

جداسازی و همسانه‌سازی cDNA (cloning) ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*) از قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، مقدمه‌ای بر دست‌ورزی ژنتیکی

جواد حسن‌جانپور^۱ و محمد فارسی^۱

^۱ گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

چکیده

تولید و پرورش قارچ خوراکی، یکی از کاربردهای تجاری فناوری‌های میکروبی به منظور تبدیل زیستی ضایعات بخش کشاورزی به فرآورده‌های با ارزش غذایی است. در قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) آنزیم‌های مختلفی از ابتدای رشد میسلیمی تا انتهای دوره میوه‌دهی، تجزیه ترکیبات لیگنینی را در محیط کمپوست برعهده دارند. یکی از مهمترین این آنزیم‌ها، آنزیم منگنز پراکسیداز است که سهم عمده‌ای در تجزیه ترکیبات لیگنینی دارد. به منظور انجام مطالعات ملکولی بر روی آنزیم منگنز پراکسیداز در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید نژاد IM008 و آماده نمودن زمینه برای افزایش تولید این آنزیم در قارچ خوراکی دکمه‌ای، اقدام به جداسازی و همسانه‌سازی cDNA ژن کدکننده آنزیم منگنز پراکسیداز گردید. برای این منظور استخراج RNA از میسلیوم‌های رشد یافته قارچ خوراکی بر روی محیط کشت مایع عصاره کمپوست انجام شد و cDNA آن به وسیله آنزیم رونوشت بردار معکوس ساخته شد. پس از تکثیر قطعه مورد نظر به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، قطعه تکثیرشده در ناقل pTZ57R/T قرار گرفت و سپس به باکتری *E. coli* سویه DH5a منتقل گشت. پس از استخراج پلاسمید از باکتری‌های تراریخته، پلاسمید استخراج شده مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و در مرحله آخر قطعه تکثیرشده تعیین توالی شد. در نتایج، بلاست توالی نوکلئوتیدی در مکان‌های بازهای نوکلئوتیدی با شماره‌های ۶۵۷ و ۸۵۰ با توالی ژن *mnp* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI تفاوت داشت که به ترتیب، سبب تغییر اسید آمینه ایزولوسین به والین و اسید آمینه سرین به آلانین در توالی اسید آمینه قطعه cDNA همسانه شده، می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم رونوشت بردار معکوس، ضایعات کشاورزی، ناقل pTZ57R/T، همسانه‌سازی

مقدمه

یا توقف تولید در برداشت‌های دوم به بعد است که بنظر می‌رسد عامل اصلی این مشکل، اتمام مواد غذایی برای مصرف قارچ دکمه‌ای و ناتوانی در استفاده بهینه و کامل از

یکی از مشکلات موجود در صنعت پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، کاهش و

لیگنینی در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید محسوب می‌شود (Moloy, 2004). این آنزیم برون سلولی معمولاً دارای جرم مولکولی ۴۰-۵۰ kDa (حداکثر ۶۲-۳۸ kDa) است و pI معمولاً حدود ۳-۴ است (Hofrichter, 2002).

قارچ‌های مختلفی از دسته بازیدیومیست‌ها دارای آنزیم‌هایی برای تجزیه ترکیبات لیگنینی هستند. تحقیقات مختلفی برای شناسایی، تعیین خصوصیات و همچنین توالی یابی ژن‌های دخیل در تجزیه لیگنین در این قارچ‌ها انجام شده است (Ma et al., 2004). بنابراین، با دست‌ورزی ژن‌های دخیل در تولید آنزیم‌های مؤثر در فرآیند تجزیه لیگنین و همچنین بهینه نمودن شرایط مناسب برای عمل این آنزیم‌ها می‌توان بستر مناسبی را برای فعالیت بیشتر قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) و استفاده بیشتر آن از کمپوست تهیه شده فراهم نمود.

اطلاعات اندکی در مورد چگونگی تولید آنزیم منگنز پراکسیداز در بازیدیومیست‌ها در مقایسه با دیگر قارچ‌های پوسیدگی سفید وجود دارد (Chen et al., 2001)، اما تعدادی از گزارش‌ها تولید آنزیم منگنز پراکسیداز توسط قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست را تأیید می‌کنند. مهمترین قارچ تجزیه‌کننده کمپوست که آنزیم منگنز پراکسیداز را هم تولید می‌کند، قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) است (Lankinen et al., 2001). همچنین گونه‌هایی از خانواده قارچ‌های کوپرینوس، مانند *Paneolus sphinctrinus* (Heinzkill et al., 1998) و از قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات گیاهی، مانند *Marasmius quercophilus* (Tagger et al., 1998)، نیز آنزیم منگنز پراکسیداز را تولید می‌کنند.

