



## جداسازی و همسانه‌سازی ژن منگنزپراکسیداز (*mnp*) از قارچ صدفی خوراکی

مژگان پروندی<sup>۱\*</sup>، محمد فارسی<sup>۲</sup>، امین میرشمسی<sup>۳</sup>، محسن اشرفی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۲</sup>استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۳</sup>استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

<sup>۴</sup>دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۱۱

### چکیده

در قارچ صدفی خوراکی (*Pleurotus ostreatus*) آنزیم‌های مختلفی از ابتدای رشد میسلیمی تا انتهای دوره‌ی میوه‌دهی، تجزیه ترکیبات لیگنینی را در محیط کشت بر عهده دارند. چوب، بقایای گیاهی و بیشتر ضایعات گیاهی دیگر در طبیعت تحت عنوان ترکیبات لیگنوسلولزی نامیده می‌شوند. لیگنوسلولز عمدتاً از سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل می‌شود. آنزیم منگنزپراکسیداز (EC:1:11:1:13)، یکی از عمومی‌ترین پراکسیدازهای تخریب‌کننده لیگنین است که توسط اکثر قارچ‌های تجزیه‌کننده چوب و نیز بسیاری از قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست تولید می‌شود. در این پژوهش به منظور جداسازی cDNA ژن *mnp* قارچ صدفی خوراکی (*P. ostreatus var. florida*)، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA انجام و بر اساس توالی ژن *mnp* و با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier (V. 5.0) آغازگرها طراحی گردید و با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. قطعه تکثیر شده در ناقل PTG19-T وارد شد و با استفاده از توالی‌یابی تأیید شد. در ادامه، ژن *mnp* در ناقل p13H88 همسانه‌سازی گردید. سپس با روش یخ-ذوب به *E. coli* (سویه DH5 $\alpha$ ) منتقل و تأیید حضور آن در باکتری با روش هضم آنزیمی انجام گرفت. نتایج نشان داد که ژن *mnp* در ناقل p13H88 همسانه‌سازی شده است. پلاسمید نوترکیب بدست آمده با نام p13H88-FM نامگذاری شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه لیگنین، ناقل، لیگنوسلولز، منگنزپراکسیداز.

مقدمه

از کمپوست تولید شده باشد. در نتیجه، استفاده از کمپوست نیازمند توانایی تولید مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه کننده ترکیبات لیگنینی در قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌باشد (Moloy, 2004).

cDNA ژن *mnp* از قارچ‌های خوراکی صدفی (Irie et. al., 2001)، شی‌تاکه (Nagai et. al., 2007)، دکمه‌ای (Lankinen, 2004) و سه ایزوزایم ژن منگنز پراکسیداز از قارچ *Phanerochaete chrysosporium* (Godfrey et. al., 1990) جداسازی و تعیین توالی گردید. توالی ژن *mnp-1* در گونه *P. chrysosporium* حدود ۲۵۳۹ جفت باز بوده و مقایسه cDNA و توالی‌های ژنومی نشان می‌دهد که در موقعیت ۵۷-۷۲، ۶ ایترون متفاوت دارند. تجزیه و تحلیل نوردن بلات<sup>۱</sup> نشان داده که ژن *mnp-1* توسط HSPs (عناصر شوک حرارتی)<sup>۲</sup> تنظیم می‌شود. همچنین ژنوم قارچ مدل *Schizophyllum commune* نیز که به احتمال زیاد منبع خوبی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنوسلولزی است، توالی‌یابی شده است (Robin et. al., 2010). در مطالعه دیگری، بیان سه ژن منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و گلی‌اکسال اکسیداز با استفاده از تکنیک RT-PCR در قارچ *P. chrysosporium* بررسی شده و نتایج حاکی از بیان متفاوت این ژن‌ها است. الگوهای رونویسی به‌طور چشمگیری با همدیگر متفاوتند که این امر احتمالاً ناشی از فعالیت متفاوت

آنزیم منگنز پراکسیداز، یکی از عمومی‌ترین پراکسیدازهای تجزیه کننده لیگنین است که توسط اکثر قارچ‌های تجزیه کننده چوب و نیز بسیاری از قارچ‌های تجزیه کننده کمپوست و قارچ‌های پوسیدگی سفید از جمله قارچ خوراکی صدفی تولید می‌شود (Hofrichter, 2002). منگنز پراکسیداز یک آنزیم خارج سلولی بوده و دارای یک هسته مرکزی پراکسیداز است. در صورتیکه این هسته مرکزی تحلیل پیدا کند، به یون  $Mn^{+2}$  نیاز پیدا می‌کند. آنزیم منگنز پراکسیداز،  $Mn^{+2}$  را به  $Mn^{+3}$  اکسیده می‌کند و  $Mn^{+3}$  نیز به نوبه خود ساختارهای فنولیک را به رادیکال‌های فنوکسیل اکسیده می‌نماید (Gold et. al., 1989).  $Mn^{+3}$  ایجاد شده، بسیار فعال است و با کلات کردن اسیدهای آلی مانند اکسالات یا مالات که بوسیله قارچ‌ها تولید می‌شوند، کمپلکس تشکیل می‌دهد (Makela et. al., 2002). با کمک این کلات‌ها، یون‌های  $Mn^{+3}$  پایدار شده و می‌توانند به درون موادی مانند چوب نفوذ کنند. قارچ‌های پوسیدگی سفید و قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست می‌توانند لیگنین را با سرعت بیشتری نسبت به میکروارگانسیم‌های دیگر، تجزیه کنند (Hatakka, 2001).

یکی از مشکلات موجود در صنعت پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید، کاهش و یا توقف تولید در برداشت سوم است که به‌نظر می‌رسد عامل اصلی این مشکل، اتمام مواد غذایی برای مصرف این قارچ و عدم توان استفاده بهینه

<sup>1</sup> Northern blot

<sup>2</sup> Heat Shock Proteins

قارچ‌های پوسیدگی سفید وجود دارد، ولی اخیراً یک ژن سنتز کننده آنزیم منگنز پراکسیداز در قارچ‌های میکوریزا (*Cortinarius rotundisporus*) شناسایی شده که تاکنون هیچ‌گونه فعالیتی از آن گزارش نشده است (Chen et. al., 2004). به‌علاوه، مهمترین قارچ تجزیه‌کننده کمپوست که آنزیم منگنز پراکسیداز را تولید می‌کند، قارچ دکمه‌ای خوراکی (*Agaricus bisporus*) است (Bonnen et. al., 2004, Lankinen et. al., 1994). گونه‌هایی از خانواده قارچ‌های کوپرینوس مانند *Paneolus sphinctrinus* (Heinzkill et. al., 1998) و قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات گیاهی مانند *Marasmius quercophilus* (Tagger et. al., 1998)، نیز آنزیم منگنز پراکسیداز را تولید می‌کنند. از طرف دیگر، یکی از عوامل قابل توجه به انتقال ژن در قارچ‌های خوراکی، پیشبر مورد استفاده است که سبب هدایت و بیان ژن موردنظر می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهند موفقیت‌آمیزترین پیشبر مورد استفاده در این آزمایشات، *gpdII* می‌باشد که از قارچ دکمه‌ای سفید جداسازی شده است. پیشبر *gpdII* مربوط به ژن گلیسرآلدئید-۳ فسفات دهیدروژناز II است که پیشبر یک ژن خانه‌دار<sup>۱</sup> می‌باشد و هنوز خاموشی مهار مشترک<sup>۲</sup> در آن گزارش نشده است (Burns et. al., 2006).

