Journal of Police Medicine

Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 175-182

Original Article

Cloning of Polyhydroxybutyrate operon and Phage Φx174 E Gene in Separate Plasmids and Analysis of E Gene Function in Facilitating Polyhydroxybutyrate Production in E.coli

Received: 14 July 2014 **Revised:** 3 December 2014 **Accepted:** 10 December 2014

Hadi Shirzad[1*]
Mojtaba Saadati[2]
Vahid Kholghi Oskooei[3]

[1]Assistant Professor, Technology Management Department, Police Sciences and Social Studies Institute, Tehran, Iran.

[2]Professor, Department of Biology, Emam Hossein University, Tehran, Iran.

[3]MSc, Research and Studies Organization of Police, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background: Polyhydroxybutyrate is a biodegradable plastic that has widespread application in various industries and in the field of medical equipment production. In E.coli, the most cost of Polyhydroxybutyrate production (PHB) is related to its extraction and purification processes. E gene of Phage Φx174 with conformation of membrane tunnel is used for lysing the hosted bacteria. This study was conducted to investigate the function of E gene in conformation of membrane tunnel and release of produced PHB in E.coli.

Materials and Methods: In this study, after amplification with polymerase chain reaction (PCR), PHB operon was cloned by pUC18 while its expression controlled by operon promoter. E gene was amplified with PCR and cloned by pMR103 plasmid while it's expression controlled by T7 promoter. Lysis process and conformation of membrane tunnel were evaluated by electronic microscope. Analysis of produced PHB was performed by gas chromatography and Sudan staining.

Results: With activation of E gene and lysis of bacteria, optical density of specimen decreased. In the analysis of bacterial debris which achieved from E.coli medium by electronic microscope, we observed membrane pores in lysed bacteria. The results of gas chromatography and Sudan staining showed that PHB granules have been released to medium by conformation of membrane tunnel.

Conclusion: Lysis E gene can be used for decreasing the cost and facilitating the extraction of PHB in E.coli that can be applied for manufacture of disposable medical and operating room equipment.

Keywords: bioplastic, polyhydroxybutyrate, E gene, E. coli

[*]**Corresponding Author:**
Hadi Shirzad
Tel: (+98)2181823741

e-mail: hadi_shirzad@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

پاییز ۱۳۹۳- دوره ۳ - شماره ۳- صفحات ۱۸۲-۱۷۵

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

کلونینگ اپران پلی‌هیدروکسی بوتیرات و ژن E باکتریوفاژ در پلاسمیدهای جداگانه و بررسی عملکرد ژن E در تسهیل تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات در اشریشیا کولی

تاریخ دریافت: ۲۳ تیر ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۱۲ آذر ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۹ آذر ۱۳۹۳

چکیده

مقدمه: بیوپلاستیک پلی‌هیدروکسی بوتیرات کاربرد گسترده در صنایع مختلف و ساخت تجهیزات پزشکی دارد. هزینه‌های استخراج و تخلیص پلی‌هیدروکسی بوتیرات در اشریشیا کولی، بخش اعظم هزینه‌های تولید را به خود اختصاص داده است. ژن E باکتریوفاژ Φx174 با ایجاد تونل غشایی برای لیز باکتری میزبان استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه، بررسی عملکرد ژن E در ایجاد تونل غشایی و رهاسازی پلی هیدروکسی بوتیرات تولیدشده در اشریشیا کولی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اپران پلی هیدروکسی بوتیرات بعد تکثیر اولیه با واکنش زنجیره پلی‌مراز توسط پلاسمید pUC18 کلون و تحت کنترل پروموتور اپران بیان شد. ژن E نیز پس از تکثیر با واکنش زنجیره پلی‌مراز توسط پلاسمید pMR103 کلون و تحت کنترل پروموتور T7 بیان گردید. برای بررسی تشکیل تونل غشایی در باکتری میزبان از میکروسکوپ الکترونی استفاده شد. ارزیابی پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدی با کروماتوگرافی گازی و رنگ‌آمیزی سودان سیاه انجام شد.

یافته‌ها: با فعال شدن ژن E و لیز باکتری، جذب نوری نمونه کاهش یافت. در بررسی بقایای باکتریایی به‌دست‌آمده از محیط کشت باکتری نوترکیب با میکروسکوپ الکترونی، منافذ غشایی در باکتری‌های لیز شده دیده شد. نتایج رنگ‌آمیزی سودان سیاه و کروماتوگرافی گازی نشان داد که گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات در اثر ایجاد تونل‌های غشایی در محیط کشت آزاد شده است.