ژن اصلی تولیدکننده آنزیم منگنز پراکسیداز از قارچ خوراکی صدفی توسط Irie و همکاران (۲۰۰۱)

کمپوست تولید شده باشد. با افزایش دما در انتهای مراحل اولیه (فاز I) تهیه کمپوست قارچ دکمه‌ای، میکرواورگانیزم‌های گرمادوست (قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها) به میزان زیادی تکثیر می‌شوند، اما این توده زنده میکروبی تنها ۱۰ درصد نیاز غذایی قارچ دکمه‌ای را می‌تواند تأمین کند (Moloy, 2004).

محققان دریافته‌اند که در قارچ خوراکی دکمه‌ای، آنزیم‌های مختلفی از ابتدای رشد میسلیمی تا انتهای دوره میوه‌دهی تجزیه ترکیبات لیگنینی را در محیط کمپوست بر عهده دارند. پس از اتمام فرآیند کمپوست‌سازی، اساساً کمپوست شامل دو ترکیب اصلی غذایی، لیگنوسلولز و بیومس میکروبی است. محتوای لیگنوسلولز شامل لیگنین، سلولز و همی سلولز با نسبت ۳:۳:۱ است. در نتیجه، استفاده قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) از کمپوست، نیازمند توانایی تولید مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنینی است (Moloy, 2004).

مطالعات انجام شده توسط محققان مختلف تأثیر آنزیم‌های لاکاز، منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و گلی‌اکسال اکسیدازها را در فرآیند تجزیه ترکیبات لیگنینی در محیط این ویترو در قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنین اثبات کرده است. البته، فعالیت این آنزیم‌ها به نوع قارچ مورد مطالعه بستگی دارد (Kamitsuji et al., 2004). از این بین آنزیم منگنز پراکسیداز، یکی از عمومی‌ترین و اصلی‌ترین پراکسیدازهای تخریب‌کننده لیگنین است که با قدرت بالا در اکسیده کردن ترکیبات گیاهی توسط اکثر قارچ‌های تجزیه‌کننده چوب و نیز بسیاری از قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست از جمله قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) تولید می‌شود. آنزیم منگنز پراکسیداز قدرتمندترین آنزیم برون سلولی اکسیده‌کننده ترکیبات

بنابراین، با شناسایی هرچه بیشتر ژن‌های تجزیه‌کننده ترکیبات گیاهی و لیگنینی، تولید نژادی هیبرید (بین گونه‌های با قدرت بیشتر تجزیه‌کنندگی و نژادهای دارای کیفیت) و یا تراریخته (انتقال ژن‌های تولید آنزیم‌های تجزیه ترکیبات گیاهی به گونه‌هایی با تجزیه‌کنندگی پایین) از قارچ خوراکی که به دلیل تولید آنزیم‌های مؤثر و با قدرت تجزیه‌کنندگی بیشتر توانایی استفاده بهتر از کمپوست آماده شده را دارند، می‌توان انتظار داشت که عملکرد قارچ خوراکی در واحد سطح تا چندین برابر مقدار کنونی افزایش یابد، در حالی که از کیفیت و خصوصیات مطلوب آن کاسته نشده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از قارچ خوراکی دکمه‌ای نژاد IM008 که در گروه پژوهشی قارچ‌های خوراکی و صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد اصلاح شده است، استفاده گردید. روش کشت بافت قارچ خوراکی از میسلیم تازه مطابق با روش بیان شده توسط فارسی و گردان (۱۳۸۶) بود. برای این منظور، قطعه‌ای از میسلیم رشد یافته قارچ خوراکی در محیط کشت جامد به یک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت تازه منتقل گردید. محیط کشت در دمای $23 \pm 1^\circ\text{C}$ در تاریکی به مدت حدود ۱۰ روز نگهداری شد. کشت مایع قارچ خوراکی دکمه‌ای نیز مطابق با روش تشریح شده توسط قربانی فعال (۱۳۸۷) با کمی تغییرات انجام گرفت. از یک کشت ۱۴-۱۰ روزه جامد میسلیمومی قطعه مثالی شکلی به طول اضلاع ۲۵ میلی‌متر با کمترین میزان آگار جداسازی گردید. در هر ویال، یک برش میسلیمومی به صورت غوطه‌ور در محیط کشت مایع قرار داده

جداسازی و تعیین توالی گردید. جداسازی و خصوصیت‌یابی ژن منگنز پراکسیداز از قارچ خوراکی دکمه‌ای نژاد ATCC 62459 در سال ۲۰۰۵ توسط Lankinen و همکاران انجام شد. در این مطالعه ۱۴ اینترون در ژن منگنز پراکسیداز شناسایی شده و تعداد نوکلئوتیدها در ژن کامل ۱۸۲۱ bp مشخص گردیده است. در پژوهش مذکور عنوان شده است که گمان می‌رود ژن منگنز پراکسیداز جداسازی و کلون شده و یکی از زیرواحدها و یا یکی از نسخه‌های ژن منگنز پراکسیداز شناسایی شده است. همچنین Lankinen و همکاران (۲۰۰۵) بر لزوم انجام تحقیقات بیشتر در این خصوص اشاره کرده‌اند. جداسازی و خصوصیت‌یابی ژن کدکننده آنزیم منگنز پراکسیداز از قارچ خوراکی شی تا که نیز در سال ۲۰۰۷ توسط Nagai و همکاران صورت گرفت.