تکنیک جداسازی ژن جهت بررسی ویژگی‌های آن و ساخت سازه‌های اختصاصی

آنزیم‌ها در خاک مناطق مختلف است (Janse et. al., 1998). دو ایزوزایم منگنزپراکسیداز در قارچ *Pleurotus eryngii* جداسازی و ویژگی‌های کاتالیزوری آن‌ها مشخص گردید. این بررسی نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیمی منگنزپراکسیداز در محیط کشت مایع حاوی پیتون بدست می‌آید و استفاده از مکمل  $Mn^{+2}$  در غلظت ۴۰۰۰-۱ میکرومول، از تولید این آنزیم در محیط کشت مایع جلوگیری می‌کند (Maria et. al., 1996). همچنین (Sovan et al., 1997) خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی ایزوآنزیم‌های منگنز پراکسیداز قارچ *Pleurotus ostreatus* را بررسی کردند. نتایج بدست آمده نشان داد ترکیب مواد مورد استفاده در محیط کشت، در تولید متفاوت ایزوزایم گونه‌های مختلف قارچ بسیار مهم است و ژن *mnp* در گونه‌های *Pleurotus* شبیه هم ولی متفاوت از گونه *P. chrysosporium* است. در ادامه مطالعات مربوط به فعالیت آنزیمی منگنز پراکسیداز، تولید این آنزیم در قارچ *Pleurotus ostreatus* بررسی گردید که با نتایج بدست آمده در گزارشات قبلی همخوانی داشت. در واقع با بررسی تولید ایزوزایم منگنز پراکسیداز در محیط‌های کشت با ترکیبات متفاوت، بیشترین سطح فعالیت این آنزیم پس از ۸ روز در محیط کشت مایع PGY (پیتون- گلوکز-عصاره مخمر) بدست آمد (Kamitsuji et. al., 2004). اگرچه اطلاعات اندکی در مورد چگونگی تولید آنزیم منگنز پراکسیداز در بازیدیومیست‌ها در مقایسه با دیگر

<sup>1</sup> House keeping

<sup>2</sup> Cosuppression

صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد) استفاده شد. کشت بافت میسلیوم قارچ مطابق با روش (Castle et. al., 1988) و کشت مایع نیز طبق روش ارائه شده توسط Calvo-bado et. al., (2000) انجام گرفت.

استخراج RNA و بررسی کمی و کیفی: استخراج RNA کل سلول، با استفاده از کیت تجاری RNA-X plus (CinnaGen, RN7713c) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات انجام شد. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA به ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد با بفر TAE (1X) و نانودراپ (Nanodrop 2000, UV-Vis spectrophotometer) استفاده شد.

تکثیر ژن *mnp* قارچ صدفی خوراکی: جهت سنتز cDNA از دستورالعمل کیت Strand cDNA Revert Aid™ First و Synthesis (k1631) (Fermentas,)

آغازگر Oligo dT استفاده شد. با توجه به تسوالی ژن *mnp* به شماره دسترسی U21879.1 در پایگاه NCBI، آغازگرها با در نظر گرفتن سایت‌های برشی، توسط نرم‌افزار Primer Premier (V. 5.0) طراحی شدند.

تسوالی آغازگر رفت -5' ATACCATGGATGACCTTTGCTTC  
3'-GCTTTC و آغازگر برگشت  
5'TTAGGTAACCTTACGCAGGTG

3'-GGACACG- بود. آغازگرها توسط شرکت ماکروژن (MACROGEN, Korea) سنتز گردید. برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت، چرخه نخست:

برای اهداف مختلف سال‌هاست توسط محققان صورت می‌پذیرد. از جمله این پژوهش‌ها جداسازی ژن‌های PARS I و PARS II و همسانه‌سازی آن‌ها و متعاقباً مطالعه نرم‌افزاری خصوصیات فیزیکوشیمیایی، ساختار مولکولی و قرابت ژنتیکی نشان داد که دو آنزیم PARS I و PARS II به خانواده نوکلئازهای S1/P1 تعلق داشته و شباهت زیادی به نوکلئازهای اختصاصی DNA هترو دوپلکس دارند (Mirzaei et.al., 2015). همچنین ساخت سازه پلاسمیدی چندگانه حاوی سه گروه مهم از پروتئین‌های مربوط به بیماریزایی با نام‌های PR1، PR2 و PR3 سبب شد که از یک سو دوام مقاومت نسبت به بیماری‌ها را به همراه داشته و از طرف دیگر باعث مقاومت به انواع گسترده‌ای از گونه‌های بیماریزا می‌گردد (Raufi et. al., 2011).

هدف این پژوهش، جداسازی ژن *mnp* از قارچ صدفی خوراکی نژاد فلوریدا و همسانه‌سازی آن در سازه اختصاصی قارچ دکمه‌ای خوراکی سفید (*A. bisporus*) با نام p13H88 حامل پیشبر *gpdII* جهت انتقال به قارچ دکمه‌ای سفید از طریق روش مبتنی بر آگروباکتریوم بود.

#### مواد و روش‌ها

کشت میسلیوم: در این مطالعه، از قارچ خوراکی صدفی، نژاد فلوریدا (تهیه شده از مرکز اسپاون زیست‌فناوری قارچ‌های

میکروگرم بر میلی لیتر) بود. برای غربالگری کلون‌های حاوی قطعه DNA هدف از روش هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم‌های *BstEII* (RE1316, Vivantis) و *NcoI* (Vivantis, RE1190) و بافر مشترک  $V_5$  مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. این پلاسمید نو ترکیب که pT-FM نامگذاری شد، جهت انجام توالی‌یابی به شرکت ماکروژن (MACROGEN, Korea) ارسال گردید. پس از تأیید ژن *mnp* باند مربوط، از پلاسمید pT-FM (هضم شده توسط آنزیم‌های *BstEII* و *NcoI*) طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، از روی ژل بازیابی گردید. قطعه کلون شده در پلاسمید pTG19-T (شکل ۲، B) با استفاده از آغازگرهای *mnp-F* و *mnp-R* که به ترتیب آغازگرهای رفت و برگشت بودند، به صورت دو بار خوانش توالی‌یابی شدند. سپس با استفاده از نرم افزار CLC Main workbench توالی‌های بدست آمده و قطعات همپوشان<sup>۱</sup> تشکیل و قطعه توافقی ایجاد شده با نمودار توالی‌ها مورد بررسی قرار داده شد تا نواحی نامشخص بر اساس این نمودار تصحیح شود. برای بررسی هم‌ردیفی، قطعه بدست آمده در بانک NCBI مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که قطعه‌ی توالی‌یابی شده دارای شباهت ۹۸٫۵ درصدی با قطعه موردنظر