نتیجه‌گیری: ژن لیز E می‌تواند برای کاهش هزینه و تسهیل استحصال پلی‌هیدروکسی بوتیرات در باکتری دراشریشیا کولی به‌کار رود که می‌تواند در ساخت تجهیزات یکبار مصرف پزشکی و اتاق عمل مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: بیوپلاستیک، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، ژن E، باکتری E.coli

هادی شیرزاد[1*]
مجتبی سعادتی[2]
وحید خلقی اسکوئی[3]

[1]استادیار، گروه مدیریت فن‌آوری، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران.
[2]استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
[3]کارشناسی ارشد، سازمان تحقیقات و مطالعات ناجا، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول:
هادی شیرزاد
تلفن: ۲۱۸۱۸۲۳۷۴۱(۹۸+)
پست الکترونیک:
hadi_shirzad@yahoo.com

مقدمه

بیوپلاستیک‌ها که به نام پلاستیک‌های آلی نیز نامیده می شوند نوعی پلاستیک هستند که از فرآورده‌های گیاهی نظیر روغن های گیاهی، نشاسته ذرت، نشاسته نخودفرنگی و یا توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند [۲ و ۱] و قابل‌تجزیه زیستی بوده که کاربرد گسترده در ساخت تجهیزات الکترونیکی و پزشکی دارند [۵-۳]. پلی هیدروکسی بوتیرات[1] پلی‌استری با نقطه ذوب ۱۳۰درجه بوده و کاملاً قابل‌تجزیه زیستی می‌باشد [۷و ۶]. این پلیمر محصول جذب کربن است و توسط میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان ذخیره در زمانی که سایر منابع انرژی در دسترس نیستند، به کار می‌رود [۸]. ژن‌های بیوسنتزی پلی هیدروکسی بوتیرات باکتری رالستونیا یوتروفا که در سال ۱۹۸۸ کلون گردیده‌اند [۹]، در قالب یک اپران در

[1]: Polyhydroxybutyrate

Archive of SID
www.SID.ir

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 175-182

باکتری اشریشیا کولی جهت سنتز پلی هیدروکسی بوتیرات استفاده می‌شوند [۱۲-۱۰].هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی و استحصال، بخش اعظم هزینه‌های تولید را در فرآیندهای زیستی به خود اختصاص می‌دهند. استفاده از ترکیبات شیمیایی و آنزیم‌ها جهت لیز باکتری اولاً هزینه بالایی را به فرآیند تحمیل می‌کند و ثانیاً خود به مراحل تخلیص می‌افزاید. روش‌های فیزیکی نیز مشکلات مربوط به دما و نیز بر هم زدن ساختار گرانول‌های حاوی پلیمر را به همراه دارد [۱۴ و ۱۳]. باکتریوفاژ Φx174 دارای یک ژن لیز به نام E است [۱۵] که بیان این ژن چه از ژنوم باکتریوفاژ یا از پلاسمید، برای لیز کردن اشریشیا کولی لازم و کافی است [۱۶]. محصول ژن E یک پروتئین تراغشایی با ۹۱ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۱۰۵۰۰ دالتون است [۱۸و۱۷]. این پروتئین، ساختمانی الیگومری تشکیل می‌دهد که به درون غشاهای داخلی و خارجی نفوذ می‌کند و تونلی را تشکیل می‌دهد [۱۸]. در مورد اشریشیا کولی این تونل بین ۴۰ تا ۲۰۰ نانومتر قطر دارد. پس از باز شدن این تونل، محتوای سلولی‌باکتری از آن خارج می‌شود، در نتیجه فضای خالی باقی می‌ماند که عاری از اسیدهای نوکلئیک، ریبوزوم‌ها یا دیگر ترکیبات می‌باشد [۱۷]. اپران پلی هیدروکسی بوتیرات و ژن E به صورت همزمان در E.coli کلون و القاء لیز باکتری توسط ژن E و تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات نشان داده شده بود [۱۹]. در مقاله حاضر عملکرد ژن E در ایجاد تونل غشایی و لیز باکتری توسط میکروسکوپ الکترونی و ارزیابی پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدشده مورد بحث قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