هدف از اجرای این پژوهش، جداسازی و همسانه‌سازی ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*)، از قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) نژاد IM008 (از نژادهای هیبرید اصلاحی در جهاد دانشگاهی واحد مشهد) است. بهینه‌سازی مراحل استخراج RNA و تهیه cDNA از قارچ خوراکی دکمه‌ای به منظور هموار نمودن مسیر برای انجام دست‌ورزی‌های ژنتیکی و انتقال ژن به قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) نیز از اهداف پیگیری شده در این پژوهش است. کاهش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید به دلیل اتمام مواد غذایی و یا عدم استفاده بهینه از کمپوست آماده شده، از جمله مواردی است که خسارت‌های زیادی را متوجه پرورش‌دهندگان قارچ خوراکی می‌کند (Nagai et al., 2007).

به صورت میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. پس از استخراج RNA کل و برای حصول اطمینان از نبودن DNA ژنومی، نمونه‌های RNA با استفاده از آنزیم DNase تیمار گردیدند و سپس برای ساخت cDNA از آن استفاده گردید.

برای ساختن cDNA از دستورالعمل کیت Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمنتاز استفاده گردید. ساخت cDNA با استفاده از آغازگر الیگو 18(dT) انجام گرفت. از آنجایی که حضور ژن *mnp* در قارچ‌های خوراکی مختلف شناسایی و توالی آن در برخی از گونه‌های شبیه قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*) تعیین شده بود، در واکنش‌های RT-PCR از آغازگرهای استفاده شده توسط Lankinen و همکاران (۲۰۰۵) با کمی تغییرات در تعداد و توالی نوکلئوتیدها استفاده شد. توالی آغازگرهای بهینه شده به صورت زیر است:

آغازگر رفت:

5' ATGGCTTTCAAAATTCTTCTCA 3'

آغازگر برگشت:

5' TCAGAGGTGGGAAGTGGC 3'

برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آنزیم *Taq* پلیمرز به صورت، چرخه نخست: ۳ دقیقه در دمای ۹۴ °C، ۳۵ چرخه بعدی: ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و چرخه نهایی: ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. مخلوط استفاده شده در واکنش PCR در جدول ۱ مشخص شده است.

محصولات واکنش PCR در دمای ۴ °C و در یخچال نگهداری شدند. برای مشاهده و بررسی محصولات تکثیر شده، از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و بافر TAE

شد و به منظور رشد میسلیم‌ها، محیط‌های کشت در دمای ۱°C ± ۲۳ و در تاریکی نگهداری شدند.

استخراج RNA کل سلول با استفاده از کیت تجاری RNA-X plus شرکت سیناژن، روش مبتنی بر گوانیدین تیوسیانات-فنل-کلروفرم (AGPC) (Chomyszynski and Sacchi, 1987) و روش مبتنی بر کلرید لیتیم (Sreenivasaprasad, 2000) انجام شد. کلیه مراحل در کیت مورد استفاده مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده و در روش‌ها بر اساس منابع ذکر شده انجام گرفت. در ادامه کیفیت و کمیت RNA به دست آمده بررسی گردید.

برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده عمل الکتروفورز به دو روش ژل آگارز و ژل فرم آلدئید-آگارز انجام گرفت که در الکتروفورز با ژل آگارز از ژل یک درصد و بافر TBE (0.5X) و یا TAE (1X) برای بافر تانک و ژل استفاده شد. سپس ۴ میکرولیتر از نمونه RNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر از لودینگ بافر (Loading Buffer) مخلوط شده، درون چاهک‌های ژل ریخته شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گردید.

از آنجایی که RNA به سرعت توسط آنزیم RNase موجود در محیط تجزیه می‌شود، در الکتروفورز RNA با استفاده از ژل فرم آلدئید-آگارز، معمولاً از آب مقطر تیمار شده با DEPC و بافر MOPS استفاده می‌گردد. در این روش، از ژل آگارز یک درصد و بافر MOPS (1X) استفاده شد. در ادامه، پس از آماده شدن ژل، همانند ژل آگارز، نمونه‌های RNA درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل فرم آلدئید-آگارز اضافه گردید. سنجش کمیت RNA استخراج شده با بررسی جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با استفاده از فرمول "فاکتور رقت $\times A_{260} \times 40$ "

UV-ترانسلومیناتور باند مربوطه مشاهده و اندازه آن تخمین زده شد. قطعه تکثیر شده ژن *mnp* با استفاده از دستورالعمل کیت خالص‌سازی DNA از ژل شرکت Bioneer (K-3035-1) جدا و خالص‌سازی گردید.

