های بیوسنتز PHAی باکتری *R. eutropha*، به *E. coli* منتقل شده و توانایی تولید پلیمر در این باکتری به‌طور موفقیت‌آمیزی مورد بررسی قرار گرفته *است لی و همکاران، نیکل* و همکاران (Li *et al*., 2007; Nikel *et al*., 2006). درحالی‌که تخمیر باکتریایی، به منابع بیرونی کربن، مثل گلوکز تکیه دارد، سنتز PHA در گیاهان، که بر پایه‌ی دی‌اکسیدکربن و نور است، یک روش مقرون به صرفه‌تری برای تولید این بیوپلیمر، در مقادیر زیاد ارائه می‌دهد. در سیستم‌های گیاهی، روش‌های هوشمندانه‌ای برای به‌دست آوردن واسطه‌های کاتابولیسم کربن و تبدیل آن‌ها به PHA

استفاده شده است. انتقال ژن به کلروپلاست دارای مزایای منحصر به فردی نسبت به انتقال ژن به هسته است و راه را



شکل ۵: آنالیز هضم آنزیمی با آنزیم *Not*I

M. نشانگر اندازه وزن ملکولی DNA (1Kb Ladder شرکت Invitrogen)؛

۱. پلاسمید نوترکیب pFBNPi؛

۲. پلاسمید نوترکیب pFB.

Fig. 5: Digest analysis using *Not*I enzyme.
M. . 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)
1. pFBNPi recombinant plasmid.
2. pFB recombinant plasmid.

جدول ۱: نتایج مربوط به آنالیز اسپکتروفتومتری برای بررسی تولید PHB در سه باکتری به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار

Table 1: The results of spectrophotometer analysis for investigation of PHB production from 4 bacteria using completely randomized design in 4 repeats

XLI-Blue ایکس اِل وان بلو	pET-PHB پت –پي. اچ. بي.	pFBNPi پی.اِف.بی.اِن.پی.آی	باکتری Bacteria	تکرار Repeat
0.021	0.305	0.159		1
0.009	0.381	0.197		2
0.081	0.276	0.135		3
0.044	0.219	0.234		4

جدول ۲: تجزیه واریانس مربوط به آنالیز اسپکتروفتومتری برای بررسی تولید PHB در سه باکتری.

Table 2: Analysis of variance related to spectrophotometer analysis for investigation of PHB production from 4 bacteria.

F	میانگین مربعات Mean square MS	مجموع مربعات Sum of squares SS	درجه آزادی Degree of freedom df	منبع تغییر S.O.V.
	0.044044	0.132132	2	باکتری Bacteria
17.76**	0.00247788	0.02231	9	خطای آزمایشی Experimental error
		0.154443	11	کل total

جدول ۳: مقادیر SSR برای درجه آزادی ۹ و دامنه‌های ۲ و ۳ در سطح احتمال ۱ درصد و مقادیر LSR محاسبه شده در این تحقیق
Table 3: The SSR and related calculated LSR of this research for df=9 and range of 2 and 3

دامنه تیمارها Range of treatments	2	3
SSR	4.60	4.86
LSR	0.1145	0.12097

خطای استاندارد (Standard error) = ۰/۰۲۴۸۹۳

جدول ۴: قدر مطلق تفاوت بین میانگین تولید PHB در باکتری‌ها و نتایج به روش حروف الفبا
Table 4: The absolute value of variation between the average of PHB production in bacteria and results using alphabet method

	PFBNPi	PET-PHB
PET-PHB	0.1137 ^{ns}	
XLI-Blue	0.1425**	0.2565**

باکتری (Bacteria)	PET-PHB	PFBNPi	XlI-Blue
میانگین نتایج اسپکتروفتومتری (Mean of spectrophotometer results)	0.29525^{a}	0.18125^{a}	0.03875^{b}

برای تولید ارزان پروتئین‌های نوترکیب ارزشمند دارویی و صنعتی در گیاهان باز کرده است در این تحقیق پس از اطمینان از صحت جداسازی و عملکرد ژن‌های تولیدکننده PHB، این ژن‌ها در حامل‌های کلروپلاستی با جهت و ژن‌های نشانگر مختلف همسانه‌سازی شدند.

هزینه‌ی تولید توده‌ی PHA در باکتری‌ها به استثنای بیوپلاستیک‌های ویژه‌ای که در کاربردهای دارویی، مورد استفاده قرار می‌گیرند، گران است. بنابراین سنتز PHA در محصولات گیاهی می‌تواند راهکار مناسبی برای تولید این پلیمر در مقیاس بالا و هزینه‌ی کم باشد. به هر حال با توجه به قیمت بالای نفت خام و محدود بودن منابع آن، استفاده از منابع نفتی برای تولید مواد پلاستیکی، که هم آلوده‌کننده‌ی محیط‌زیست هستند و هم در جامعه ما ارزش چندانی ندارند، کاری غیراقتصادی است. بنابراین با توجه به این‌که PHB بسیاری از ویژگی‌های پلاستیک‌های نفتی را دارد، می‌تواند جایگزین مناسب و ایمنی برای پلاستیک‌های تجزیه ناپذیرکنونی باشد.