کلون کردن ژن لیز E و اپران پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری اشریشیا کولی

به‌منظور کلون کردن اپران پلی هیدروکسی بوتیرات، نخست با استفاده از پرایمرهای دارای سایت برش، آنزیم EcoRI با تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز[1] (PCR) تکثیر شد. در ادامه بعد از برش محصول PCR و پلاسمید pUC18 با آنزیم EcoRI، به کمک DNA لیگاز T4 اپران پلی هیدروکسی بوتیرات در داخل pUC18 قرار داده شد [۱۹]. قطعه تکثیرشده در بردارنده هر سه ژن اپران PHB و نیز ناحیه پروموتری مربوطه بود. برای کلون کردن ژن E به‌طور مشابه ناحیه موردنظر با استفاده از پرایمرهایی که دارای یک جایگاه برش NcoI در پایانه ´۵ و یک جایگاه برش با آنزیم BamHIدر پایانه ´۳ بودند، تکثیر و با برش محصول PCR و پلاسمید pMR103 توسط آنزیم‌های BamHI و NcoI، ژن E در داخل pMR103 قرار داده شد [۱۹]. ژن E در پلاسمید pMR103 تحت کنترل پروموتور T7 بوده که با اضافه شدن ایزوپروپیل بتا-دی-۱- تیوگالاکتوپیرانوزید[2] (IPTG) و تحریک تولید T7 RNA polymerase، فعال می‌گردد. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل، مطابق روش کلرید کلسیم ذکرشده در کتاب کلون کردن مولکولی [۲۰] به داخل باکتری حاوی اپران پلی هیدروکسی بوتیرات منتقل شدند. جهت انتخاب کلونی حاوی DNA موردنظر مجدداً از PCR کلونی‌های تشکیل‌شده استفاده گردید.

تحریک بیان ژن لیز E

یک تک کلونی از باکتری ترانسفورم حاوی ژن لیز E در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب رشد داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از آن در ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت دارای کانامیسین رشد داده شد تا به جذب نوری[3] (OD) ۰/۴ رسید. در ادامه ۳ میلی‌لیتر از آن به عنوان نمونه پیش از القا برداشته و به مابقی با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار IPTG اضافه شد. در نهایت به مدت ۲ ساعت در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه‌ای از کشت باکتری، نمونه‌برداری انجام گرفت و جذب نوری ۶۰۰ nm آن‌ها تعیین گردید.

بررسی فرآیند لیز باکتری با میکروسکوپ الکترونی نگاره[4] (SEM)

از بقایای باکتریایی موجود در رسوب بدست آمده در محیط کشت، باکتری نوترکیب پس از القا توسط IPTG برای بررسی تشکیل تونل غشایی و احیاناً گرانول‌های پلی هیدروکسی بوتیرات باقی‌مانده در باکتری‌ها استفاده شد. ابتدا با استفاده از سانتریفوژ رسوب حاصل از مرحله قبل از محیط کشت جدا شد. سپس این رسوب به روش رقت متوالی الکل آبگیری شد و در الکل مطلق سوسپانسیون گردید. در ادامه جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره به دانشکده داروسازی دانشگاه تهران ارسال گردید.

بررسی کیفی پلی هیدروکسی بوتیرات در سلول با استفاده از رنگ‌آمیزی سودان سیاه

1: Polymerase Chain Reaction, 2: Isopropylβ-D-1-thiogalactopyranodide, 3: Optical Density, 4: Scanning Electron Microscope