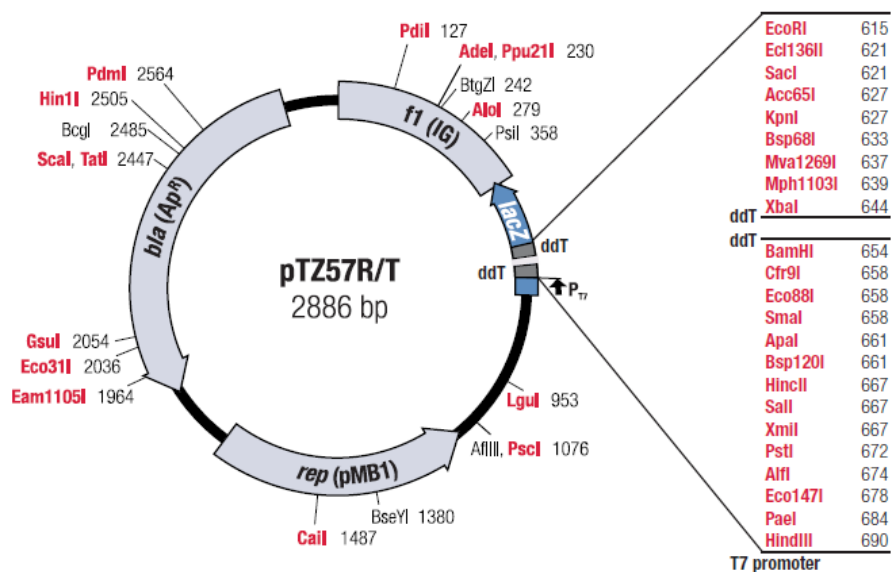
(TBE) با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت استفاده شد و رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید صورت گرفت. پس از الکتروفورز محصولات PCR همراه با سایز مارکر *Lambda DNA/EcoRI+ Hind III*، با استفاده از دستگاه

جدول ۱- اجزای مخلوط واکنش PCR

غلظت نهایی (در حجم ۲۵ μl)	مقدار مصرف در هر واکنش (μl)	موارد مورد نیاز
۱ X	۲/۵	بافر PCR (۱۰ X)
۱ mM	۱/۲۵	کلرید منیزیم (۵۰ mM)
۰/۲ mM هر نوکلئوتید	۰/۵	دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ mM)
۰/۴ pmol/μl	۱	آغاز گر رفت (۱۰ pmol/μl)
۰/۴ pmol/μl	۱	آغاز گر برگشت (۱۰ pmol/μl)
-	۵	cDNA الگو
۱/۵ U/۲۵ μl	۰/۳	DNA پلیمرز <i>Taq</i> (۵ U/μl)
-	۱۳/۴۵	آب مقطر دیونیزه استریل

تکثیر شده به باکتری اشرشیاکولی نژاد DH5α وارد شد. بعد از ۱۶ ساعت از کشت سلول‌های مستعد شده بر روی پلیت محیط کشت LB حاوی آنتی بیوتیک پنی‌سیلین، کلنی‌های کوچکی نمایان شدند. در این مرحله، کلونی‌های سفید باکتری‌های نوترکیب به محیط کشت مایع انتقال داده و به آنها اجازه داده شد تا رشد کرده، به OD حدود ۰/۷ برسد. سپس با استفاده از دستورالعمل Maniatis و همکاران (۱۹۸۹) اقدام به استخراج پلاسمید از باکتری‌های نوترکیب برای تأیید ترانسفورماسیون گردید.

همسانه‌سازی ژن *mnp* با استفاده از *InsT/Aclone™* PCR Product Cloning Kit به شماره کاتالوگ K1214 انجام شد. باکتری مورد استفاده اشرشیاکولی از نژاد DH5α بود. مراحل انجام همسانه‌سازی به این ترتیب بود: در مرحله اتصال، T/A و کتور مورد استفاده pTZ57R/T با اندازه ۲۸۸۶ جفت باز بود (شکل ۱). نسبت DNAهای مورد استفاده از ۱:۱ تا ۱:۶ (DNA مورد نظر: وکتور) متغیر بود. در ادامه، با استفاده از دستورالعمل Maniatis و همکاران (۱۹۸۹) با اعمال تغییراتی ژن *mnp*



شکل ۱- نقشه هضم آنزیمی در ناقل pTZ57R/T

جدول ۲- ترکیبات هضم آنزیمی

تورکیبات	هضم با آنزیم <i>Hind III</i> (μl)	هضم با آنزیم <i>kpn I</i> (μl)	هضم مضاعف (μl)
آنزیم (<i>Hind III</i>)	۱	-	۱
آنزیم (<i>kpn I</i>)	-	۱	۱
DNA (پلاسمید + ژن <i>mnp</i>)	۵	۵	۵
بافر Tango (۱۰X)	۲	۲	۲
آب	۱۲	۱۲	۱۱
کل	۲۰	۲۰	۲۰