۳' در دمای ۹۴°C، ۳۴ چرخه بعدی: ۹۴°C به مدت ۵۰"، ۵۵°C به مدت ۵۰" و ۷۲°C به مدت ۹۰" و چرخه نهایی: ۷۲°C به مدت ۵' انجام گرفت. مخلوط اجزای واکنش PCR شامل ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱۵۰ نانوگرم cDNA، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۵۰ میلی مولار)، ۰/۲ میکرولیتر مخلوط آنزیمی (5U/μL) با نسبت ۵ به ۱ (taq/pfu)، در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. برای بررسی کیفی، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

ساخت سازه حاوی پیشبر *gpdII* و ژن *mnp*: جهت انجام واکنش اتصال، باند مربوط به ژن *mnp* با استفاده از کیت Gel DNA Recovery (Vivantis, GF-PL-) (050) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده از ژل تخلیص شده و برای انجام همسانه‌سازی با ناقل پلاسمیدی TAO10-S)PTG19-T (Vivantis, DH5α) آماده گردید. از سویه باکتری مستعد *Ecoli* به‌عنوان میزبان در مراحل همسانه‌سازی و تکثیر DNA پلاسمیدی استفاده شد. با استفاده از دستورالعمل (Maniatis et. al., 1987) و با اعمال تغییراتی پلاسمید به باکتری وارد شد. جهت انتخاب کلنی‌ها از روش آبی- سفید استفاده شد (Sambrook & Russel, 2001). آنتی‌بیوتیک مورد استفاده آمپی‌سیلین (۱۰۰

<sup>1</sup> Contig

## نتایج و بحث

تکثیر ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*) در قارچ

## صدفی با استفاده از PCR

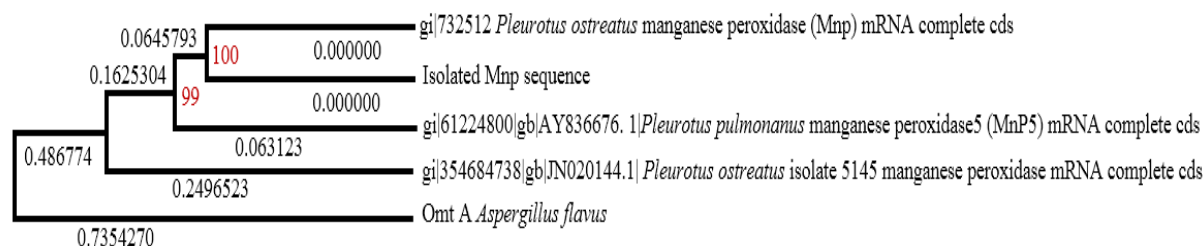
هشت روز پس از زمان کشت در محیط جامد PDA (شکل 3C)، پرگنه قارچ صدفی سطح پتری‌دیش را پوشاند (شکل 3A). نمونه‌هایی که رشد میسیلیوم‌ها در آنها به صورت پنبه‌ای بودند، برای انجام آزمایش استفاده شد. علت استفاده از هر دو نوع محیط کشت جامد و مایع این است که RNA کل استخراج شده (شکل 3B) از میسیلیوم محیط کشت مایع از کیفیت مطلوبتری نسبت به میسیلیوم محیط کشت جامد برخوردار است. در کشت‌های جامد به علت پیر شدن میسیلیوم، جداسازی آن به‌سختی انجام می‌گیرد، لذا کشت مایع میسیلیومی نتیجه بهتری دارد. نسبت A260/A280 در نمونه‌های استخراج شده  $1 \pm 0.98$  بود. وضوح باندهای 28S و 18S بر روی ژل آگارز نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA استخراج شده است. تکثیر ژن *mnp* با هر دو آغازگر طراحی شده به‌درستی انجام شد و همان‌طور که انتظار می‌رفت قطعه حدود ۱۰۸۶ نوکلئوتیدی تکثیر گردید. شکل 3A محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *mnp* به‌همراه مارکر نشانه ۱ کیلوبازی (Fermentas, SM1163) را نشان می‌دهد.

(gi|732512) می‌باشد. سپس با توالی‌های نشان داده شده در شکل ۱ مورد هم‌ردیفی قرار گرفت تا نشان داده شود که این توالی با دیگر ژن‌های *mnp* موجود در جنس *Pleurotus* متفاوت است. قطعه‌ای از ژن *omtA* قارچ *Aspergillus flavus* به‌عنوان Outgroup انتخاب شد تا صحت درخت فیلوژنی رسم شده تأیید گردد.

پلاسمید مورد استفاده با نام p13H88 حامل پیش‌سبر *gpdII* و ژن گزینش‌گر *hph*<sup>۱</sup> می‌باشد (شکل 2A). در بخش بعدی، پس از استخراج پلاسمید p13H88، هضم مضاعف با استفاده از آنزیم‌های *NcoI* و *BstEII* انجام شد (شکل 6B). نسبت DNA‌های مورد استفاده برای انجام واکنش اتصال با استفاده از فرمول کرانبرگ (Cranenburgh, 2004) محاسبه گردید و از روش هضم آنزیمی (با آنزیم‌های *NcoI* و *BstEII*) برای شناسایی کلنی‌های حاوی ژن *mnp* استفاده شد.

پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن *mnp* (FM-p13H88) به آگروباکتریوم سویه LBA4404 و تأیید به روش هضم آنزیمی: ترانسفورماسیون به روش یخ-ذوب (Sambrook & Russel, 2001) انجام گردید. آنزیم‌های مورد استفاده جهت هضم آنزیمی *NcoI* و *BstEII* می‌باشد که مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شدند.

<sup>1</sup> Hygromycin phosphotransferase



شکل ۱- هم‌دیفنی قطعه توالی‌یابی شده با ژن *mnp* موردنظر به همراه دیگر *mnp* های موجود در جنس *Pleurotus*

Figure 1-Sequence alignment of the sequenced piece with the desired *mnp* gene and other *mnp*'s in the *Pleurotus* species.