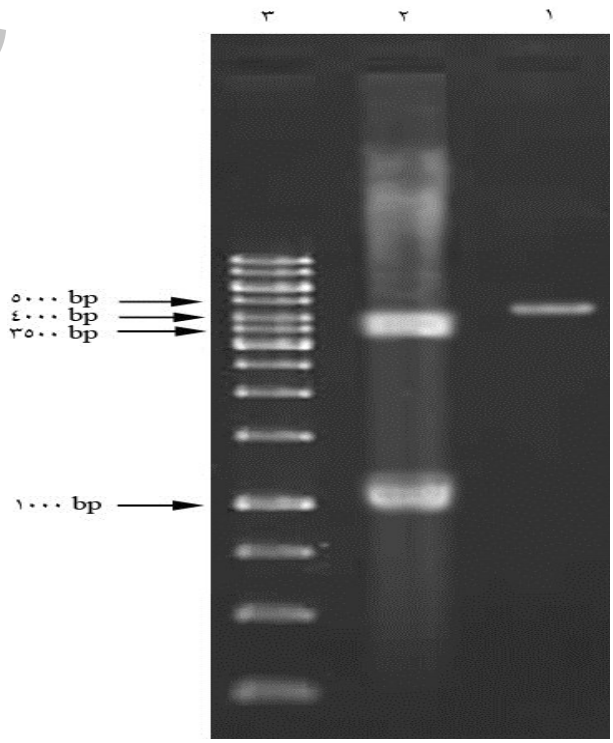
www.SID.ir
Archive of SID

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۳- صفحات ۱۸۲-۱۷۵

ابتدا گسترشی از باکتری موردنظر بعد از کشت تهیه شد. در ادامه به مدت ده دقیقه سودان سیاه به گسترش افزوده شد، با آب مورد شستشو قرار گرفت و سپس نمونه با زایلن شستشو شد. در مرحله بعدی نمونه با سافرانین ۰/۵درصد به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه شستشو گردید و پس از آن با آب شسته شد. در نهایت نمونه رنگ آمیزی شده بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر مشاهده شد.

کرموتوگرافی گازی

جهت تعیین ماهیت گرانول‌های مشاهده‌شده از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. در این روش، ابتدا ml ۵ از توده زیستی را جدا کرده و پس از انحلال در کلروفرم و هیدرولیز بیوپلیمر در محیط اسیدی، پلی‌هیدروکسی بوتیرات با استفاده از متانول به متیل استر بوتانوئیک اسید تبدیل‌شده و پس از جداسازی، فاز آلی حاوی متیل استر به دستگاه GC[1] منتقل می‌شود. نتایج آن به صورت منحنی مشخص می‌گردد. در این روش، محاسبات بر مبنای نسبت سطح زیر پیک متیل‌استر به سطح زیر پیک استاندارد داخلی (اسید بنزوئیک) می‌باشد.



شکل ۱: بررسی الگویل هضم آنزیمی اپران PHB تکثیر شده. ستون ۱ محصول PCR، ستون ۲ محصول هضم آنزیمی اپران تکثیر شده و ستون ۳ اندازه نمای DNA را نشان می‌دهد.

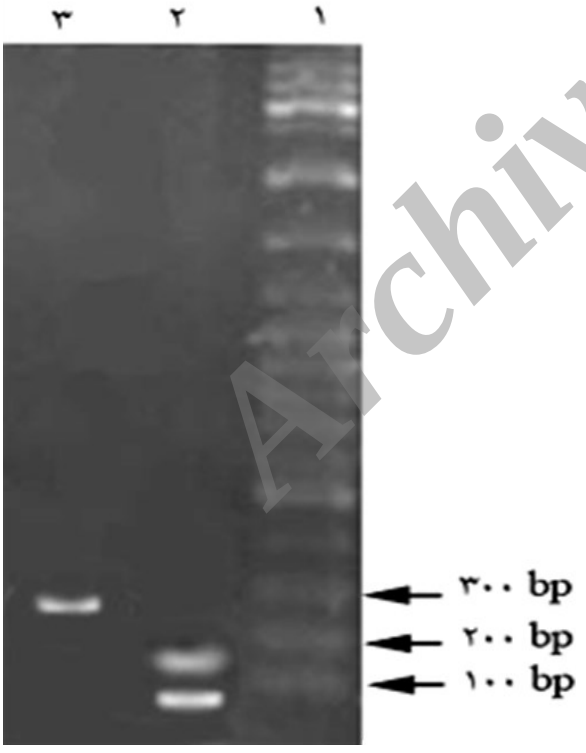
یافته‌ها

کلون کردن ژن لیز E و اپران پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری اشریشیا کولی

با تکثیر اپران پلی هیدروکسی بوتیرات با تکنیک PCR، قطعه‌ای به طول bp ۴۶۷۸ تشکیل شد. به منظور تأیید منطقه تکثیرشده، محصول PCR با آنزیم NdeI برش داده شد که دو قطعه ۱۰۷۱ نوکلئوتید و ۳۶۰۷ نوکلئوتید ایجاد کرد (شکل ۱). با تکنیک PCR ژن E تکثیر شد و یک قطعه bp ۲۶۷ ایجاد نمود. جهت اطمینان از تکثیر ناحیه موردنظر از آنزیم HindII استفاده گردید که دو قطعه با اندازه‌های ۸۹ و ۱۸۷ جفت بازی ایجاد کرد (شکل ۲). پس از انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن لیز E و پلاسمید حاوی اپران پلی هیدروکسی بوتیرات به باکتری اشریشیا کولی با تکنیک PCR، کلونی‌های ترانسفورم شده با پلاسمیدهای نوترکیب شناسایی شد.