برای تأیید اندازه پلاسمید نوترکیب، نخست پلاسمید به صورت خطی درآمد. برای این منظور، پلاسمید نوترکیب با آنزیمی که تنها دارای یک سایت برشی در پلاسمید نوترکیب است، برش داده شد. آنزیم انتخاب شده *Hind III* بود که هیچ گونه سایت برشی در ژن *mnp* نداشته، تنها دارای یک سایت برشی در پلاسمید pTZ57R/T است. برای تأیید الگوی هضمی پلاسمید استخراج شده با الگوی هضمی پلاسمید نوترکیب مورد انتظار (بر اساس توالی

از هضم مضاعف با آنزیم‌های *Hind III* و *kpn I* که کل ژن را از ناقل جدا می‌کنند، استفاده شد (جدول ۲). از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد برای بررسی نتایج هضم استفاده گردید. در مرحله آخر، برای تأیید نهایی این که قطعه وارد شده به پلاسمید همان ژن *mnp* است، پلاسمید نوترکیب برای تعیین توالی فرستاده شد.

نتیجه‌گیری و بحث

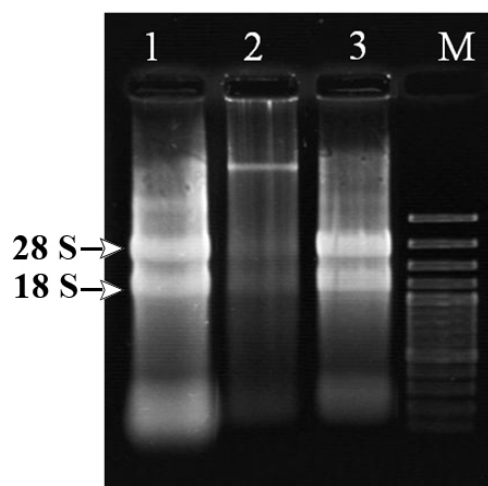
نسبت A_{260}/A_{280} در نمونه‌های استخراج‌شده، با استفاده از سه روش گوانیدین تیوسانات-فنل-کلروفرم (AGPC)، مبتنی بر کلرید لیتیم و کیت تجاری RNA-X plus به ترتیب، 1.2 ± 1.4 و 1.1 ± 1.9 بود (جدول ۳). وضوح و شدت باندهای ۱۸SrRNA و ۲۸SrRNA در RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز و یا فرم آلدئید-آگارز نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج شده است (شکل ۲). کیفیت این باندها مطابق با شکل ۱ در روش‌های گوانیدین تیوسانات-فنل-کلروفرم و کیت

تجاری RNA-X plus به مراتب بهتر از روش مبتنی بر کلرید لیتیم بود. بهترین نسبت برای A_{260}/A_{280} در مورد RNA عددی بین ۱/۸ تا ۲ است که نسبت‌های بیشتر از ۲ و کمتر از ۱/۸ نشان‌دهنده آلودگی‌های فنلی و پروتئینی هستند. بر این اساس، در روش مبتنی بر کلرید لیتیم، بیشترین میزان ناخالصی‌های پروتئینی دیده می‌شود، اما روش‌های گوانیدین تیوسانات-فنل-کلروفرم و کیت تجاری RNA-X plus سیناژن از نظر عملکرد و کیفیت RNA حاصله برتر از روش اول هستند (جدول ۳).

جدول ۳- عملکرد RNA و نسبت A_{260}/A_{280} در سه روش AGPC، روش مبتنی بر کلرید لیتیم و کیت تجاری RNA-X plus

A_{260}/A_{280}	عملکرد RNA ($\mu\text{g/ml}$)	روش جداسازی RNA
2 ± 1	22 ± 3	AGPC
1.4 ± 1	17 ± 2	روش مبتنی بر کلرید لیتیم
1.9 ± 1	54 ± 6	کیت تجاری RNA-X plus سیناژن

* هر یک واحد از A_{260} معادل با $40 \mu\text{g/ml}$ ملکول RNA برآورد شده است.

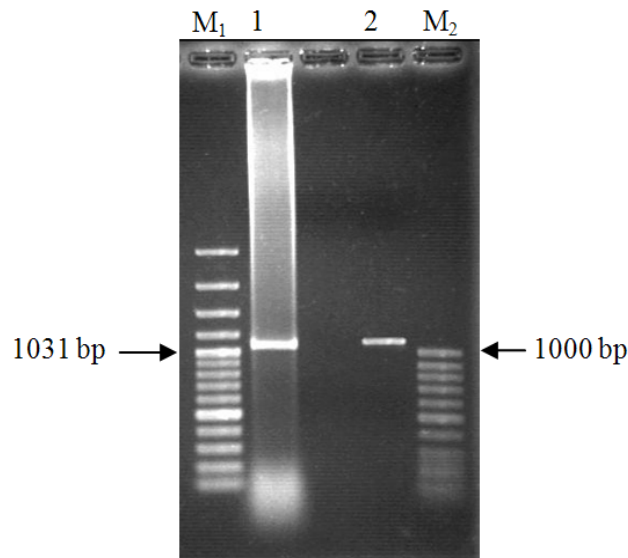


شکل ۲- RNA کل استخراج شده بر روی ژل فرم آلدئید-آگارز (۱/)