ناقل‌های پلاستیدی نوترکیب pFNPi(+)، pFNPi(-) و pFBNPi که دارای ژن نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی بتائین آلدهید دهیدروژناز برای تراریختی ایمن گیاهان است ازجمله دستاوردهای این تحقیق است. هر یک از ناقل‌های تولید شده توانایی تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات را در باکتری نوترکیب *E. coli* و بدون نیاز به مواد القاکننده گران قیمتی مانند IPTG فراهم خواهند نمود.این سازه‌های چندمنظوره برای تولید PHB در باکتری‌ها و گیاهان طراحی شده و سازه pFBNPi قادر است گیاه را علاوه‌بر تولید PHB در برابر شوری، خشکی و سرما نیز مقاوم نماید. گزارشاتی مبنی بر استفاده همزمان دو نشانگر *aadA* و BADH در ناقل کلروپلاستی وجود داشت ولی تاکنون از دو نشانگر *neo* و *badh* در یک وکتور کلروپلاستی استفاده نشده است.

اکثر حامل‌هایی که برای انتقال ژن به کلروپلاست ساخته می‌شوند دارای ژن *aadA* ایجادکننده‌ی مقاومت به استرپتومایسین و اسپکتینومایسین به‌عنوان نشانگر انتخابی هستند *مالیگا* (2005)، ولی از آن‌جایی‌که rRNA های پلاستیدی برخی از گیاهان به‌طور طبیعی جهش‌هایی دارند که از اتصال اسپکتینومایسین جلوگیری می‌کند و از سویی دیگر نگرانی‌هایی در ارتباط با مسائل ایمنی زیستی این نشانگر انتخابی وجود دارد، لذا در این تحقیق از یک ژن نشانگر غیرآنتی‌بیوتیکی در ساخت حامل کلروپلاستی استفاده گردید. وکتور حاصل را می‌توان با همسانه‌سازی ژن‌های دلخواه برای انتقال ژن به کلروپلاست به‌کار برد. ژن BADH که در این تحقیق برای ساخت ناقل پلاستیدی مورد استفاده قرار گرفت، علاوه‌بر بهینه‌سازی کدونی که انتظار می‌رود میزان بیان آن را افزایش دهد، به ناحیه بدون ترجمه ‘۵ (5’UTR) ژن T7 ۱۰ متصل گردید. از آن‌جایی‌که نشانگر انتخابی باید قادر به بیان مناسب در هر نوع ریزنمونه اعم از سبز و غیرسبز باشد، استفاده از UTR مذکور امکان بیان قوی و قدرت انتخاب را در مراحل اولیه رشد برای ریزنمونه‌های تراریخته فراهم خواهد نمود. امکان حذف ژن نشانگر *neo* پس از تراریختی از طریق نوترکیبی Cre/*loxP* وجود دارد و این امر نگرانی‌های ایمنی زیستی را منتفی خواهد نمود.

پلاستیدها ژنوم اختصاصی دارند و می‌توانند mRNAی پلی‌سیسترونیک را به‌صورت یک اُپران بیان کنند. این موضوع تراریزش پلاستید را برای بیان ژن‌های PHB بسیار ایده‌آل می‌نماید و نیاز به طراحی کاست ژنی جداگانه برای هر ژن و قرار دادن پیشبر و پایانبر مستقل را برطرف می‌کند. بیان پلی‌سیسترونی ژن‌های PHB در این تحقیق با طراحی ناقل‌های pFNPi و pFBNPi به‌منظور انتقال ژن‌های PHB به کلروپلاست صورت گرفت. این موضوع زمانی‌که بیان یک مسیر بیولوژیکی چندمرحله‌ای (مثل بیان سه ژن PHB) به‌طور همزمان در گیاه مدنظر است، دارای اهمیت می‌باشد. زیرا علاوه بر این‌که طول سازه ژنی را کاهش می‌دهد و طول کمتر سازه ژنی در افزایش کارآیی انتقال ژن توسط تفنگ ژنی، عاملی تأثیرگذار است، نیاز به انتقال کاست‌های ژنی مستقل را نیز برطرف می‌کند و باعث کاهش وقت و هزینه‌های اضافه‌ای خواهد شد که در انتقال ژن‌های مستقل می‌بایست برای هرم‌بندی ژن‌ها و به‌منظور آنالیز، تشخیص و دستیابی به گیاهانی که تمامی ژن‌های مسیر بیولوژیکی را دریافت کرده باشند، صرف گردد. بیوپلیمر PHB در یک گروه سه ژنی بیان می‌شود که انتقال ژن آن را به هسته نیازمند انتقال جداگانه هر یک از ژن‌های این گروه ژنی و تلاقی گیاهان تراریخته به‌منظور دستیابی به گیاهی که هر سه ژن را بیان نماید، دارد. ولی با استفاده از سیستم بیان کلروپلاستی که قابلیت بیان ژن را به‌صورت پلی‌سیسترونی داراست، قادر خواهیم بود گروه سه ژنی PHB را به‌طور کامل به ژنوم کلروپلاستی در یک رویداد واحد انتقال ژن وارد نماییم.

در نهایت سیستمی که برای بیان PHB در باکتری و ژنوم کلروپلاستی طراحی و ساخته شد این قابلیت را خواهد داشت که با جایگزینی هر ژن دلخواه دیگری به‌جای PHB استفاده و به‌عنوان زمینه‌ای کارا و سازگار با مسائل زیست‌محیطی و برای ایجاد صفات مطلوب زراعی و نیز تولید پروتئین‌های درمانی، واکسن‌ها و مواد زیستی، به‌کار رود.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران که هزینه و امکانات این تحقیق را فراهم نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۵-۱۶ متن انگلیسی مراجعه شود.