فعال‌سازی ژن لیز E با القا توسط IPTG

پس از تأیید انتقال پلاسمید نوترکیب دارای ژن E به باکتری، ژن E

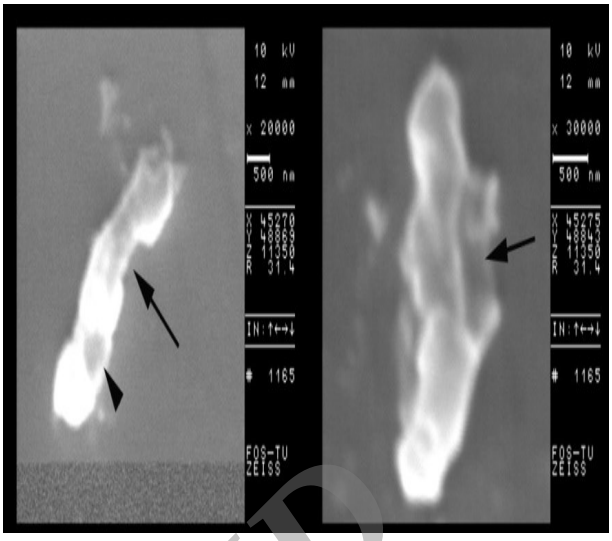


شکل ۲: تأیید قطعه‌ی ژنی E تکثیر شده توسط هضم آنزیمی. ستون ۱ مربوط است به اندازه نمای DNA، (Laddeer 1kb, Fermentas, Russia) ستون ۲ محصول هضم آنزیمی و ستون ۳ محصول PCR می‌باشد.

[1]: Gas Chromatography

Archive of SID
www.SID.ir

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 175-182



شکل۳: تصویر SEM از باکتری‌های لیز شده. پیکان‌ها تونل غشایی ایجاد شده را نشان می‌دهند. نوک پیکان شکل سمت چپ احتمالاً مربوط است به یک گرانول PHB باقی مانده در باکتری.

با القا توسط IPTG فعال شد. سپس جذب نوری نمونه اندازه‌گیری گردید. جذب نوری نمونه کاهش‌یافته بود که نشان از لیز باکتری‌ها در نتیجه فعال شدن ژن لیز E دارد.

تشکیل تونل‌ها در غشاء باکتری نوترکیب توسط ژن لیز E

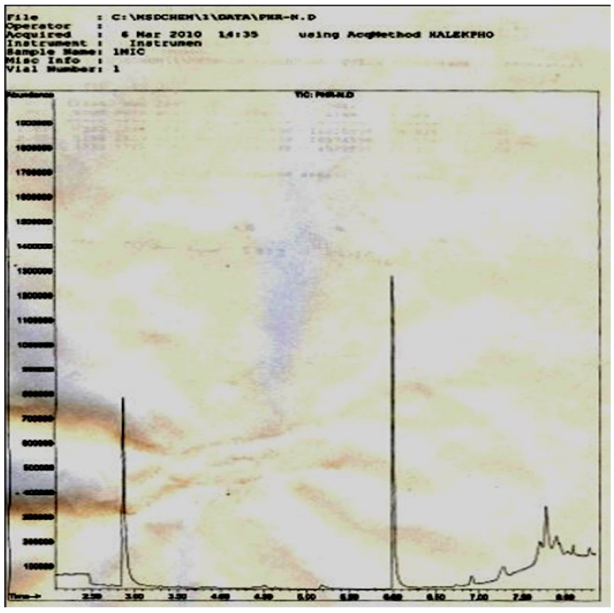
در بررسی بقایای باکتریایی موجود در رسوب بدست آمده در محیط کشت باکتری نوترکیب پس از القا توسط IPTG با میکروسکوپ الکترونی، منافذ ایجادشده در غشای باکتری‌های لیزشده به وضوح به دیده می‌شد. همچنین گرانول پلی هیدروکسی بوتیرات که در داخل باکتری باقی‌مانده است، مشاهده شد (شکل ۳).