- 1 RNA استخراج شده با دستورالعمل Chomczynski and Sacchi (1987).
 - 2 RNA استخراج شده با دستورالعمل Sreenivasaprasad (2000).
 - 3 RNA استخراج شده به وسیله کیت تجاری RNA-X plus.
- M سایز مارکر DNA (۱۰۰ bp).

می‌رفت، اما برای حذف مواد زائد به جای مانده از PCR و همچنین آغازگرهای استفاده نشده، قطعه ۱۰۶۵ bp از روی ژل آگارز ۱٪ با استفاده از کیت تجاری خالص‌سازی ژل شرکت Bioneer (K-3035-1) جداسازی شد. تکرار عمل الکتروفورز بر روی نمونه خالص‌شده از روی ژل، کیفیت و مقدار قطعه جدا شده را برای انجام فرایند توالی‌یابی تأیید کرد (شکل ۳).

از آنجایی که هدف تکثیر یک قطعه اختصاصی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بود، RNA استخراج شده مستقیماً برای تهیه cDNA استفاده گردید. اندازه قطعه تکثیر شده توسط PCR با مراجعه به بانک‌های اطلاعاتی تکثیر شده (NCBI، ebi و expasy) حدود ۱۰۶۵ جفت باز گزارش شده است. با اینکه برای تکثیر از آغازگرهای اختصاصی استفاده می‌شد و انتظار مشاهده تک‌باند بر روی ژل آگارز



شکل ۳- تکثیر ژن *mnp* با استفاده از آنزیم پلیمرز *Taq* بر روی ژل آگارز ۱٪

1- محصول PCR با بهینه‌سازی چرخه‌های دمایی

2- PCR خالص‌سازی شده با استفاده از کیت تجاری خالص‌سازی DNA از ژل (Bioneer)

M₁- سایز مارکر ۱۰۰ bp

M₂- سایز مارکر ۵۰ bp

محصول اتصال حاصل از نسبت ۷ به ۱ (DNA به ناقل) بهترین نتیجه را به واکنش اتصال داد و کلونی‌های سفید رنگ که نشان‌دهنده ورود ژن به پلاسمید (در سیستم تشخیص سفید/آبی) است، در این نسبت بیشترین میزان را شامل می‌شد.

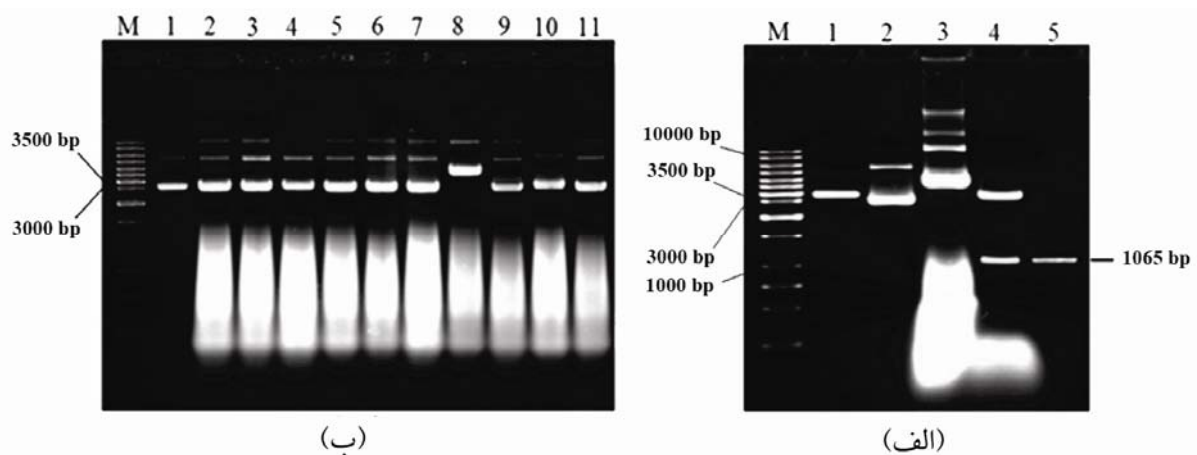
پس از انجام ترانسفورماسیون و کشت باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-Gal و IPTG و ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، کلونی‌های آبی و سفید ظاهر گردیدند (شکل ۴-۶). برای انجام عمل اتصال (Ligation) مقدار DNA به ناقل با نسبت‌های ۳، ۵ و ۷ استفاده شد.