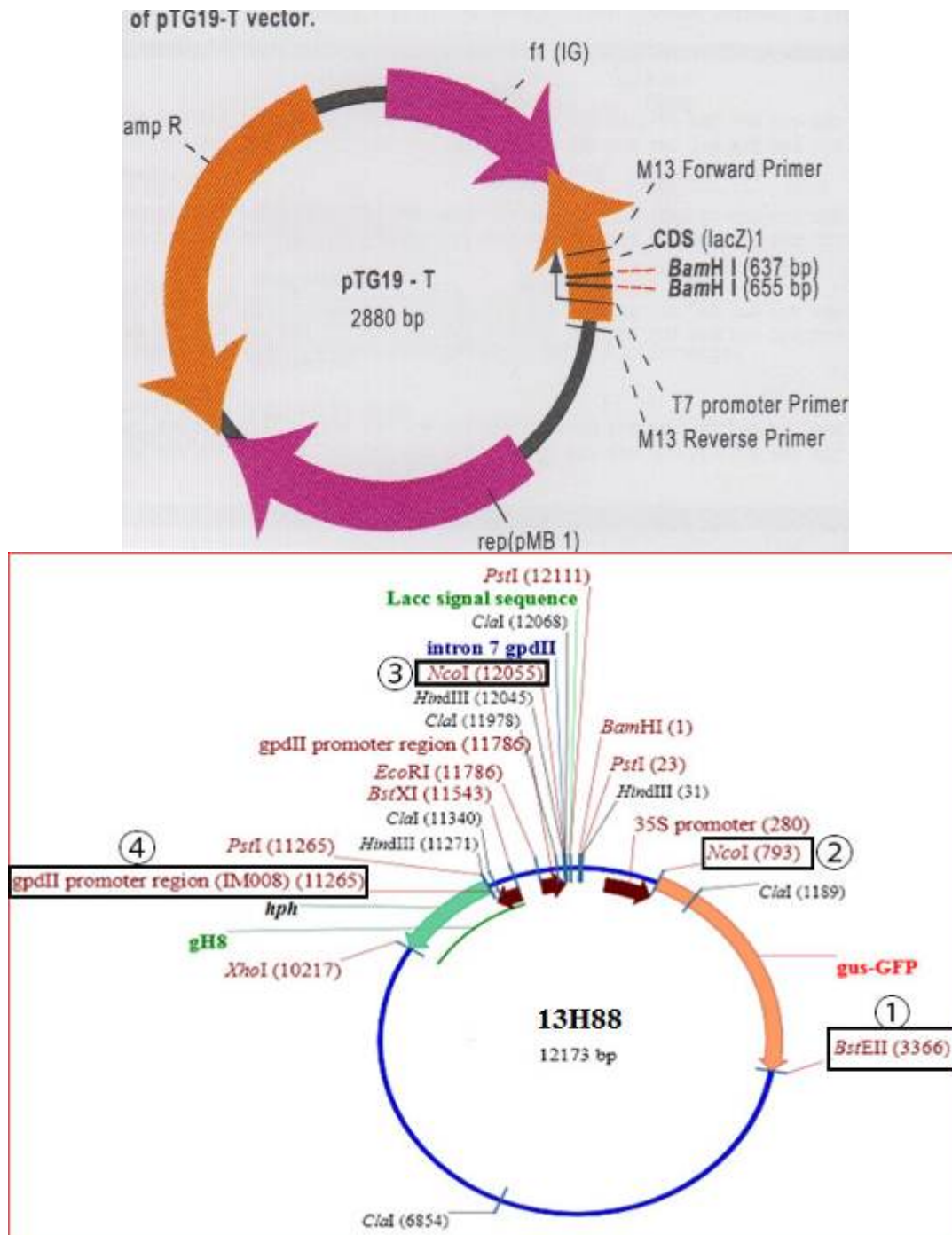
جدول ۱- مشابهت توالی‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار BioEdit 7.2.5

Table 1- Similarities of obtained sequences by the BioEdit 7.2.5.

Seq->	gi 732512	isolated mnp sequence	gi 61224800	gi 35468473	omtA Aspergillus flavus
gi 732512	ID	0.995	0.786	0.653	0.331
isolated mnp sequence	0.995	ID	0.788	0.65	0.334
gi 61224800	0.786	0.788	ID	0.581	0.357
gi 354684738	0.653	0.65	0.581	ID	0.329
omtA Aspergillus flavus	0.331	0.334	0.357	0.329	ID

ژن *mnp* به پلاسمید pTG19-T، پلاسمید نوترکیبی ایجاد شد که pT-FM نامگذاری گردید (شکل ۵). هضم آنزیمی پلاسمید pT-MP با آنزیم *Bam*HI به تنهایی (به دلیل اینکه دقیقاً در دو طرف ژن همسانه شده دو جایگاه برش دارد) و همچنین آنزیم‌های *Nco*I و *Bst*EII به ترتیب سبب ایجاد قطعات ۱۰۸۶ نوکلئوتیدی و حدوداً ۳۰۰۰ نوکلئوتیدی شد که نشان‌دهنده اتصال توالی ژن *mnp* به پلاسمید pTG19-T است (شکل 4B).

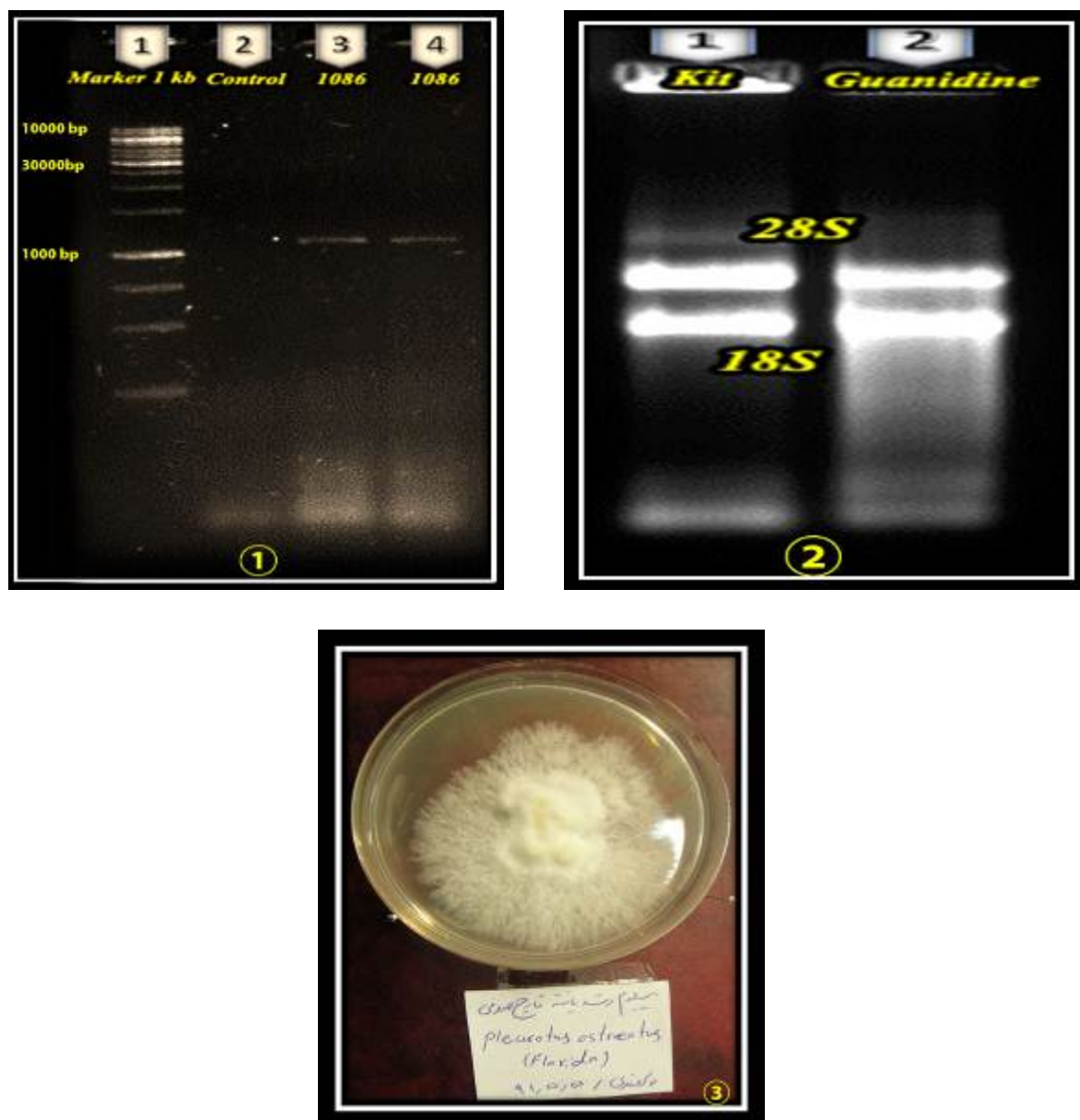
همسانه‌سازی ژن منگنز پراکسیداز (*mnp*) در ناقل pTG19-T و توالی‌یابی پس از انجام ترانسفورماسیون و کشت باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، X-Gal (۲ درصد) و IPTG (۲۰ درصد) و ۱۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ °C، یک کلنی سفید ظاهر گردید (شکل 4A). محصول اتصال حاصل از نسبت ۲ به ۱ (DNA به ناقل) بهترین نتیجه را داشت. از اتصال



شکل ۲- A: نقشه ژنتیکی پلاسمید p13H88 (اشرفی، ۱۳۹۱). ۱ و ۲ و ۳: جایگاه برش آنزیمی توسط آنزیم‌های BstEII و NcoI. ۴: محل پیشبر gpdII. B: نقشه ناقل pTG-19T: دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین جهت بیان در باکتری (Vivantis, TA010).