شناسایی گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدشده

در رنگ‌آمیزی سودان سیاه وجود گرانول‌های سیاه‌رنگ مشخص گردید. جهت تعیین ماهیت این گرانول‌ها از کروماتوگرافی گازی استفاده شد. با مقایسه کروماتوگرام به‌دست‌آمده برای نمونه مجهول تزریق‌شده به دستگاه کروماتوگرافی با کروماتوگرام مربوط به نمونه استاندارد ماهیت گرانول‌های مشاهده‌شده، تأیید شد (شکل ۴). با توجه به سطح زیر نمودار، مقدار پلیمر در حدود ۳ هزارم گرم در هر میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیوپلاستیک‌ها با توجه به قابلیت تجزیه زیستی، به‌عنوان جایگزین



شکل۴: نتایج مربوط به کروماتوگرافی گازی محصول PHB. قله‌ی زمان ۳ دقیقه مربوط است به مونومرهای حاصل از PHB، و قله‌ی زمان ۶ دقیقه مربوط است به اسید بنزوئیک که به عنوان کنترل داخلی به کار می‌رود.

مناسب پلاستیک‌ها موردتوجه قرار گرفتند اما هزینه های بالای فرآیند تولید مانع از جایگزینی این دسته از پلیمرها به جای پلاستیک‌های صنعتی شده است. این امر حتی با استفاده از سوبستراهای ارزان‌قیمت و میزبان‌های سریع رشدی نظیر اشریشیا کولی نیز هنوز مرتفع نشده است [۲۳-۲۱]. یکی از علل بالا بودن هزینه‌های تولید، هزینه‌های مربوط به استحصال و خالص سازی است [۲۴].

روش‌های گوناگونی جهت آزادسازی پلی هیدروکسی بوتیرات وجود دارد، اما این روش‌ها کیفیت پلیمر را پایین می‌آورند و خود هزینه ای به فرآیند می‌افزایند و در پاره‌ای موارد خود آلودگی را اضافه می‌کنند که بایستی مورد پالایش و حذف قرار گیرند و حتی بدتر از آن باعث آلودگی زیست‌محیطی گردند [۲۶-۲۴].

سیستم هضم با واسطه ژن E از باکتریوفاژ Phage Φx174 که با ایجاد تونل در غشای باکتری‌های گرم منفی به‌واسطه اختلاف فشار اسمزی منجر به تخلیه محتوای سلولی به بیرون و لیز باکتری می‌شود [۲۷]، به‌عنوان ابزار مناسبی برای آزادسازی فرآورده باکتری

Archive of SID
www.SID.ir

مجله طب انتظامی
پاییز ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۳- صفحات ۱۸۲-۱۷۵

نوترکیب در بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه مشابه مشخص شد که گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات از طریق تونل غشایی ایجادشده توسط ژن E خارج شده و اجزای پوششی باکتری را می‌توان با سانتریفوژ گرادیانت چگالی جدا کرد [۱۳].

بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی بدست آمده از بقایای باکتریایی پس از القا با IPTG نشان داد که با فعال شدن ژن E، تونل‌های غشایی در سطح باکتری نوترکیب تشکیل شده است. بررسی‌های انجام‌شده با روش رنگ آمیزی سودان سیاه و کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدشده توسط باکتری نوترکیب به‌صورت گرانول در محیط کشت آزادشده است. با توجه به اینکه لیز باکتری با ژن Eروش بسیار ملایمی است، گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات تخریب نمی‌شود و غشای سلولی در حین تخلیص پلی‌هیدروکسی بوتیرات حذف می‌شود [۲۸]. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که استفاده ژن لیز E می‌تواند در کاهش هزینه و تسهیل استحصال پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولیدشده توسط باکتری نوترکیب بکار گرفته شود که به واسطه این امر می‌تواند در ساخت تجهیزات یکبار مصرف پزشکی و اتاق عمل مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1. Chua H, Yu PH, Ma CK. Accumulation of biopolymers in activated sludge biomass. Appl Biochem Biotech 1999; 77-79: 389-99.
2. Kim HM, Ryu KE, Bae K, Rhee YH. Purification and characterization of extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from Pseudomonas sp. RY-1. J Biosci Bioeng 2000; 89: 196-8.
3. Peelman N, Ragaert P, De Meulenaer B, Adons D, Peeters R, Cardon L, et al. Application of bioplastics for food packaging. Trends Food Sci Tech 2013; 32: 128-41.
4. Wu Q, Wang Y, Chen GQ. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2009; 37: 1-12.
5. Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 2007; 82: 233-47.
6. Qi Q, Rehm BH. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in Caulobacter crescentus: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. Microbiology 2001; 147: 3353-8.
7. Zhang S, Yasuo T, Lenz RW, Goodwin S. Kinetic and mechanistic characterization of the polyhydroxybutyrate synthase from Ralstonia eutropha. Biomacromolecules 2000; 1: 244-51.
8. Madison LL, Huisman GW. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63: 21-53.
9. Schubert P, Krüger N, Steinbüchel A. Molecular analysis of the Alcaligenes eutrophus poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of poly (3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. J bacteriol 1991; 173: 168-75.
10. Gillespie TE, Flatt AE, Youm Y, Sprague BL. Biomechanical evaluation of metacarpophalangeal joint prosthesis designs. J Hand Surg Am 1979; 4: 508-21.
11. Schubert P, Steinbuchel A, Schlegel HG. Cloning of the Alcaligenes eutrophus genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in Escherichia coli. J Bacteriol 1988; 170: 5837-47.
12. Slater SC, Voige W, Dennis D. Cloning and expression in Escherichia coli of the Alcaligenes eutrophus H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J bacteriol 1988; 170: 4431-6.
13. Resch S, Gruber K, Wanner G, Slater S, Dennis D, Lubitz W. Aqueous release and purification of poly (beta-hydroxybutyrate) from Escherichia coli. J biotechnol 1998; 65: 173-82.
14. Hori K, Kaneko M, Tanji Y, Xing XH, Unno H. Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. Appl microbiol biotechnol 2002; 59: 211-6.
15. Hutchison CA 3rd, Sinsheimer RL. The process of infection with bacteriophage phi-X174. X. Mutations in a phi-X Lysis gene. J Mol Biol 1966; 18: 429–47.
16. Henrich B, Lubitz W, Plapp R. Lysis of Escherichia coli by induction of cloned phi X174 genes. Mol Gen Genet 1982; 185: 493-7.
17. Hoffelner H, Haas R. Recombinant bacterial ghosts: versatile targeting vehicles and promising vaccine candidates. Int J Med Microbiol 2004; 294: 303-11.
18. Altman E, Young K, Garrett J, Altman R, Young R. Subcellular localization of lethal lysis proteins of bacteriophages lambda and phiX174. J virol 1985; 53: 1008-11.
19. Shirzad H, Saadati M, Sistani RN. Inverted metabolic engineering of E.coli toproduce PHB and simplifying of lysis process,using gene E from phage PhiX174. JAUMS 2010; 7: 248-55. (Persian)
20. Sambrook J, Russell DW, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York 2001; 10.

Archive of SID
www.SID.ir

Journal of Police Medicine
Fall 2014; Vol. 3, No. 3: 175-182

21.Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. Biotechnol Adv 2007; 25: 148-75.
22.Choi J-i, Lee SY, Han K. Cloning of the Alcaligenes latus polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in Escherichia coli. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 4897-903.
23.Hori K, Kaneko M, Tanji Y, Xing XH, Unno H. Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. Appl microbiol biotechnol 2002; 59: 211-6.
24.Hejazi P, Vasheghani-Farahani E, Yamini Y. Supercritical fluid disruption of Ralstonia eutropha for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery. Biotechnol Prog 2003; 19: 1519-23.
25.Chen Y, Chen J, Yu C, Du G, Lun S. Recovery of poly-3-hydroxybutyrate from Alcaligenes eutrophus by surfactant–chelate aqueous system. Process Biochem 1999; 34: 153-7.
26.Ojumu T, Yu J, Solomon B. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. Afr J Biotechnol 2004; 3: 18-24.
27.Young KD, Young R. Lytic action of cloned phi X174 gene E. J virol 1982; 44: 993-1002.
28.Schroll G, Resch S, Gruber K, Wanner G, Lubitz W. Heterologous phi X174 gene E-expression in Ralstonia eutropha: E-mediated lysis is not restricted to gamma-subclass of proteobacteria. J biotechnol 1998; 66: 211-7.

Archive of SID

www.SID.ir