بدون قطعه مورد نظر که به‌عنوان شاهد استفاده شده بود، صحت آزمایش‌های ورود قطعه ژن *mnp* را در پلاسمید تأیید کرد.

توالی‌یابی و اطلاعات ملکولی تکمیلی

قطعه ویرایش شده نهایی، در بانک اطلاعاتی NCBI برای بررسی همولوژی آن در میان موجودات دیگر بررسی شد. نتایج این بررسی‌ها نشان داد، که قطعه توالی‌یابی شده در بین بسیاری از موجودات مختلف، از جمله: باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان دارای قسمت‌های مشابهی است. میزان این تشابه در موجوداتی، مانند برخی از قارچ‌ها و باکتری‌ها بسیار زیاد بود. براساس اطلاعات دریافت شده از سایت www.ebi.ac.uk آنزیم منگنز پراکسیداز (MnP) جزو خانواده پراکسیدازهای گیاهی و زیر مجموعه لیگنینازها طبقه‌بندی شده است.

استخراج پلاسمید از تمام کلونی‌های سفید انجام شد، اما در شکل ۴ قسمت (الف)، تنها در یکی از کلونی‌های انتخاب شده پلاسمید تراریخته وجود داشت. اسمیر انتهای ژل نیز نمایانگر آلودگی‌های پروتئینی به‌جا مانده از استخراج پلاسمید است (شکل ۳-الف). پس از هضم پلاسمیدها، برش‌های منفرد و مضاعف به‌وسیله آنزیم‌های برشی *Kpn I* و *Hind III* انجام گرفت. در برش‌های منفرد، با توجه به اندازه پلاسمید خطی بدون قطعه وارد شده که حدود ۲۸۸۶ bp است (شکل ۳-ب، چاهک ۱)، باند پلاسمید مشاهده شده در صورت داشتن قطعه ژن *mnp* باید اندازه‌ای معادل $2886 + 1065 = 3951$ bp مشاهده گردد. باند مذکور در شکل ۳ قسمت ب در چاهک شماره ۳ مشاهده می‌شود. برش مضاعف پلاسمید دارای قطعه موردنظر نیز باعث جدایی ژن *mnp* از پلاسمید شده، این قطعه را به صورت باندهای جداگانه قابل مشاهده کرد (شکل ۳-ب، چاهک ۴). الگوی هضم پلاسمید حلقوی و خطی شده



شکل ۳ الف) هضم پلاسمید دارای ژن همسانه‌شده (۱- پلاسمید خطی شده pTZ57R/T، ۲- پلاسمید طبیعی pTZ57R/T، ۳- پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه خارجی؛ ۴- هضم مضاعف پلاسمید نوترکیب یا استفاده از آنزیم‌های *Hind III* و *Kpn I*؛ ۵- ژن *mnp* پس از خالص‌سازی از ژل، M- مارکر وزن ملکولی DNA (۱ kb))
 ب) استخراج پلاسمید با روش Maniatis و همکاران (۱۹۸۹)؛ ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱: نمونه‌های پلاسمید فاقد قطعه خارجی (ژن موردنظر)، ۸- پلاسمید نوترکیب، M- مارکر وزن ملکولی DNA (۱ kb))

مذکور و در قسمت مربوط به توضیحات آنزیم منگنز پراکسیداز آورده شده است که این آنزیم یک همو پروتئین است که توسط قارچ‌های بازیدیومیست تولید شده، توانایی تجزیه ترکیبات لیگینی را دارد.

با توجه به نتایج حاصله در multiple alignment نوکلئوتیدی مبنی بر اینکه در توالی‌های مشابه در گونه‌های نزدیک به *A. bisporus*، در این دو مکان نوکلئوتیدی متفاوت بوده و در نتایج multiple alignment پروتئینی توالی‌های مشابه در گونه‌های نزدیک به *A. bisporus*، تغییر در نوکلئوتیدهای ۶۵۷ و ۸۵۰ به ترتیب باعث تبدیل اسید آمینه‌های ایزولوسین و سرین به والین و آلانین شده است، می‌توان حدس زد که این توالی آمینواسیدی ژن *mnp*، توالی ثانویه برای آنزیم منگنز پراکسیداز گونه *A. bisporus* (دارای دو موتاسیون نقطه‌ای) باشد. این احتمال وجود دارد که این موتاسیون نتیجه به کارگیری از نژاد IM008 اصلاح شده در جهاد دانشگاهی مشهد باشد، اما این موضوع در حد یک احتمال بوده، باید مورد تحقیقات بیشتری قرار گیرد.

نژاد قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* با استفاده از نشانگرهای AFLP، مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی) ۶۷-۵۸: ۲۲.

Chomszynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.