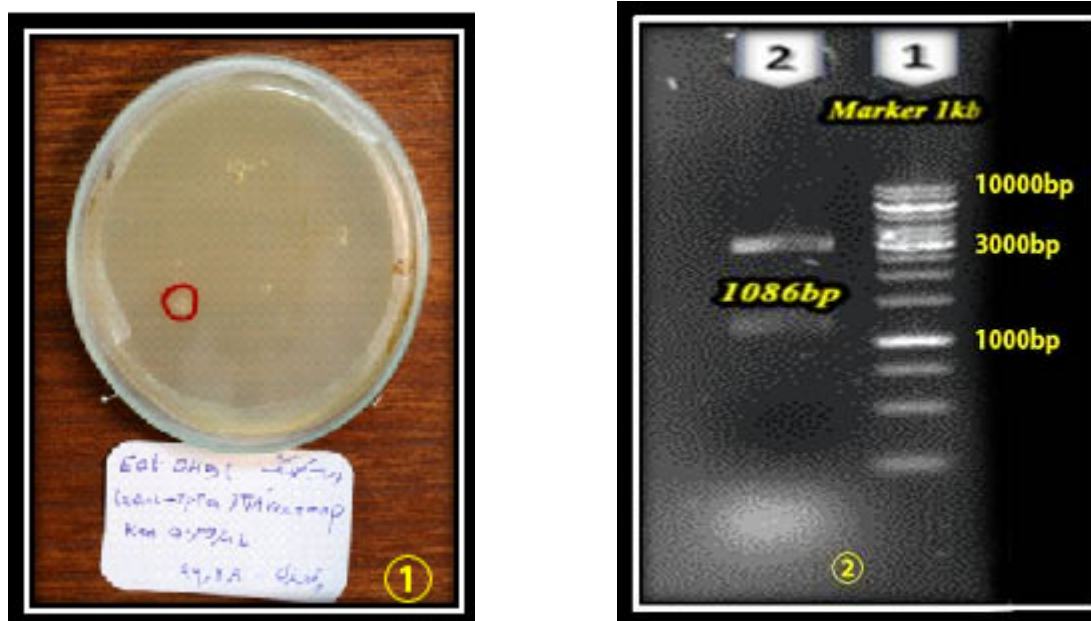
Figure 2-A: The genetic map of the p13H88 plasmid (Aahrafi, 2012). 1,2,3 : Restriction Enzymes by BstEII and NcoI. 4: gpdII promoter site. B: pTG-19T map Vector: contains ampicillin resistance gene for expression in bacteria (Vivantis, TA010).





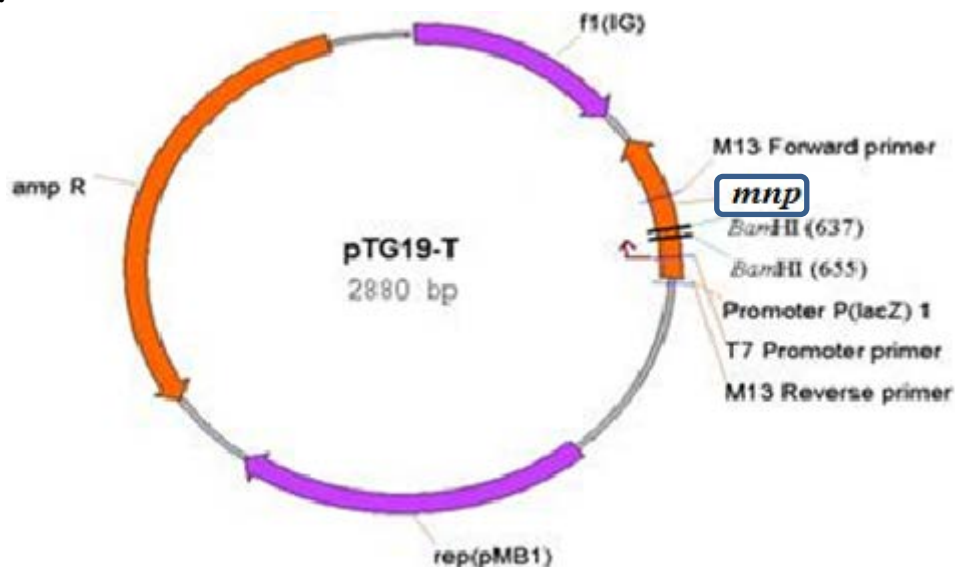
شکل ۳- A: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن *mnp* بر روی ژل آگارز یک درصد، مارکر نشانه 1Kb (Fermentas, SM1163)، B: کل RNA استخراج شده با کیت تجاری RNA-X plus بر روی ژل آگارز یک درصد (بافر TAE، ولتاژ ۹۰، ۲۵ دقیقه)، C: کشت ۸ روزهی میسلیوم قارچ صدفی خوراکی نژاد فلوریدا در محیط کشت جامد PDA

Figure 3- A: Electrophoresis of *mnp* gene polymerase chain reaction on a percent agarose gel product, marker sign 1Kb (Fermentas, SM1163), B: Total RNA was extracted using a commercial kit RNA-X plus one percent agarose gel (buffer TAE, voltage 90, 25 minutes), C: 8-days cultivation of edible oyster florida race mushroom mycelium in solid PDA media culture.



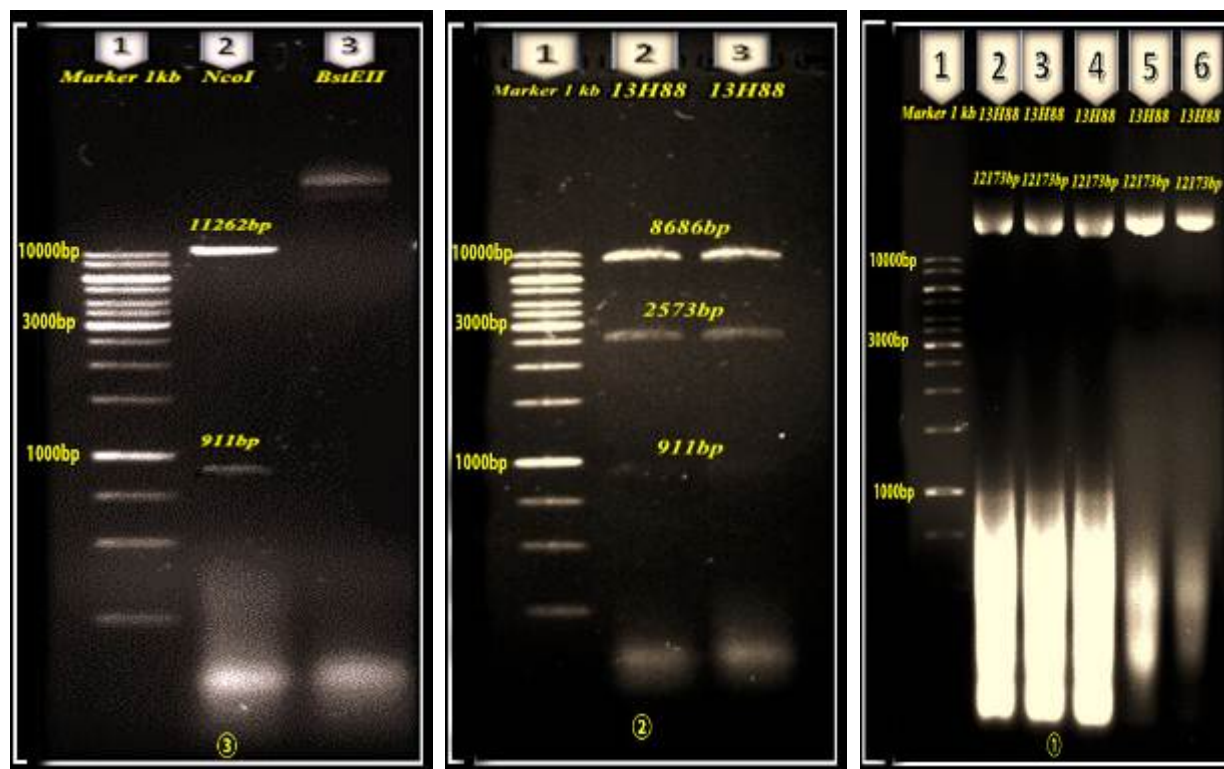
شکل ۴- A: شمایی از پتری حاوی باکتری های *E. coli* تراریخته سویه *DH5α* (ترانسفورماسیون *Tavec+ mnp*), B: محصول واکنش هضم پلاسمید *pTG19-T-MP* با آنزیم *BamHI* بر روی ژل آگارز یک درصد (بافر *TAE*، ولتاژ ۹۵، ۲۰ دقیقه)، ۱. مارکر نشانه *1Kb* (Fermentas, SM1163)، ۲. هضم *TA vec* با آنزیم *BamHI*.

Figure 4- A: the petridish containing transgenic strains *E. coli* bacteria of *DH5α* (transformation *Tavec+ mnp*) schema, B: The plasmid *pTG19-T-MP* digesting reaction with enzymes *BamHI* product on a percent agarose gel (buffer *TAE*, voltage 95, 20 minutes), 1. 1Kb Size marker (Fermentas, SM 1163), 2. *TA vec* digestion with *BamHI* enzymes.



شکل ۵- نمای شماتیک پلاسمید نو ترکیب *PT-FM*.

Figure 5- Schematic view of recombinant *PET-FM* plasmid.



شکل ۶- الکتروفورز محصول استخراج و هضم پلاسمید p13H88 بر روی ژل آگارز یک درصد (بافر TAE، ولتاژ ۹۵، ۶۵ دقیقه). A: نمونه‌های استخراج پلاسمید، چاهک شماره ۱: مارکر نشانه 1Kb (Fermentas, SM1163). چاهک‌های شماره ۲ و ۳ و ۴: نمونه‌های پلاسمیدی استخراج شده به روش ماتینیس و همکاران (1989) و چاهک‌های شماره ۵ و ۶: نمونه‌های پلاسمیدی استخراج شده با کیت استخراج پلاسمید (Vivantis, GF-PL-050). B: مضاعف پلاسمید p13H88 با آنزیم‌های برشی *NcoI* و *BstEII* چاهک شماره ۱: مارکر نشانه 1Kb (Fermentas, SM1163). چاهک‌های شماره ۲ و ۳: نمونه‌های پلاسمیدی هضم شده با آنزیم‌های برشی *NcoI* و *BstEII*. C: چاهک شماره ۱: مارکر نشانه 1Kb (Fermentas, SM1163)، چاهک شماره ۲: هضم منفرد پلاسمید p13H88 با آنزیم برشی *NcoI* چاهک شماره ۳: هضم منفرد پلاسمید p13H88 با آنزیم برشی *BstEII*

Figure 6- Electrophoresis of plasmid p13H88 extraction and digestion product on one percent agarose gel (buffer TAE, voltage 95, 65 minutes). A: Plasmid extraction Instances Cell No. 1: 1Kb size marker (Fermentas, SM1163). Cells 2, 3, 4: extracted plasmid with Matianis et al (1989) method instances. Cell 5 and 6: extracted plasmid with plasmid extraction kit (Vivantis, GF-PL-050) instances. B: Double digesting p13H88 plasmid by *BstEII* and *NcoI* restriction enzymes, Cell No. 1: 1Kb size marker (Fermentas, SM1163). Cells No. 2 and 3 digested plasmid with *NcoI* and *BstEII* restriction enzymes instances. C: Cell 1: 1Kb size marker, (Fermentas, SM 1163), Cell (2): single digest p13H88 plasmid with *NcoI* restriction enzymes. Cell No. 3: single digest p13H88 plasmid with *BstEII* restriction enzymes.

و ۴۸ ساعت پس از آزمایش ترانسفورماسیون در محیط انتخابی رشد کردند. برای انجام واکنش اتصال، مقادیر با نسبت ۱۲:۶ (به ترتیب از DNA به ناقل) بر اساس محاسبه فرمول (Cranenburgh, 2004) استفاده شد. از اتصال ژن *mnp* به پلاسمید p13H88، پلاسمید نوترکیبی بدست آمد که p13H88-FM نامیده شد. شکل 7 نمای شماتیک پلاسمید p13H88-FM و محصول هضم پلاسمید (شکل 8) را نشان می‌دهند.