پس از تعیین ترتیب صحیح نوکلئوتیدها در توالی شناسایی شده و بررسی منحنی‌های حاصل از توالی‌یابی ژن *mnp* در قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus*)، مشابه‌ترین توالی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، با استفاده از نوکلئوتید بلاست بررسی شد. توالی شناسایی شده با مورد موجود در بانک اطلاعاتی NCBI تطبیق داده شد و مشخص گردید که بجز نوکلئوتیدهای ۶۵۷ و ۸۵۰ در بقیه نوکلئوتیدها مشابه هستند. ویژگی‌ها و توالی رشته پلی‌پپتیدی حاصل از توالی دو رشته مشابه با استفاده از سایت www.expasy.org/tools تعیین گردید (شکل ۶). ژن *mnp1* به‌عنوان ژن ثبت شده و توالی *mnp* به‌عنوان ژن توالی‌یابی شده بیان می‌شود.

mnp1: Theoretical pI/Mw: 4.18 / 37636.22

mnp: Theoretical pI/Mw: 4.33 / 32686.23

بر اساس اطلاعات مندرج در سایت www.ebi.ac.uk

آنزیم منگنز پراکسیداز (EC 1.11.1.13) به نام‌های دیگری Mn-dependent (NADH-oxidizing) peroxidase, Peroxidase-M2 and Mn-dependent peroxidase نیز شناخته می‌شود. همچنین، این آنزیم به کوفاکتور آهن نیز برای انجام فعالیت‌های خود نیازمند است. در سایت

منابع

فارسی، م. و گردان، ح. ر. (۱۳۸۶) پرورش و اصلاح قارچ‌های خوراکی با تأکید بر قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران.

قربانی‌فعال، پ.، فارسی، م.، پوریان‌فر، ح. ر.، محمودنیا میمند، م. و ذوالعلی، ج. (۱۳۸۷) تهیه شناسنامه ملکولی برای ۱۲

Chen, D. M., Taylor, A. F. S., Burke, R. M., and Cairney, J. W. G. (2001) Identification of genes for lignin peroxidases and manganese peroxidases in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 152:151-158.

- Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 55: 170-176.
- Ma, B., Mayfield, M. B., Godfrey, B. J. and Gold, M. H. (2004) Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. Eukaryotic Cell 3: 579-588.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2ndEd, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Moloy, S. (2004) Sugar transport and water relations of *Agaricus bisporus*. Ph.D Thesis, Cranfield University, United Kingdom.
- Nagai, M., Sakamoto, Y. and Nakade, K. (2007) Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*. Mycoscience 48: 125-130.
- Sreenivasaprasad, S. (2000) Isolation of fungal nucleic acids. In: The nucleic acid protocols handbook (ed. Rapley, R.), Humana Press, New Jersey.
- Tagger, S., Perissol, C., Gil, G., Vogt, G., and Le Petit, J. (1998) Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). Enzyme and Microbial Technology 23: 372-379.
- Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., and Anke, T. (1998) Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). Applied and Environmental Microbiology 64: 1601-1606.
- Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology 30: 454-466.
- Irie, T., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2001) Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology 55: 566-570.
- Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2004) Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Apply Microbiology and Biotechnology 65: 287-294.
- Lankinen, P., Hilden, K., Aro, N., Salkinoja-salonen, M. and Hatakka, A. (2005) Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization, Apply Microbiology and Biotechnology 66: 401-407.
- Lankinen, V. P., Bonnen, A. M., Anton, L. H., Wood, D. A., Kalkkinen, N., Hatakka, A., and Thurston, C. F. (2001) Characteristics and N-terminal amino acid sequence of manganese peroxidase from solid substrate cultures of

Isolation and cloning of cDNA manganese peroxidase gene (*mnp*) from white button Mushroom (*Agaricus bisporus*), introduction to genetic manipulation

* Javad Hassan Janpoor and ¹ Mohammad Farsi

¹ Department of Biotechnology and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract

Mushrooms, in addition to their nutritional values, are currently considered as useful tools for biological of agricultural wastes to useful food products. In the button mushroom (*Agaricus bisporus*), there are several enzymes which catalyze lignin compounds of the compost during the mycelia growth and the fructification phases. Manganese Peroxidase (MnP), as one of the most important lignin-degrading enzymes, plays a key role in degradation of lignin compounds in the button mushroom. To achieve a high yield of MnP in the *A. bisporus*, the gene encoding MnP was isolated, characterized and cloned. The total RNA was extracted from the mycelium growing on the liquid compost extract medium, followed by construction of its cDNA by reverse transcriptase. The PCR products were then inserted into the pTZ57R/T cloning vector, and transferred into *E. coli* (the DH5 α strain). Finally, the plasmid was extracted from the transgenic bacteria, followed by enzymatic digestion and nucleotide sequencing. The BLAST analysis revealed two different nucleotides (657 and 850) between the cloned fragment (generated in this research) and the *mnp1* (available in the gene bank of NCBI). The difference in the nucleotide positions of 657 and 850 subsequently changed Isoleucine to Valine and Serin to Alanine, respectively.

Key words: Reverse transcriptase enzyme, Agriculture wastes, pTZ57R/T vector, Molecular cloning