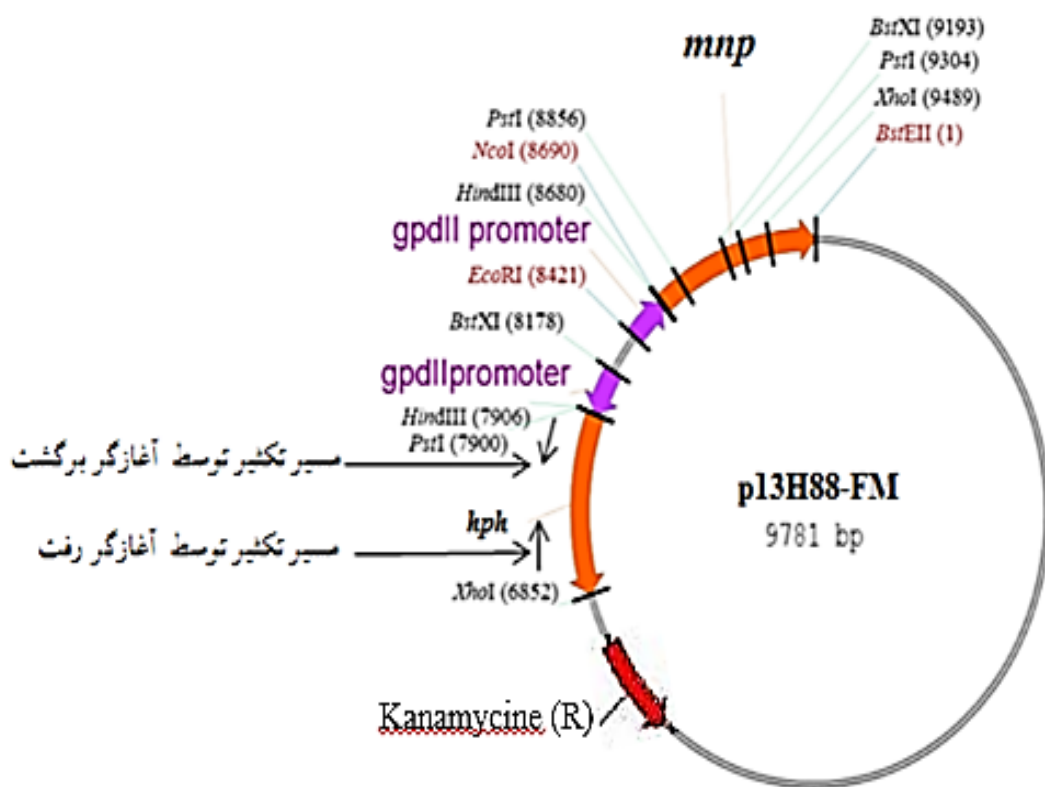
#### نتیجه‌گیری

ایده انجام این پژوهش بر اساس تحقیقات انجام شده در دانشگاه فردوسی مشهد پایه ریزی شد. دستاورد آن، تکثیر ژن *mnp* از قارچ صدفی خوراکی نژاد فلوریدای موجود در واحد زیست‌فناوری قارچ‌های خوراکی جهاد دانشگاهی واحد مشهد، ساخت سازه حاوی ژن *mnp* با نام p13H88-FM و تایید پلاسمید p13H88 (حامل پیشبر *gpdII* و ژن گزینشگر *hph* که یک پلاسمید اختصاصی قارچ دکمه‌ای سفید است) می‌باشد. از طریق انتقال پلاسمید نوترکیب حاصل به قارچ دکمه‌ای خوراکی می‌توان جهت تولید نژاد برتر و افزایش عملکرد بهره گرفت.

تأیید هضم پلاسمید p13H88 با استفاده از آنزیم‌های برشی *BstEII* و *NcoI* پس از استخراج پلاسمید p13H88 با روش (Matianis et al., 1987)، جهت هضم از آنزیم‌های *BstEII* و *NcoI* استفاده شد. آنزیم *BstEII* تنها یک جایگاه برش بر روی پلاسمید فوق دارد اما آنزیم *NcoI* دارای دو جایگاه برشی می‌باشد، انتظار می‌رفت پس از هضم مضاعف، سه باند (۸۶۸۹ bp، ۲۵۷۳ bp، ۹۱۱ bp) مشاهده شود. در ادامه، از باند ۸۶۸۹ جفت‌بازی جهت انجام همسانه‌سازی استفاده شد.

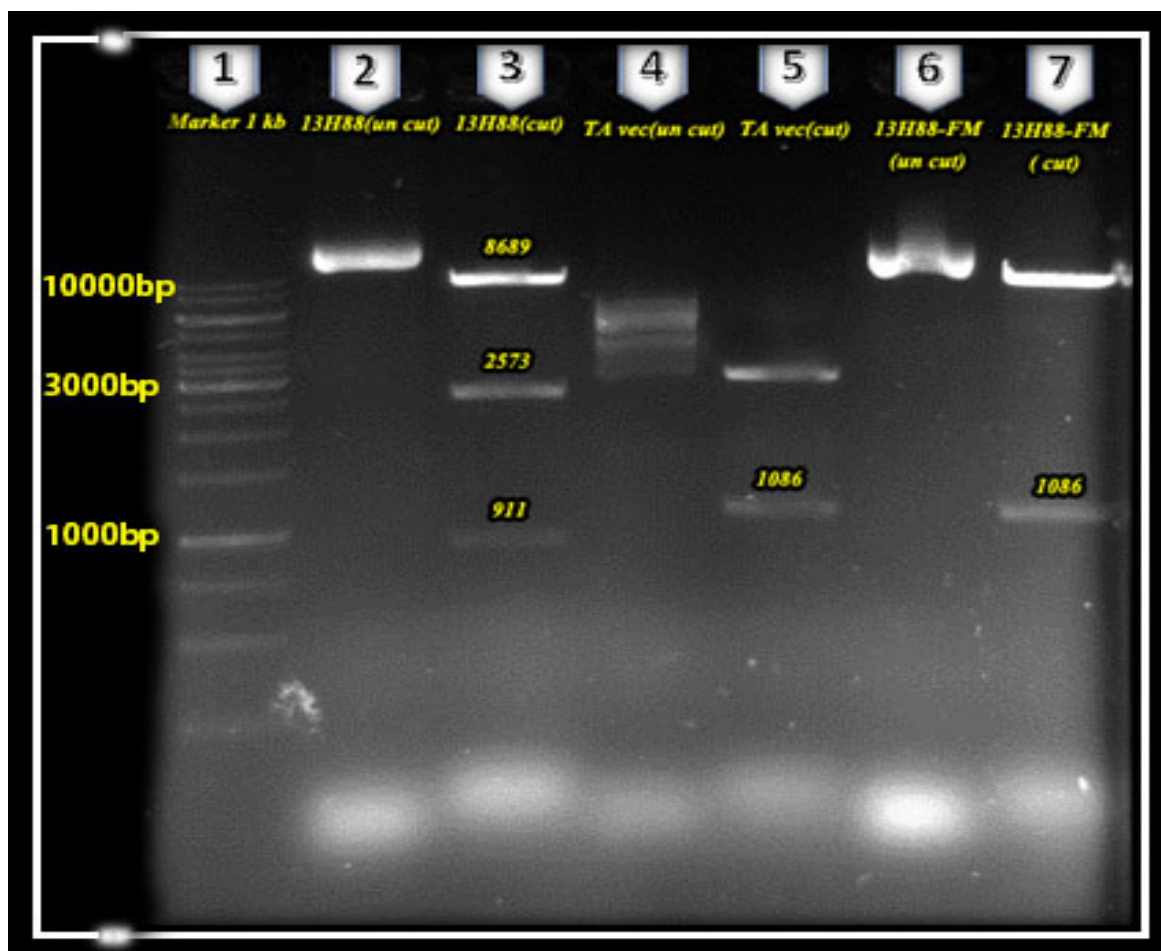
تأیید واکنش اتصال ژن منگنزپراکسیداز (*mnp*) و پلاسمید p13H88 با هضم آنزیمی (با استفاده از آنزیم‌های برشی *NcoI* و *BstEII*)

پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری‌های موردنظر، گزینش کلنی‌های ترانسفورم شده بر روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، Sigma، K1876-1G) انجام شد. کلنی‌های باکتری‌های *E. coli* سویه DH5 $\alpha$  و آگروباکتریوم سویه LBA4404 ترانسفورم شده به ترتیب در طی ۲۴



شکل ۷- نمای شماتیک پلاسمید p13H88-FM ژن *mnp* و ژن گزینشگر *hph* دارای پیشبر *gpdII*، به ترتیب دارای ۱۰۸۶ و ۱۰۴۹ جفت باز دارند.

Figure 7- p13H88-FM Plasmid schematic view. *mnp* genes and *hph* selector gene with *gpdII* promoter, Respectively having 1086 and 1049 base pairs.



شکل ۸- محصولات هضم آنزیمی پلاسمیدهای p13H88-FM و pT-FM بر روی ژل آگارز یک درصد.  
 ۱: مارکر نشانه 1Kb (Fermentase, SM1163)، ۲: پلاسمید p13H88 هضم نشده، ۳: پلاسمید p13H88 هضم شده با آنزیم‌های *BstEII* و *NcoI* (باند پایینی مربوط به ژن *mnp*)، ۴: ناقل TA هضم نشده، ۵: ناقل TA هضم شده با آنزیم‌های *BstEII* و *NcoI* (باند پایینی مربوط به ژن *mnp*)، ۶: پلاسمید نو ترکیب p13H88-FM هضم نشده، ۷: پلاسمید نو ترکیب p13H88-FM هضم شده با آنزیم‌های *BstEII* و *NcoI* (باند پایینی مربوط به ژن *mnp*).

Figure 8-Digesting pT-FM and p13H88-FM plasmids on a percent agarose gel products.  
 1: 1kb Size marker (Fermentase, SM1163), 2: Undigested p13H88 plasmid, 3: P13H88 plasmid digested by *BstEII* and *NcoI* enzymes, 4: TA Vector undigested, 5: TA Vector digested by *BstEII* and *NcoI* enzymes (lower band of the gene *mnp*), 6: Undigested P13H88-FM plasmid, 7: The recombinant digested plasmid by p13H88-FM *BstEII* and *NcoI* enzymes (lower band of the gene *mnp*).

- Bonnen AM, Anton LH, Orth AB (1994). Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology* 60: 960-965.
- Burns C, Leach KM, Elliott MP, Foster GD, Bailey A (2006). Evaluation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using a range of promoters linked to Hygromycin resistance. *Molecular Biotechnology* 32: 129-138.
- Calvo-Bado L, Noble R, Challen M, Dobrovin-Pennington A, Elliot T (2000). Sexuality and genetic identity in the *Agaricus* section *Arvenses*. *Applied Environmental Microbiology* 66: 728-734.
- Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1988). Crosses among homokaryons from commercial and wild collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens*. *Applied Environmental Microbiology* 54: 1643-1648.
- Chen X, Stone M, Schanghauser C, Romaine P (2000). A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. *Applied Environmental Microbiology* 66(10): 4510-4513.
- Cranenburgh RM (2004). An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. *Appl. Microbial Biotechnology* 65: 200-202.
- Godfrey BJ, Mayfield MB, Brown JA, Gold M (1990). Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 93: 119-124.
- Gold MH, Wariishi H, Valli K (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In J.R. Whitaker and P. E. Sonnet (eds) *10-Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Vol. ACS Symp. Ser. No. 389, The American Chemical Society, Washington, DC. 128-140.
- Hatakka A (2001). *Biodegradation of lignin*. Wiley- VCH, Germany.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi. *Appl. 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, Kuwahara M (2001). Homologous expression of recombinant manganese peroxidase genes in ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 55: 566-570.
- Janse BJH, Gaskell J, Akhtar M, Cullen D (1998). Expression of *Phanerochaete chrysosporium* genes encoding lignin peroxidase, manganese peroxidase and Glyoxal oxidase in wood. *Applied Environmental Microbiology* 3536-3538.
- Kamitsuji H, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M (2004). Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiology and Biotechnology*, 65: 287-294.
- Lankinen P (2004). Ligninolytic enzymes of basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocelluloses-containing media. Ph.D. Thesis. Helsinki University, Finland.
- Makela M, Galkin S, Hatakka A, Lundell T (2002). Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme Microb. Technol* 30: 542-549.

- María J. M, Francisco JM, Francisco G, Ángel TM (1996). Purification and Catalytic Properties of Two Manganese Peroxidase Isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237:242-432.
- Matianis T, Fritsch EF, Sambrook (1987). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York. London.
- Mirzaei M, Zolala J, Shalouzad A (2015). Isolation, cloning and molecular characterization of genes encoding single strand specific endonucleases from parsley (*Petroselinum Crispum*l). *Iranian Journal of Agricultural Biotechnology* 7:201-215.
- Moloy S (2004). Sugar transport and water relations of *Agaricus bisporus*. Ph.D. Thesis, Cranfield University.
- Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K, Sato T (2003). Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149:2455-2462.
- Raufi A, Tohidfar M, Soluki M, Mohsenpour M (2011). Isolation and cloning two gene PRI family and construction of treble plasmids containing 3 groups of genes for producing transformed plants resistant to fungal diseasea. *Journal Of Agricultural Biotechnology* 3:27-46.
- Robin A, Jan F, Luis G, Lugones A (2010.) Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Natur Biotechnology* 28: 957–963.
- Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sovan S, Angel TM, María JM (1997). Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1339: 23-30.
- Tagger S, Perissol C, Gil G, Vogt G, Le Petit J (1998). Phenoloxidases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus* isolated from an evergreen oak litter (*Quercusilex* L.). *Enzyme and Microbial Technology* 23: 372-379.
-



## Isolation and cloning of manganese peroxidase (*mnp*) gene from oyster mushroom

Parvandi M.\*<sup>1</sup>, Farsi M.<sup>2</sup>, Mirshamsi A.<sup>3</sup>, Ashrafi M<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

<sup>2</sup> Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

<sup>3</sup> Agriculture Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

<sup>4</sup> PhD Student in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zanzan University, Zanzan, Iran.

### Abstract

Different enzymes in oyster mushroom (*pleurotus oatreatus*), can degradate the lignin compounds from the beginning of mycelium growth up to the end of fruiting period in the environment of compost and straw. Wood, plant residue and most of plant wastes in the nature are called lignocelluloses compounds. Lignocelluloses is mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin. Magnesium peroxides enzyme (EC:1:11:1:13) is one the most common peroxides destroying lignin which produced by most wood decomposing mushrooms as well as many compost decomposing mushrooms. In order to cloning of *mnp* gene, RNA was extracted from oyster edible mushroom (*P.ostreatus var.florida*) and cDNA was synthesized and then the primers was designed based on the sequence of the *mnp* gene using Primer Premier (V.5.0) software and was amplified by PCR. First, the gene was inserted to pTG-19T plasmid and was confirmed using sequencing. In continue, *mnp* gene was cloned in to the p13H88 plasmid. Then it was transferred to *Ecoli* (DH5a) using ice-melt method and its presence was confirmed by enzymatic digestion. The results showed that *mnp* gene is cloned in p13H88 plasmid and the recombinant plasmid was named as p13H88-FM.

**Key words:** Lignin degradation, Lignocellulose, vector, *mnp*.

---

\* Corresponding Author: Parvandi M.

Tel: 09183773670

Email: mozhgan.parvandi@gmail.com

