مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۵، شماره ۳ و٤، بهار و تابستان ۱۳۸۳

شناسایی و کلونینگ اپرون سولفورزدایی SOX (dszA, B) در باکتری بومی رودوکوکوس FMF

سودابه اکبرزاده‌شعرباف (M.Sc)، جمشید راهب* (Ph.D)

پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

سابقه و هدف: باکتری بومی رودوکوکوس FMF از میان چندین سویه که از خاک مناطق مختلف ایران جدا شده بود، انتخاب گردید. مطالعات اولیه نشان داد که این باکتری دارای توانایی مصرف دی‌بنزوتیوفن به عنوان منبع گوگرد می‌باشد. از آن‌جا که فعالیت حذف گوگرد طی یک مسیر حفظ شده صورت می‌پذیرد، طرح حاضر با هدف شناسایی، کلونینگ و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن‌های گوگردزدا در این باکتری طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا اپرون گوگردزدایی از داخل باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 جداسازی شد و به‌عنوان پروب در شناسایی ژن‌های مسیر سولفورزدایی 4S با استفاده از تکنیک سادرن بلاتینگ به‌کار رفت. بعد از تأیید حضور اپرون گوگردزدایی در باکتری بومی رودوکوکوس FMF، پرایمرهای مناسب طراحی شد؛ سپس ژن‌های dszA,B با استفاده از تکنیک PCR تکثیر گردید و بعد از خالص‌سازی برای کلونینگ به‌داخل وکتور pTZ57R مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: کانستراکت حاصل از کلونینگ ژن‌های dszA,B به داخل وکتور pTZ57R به‌نام pTZAB57R خوانده شد و با استفاده از برش‌های آنزیمی تأیید گردید، سپس توالی ژن‌های dszA,B بعد از خالص‌سازی پلاسمید به روش Large scale به‌طریقه اتوماتیک و توسط شرکت MWG DNA Biotech آلمان تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: مقایسه سکانس به‌دست آمده از ژن‌های dszA,B در باکتری بومی رودوکوکوس FMF هم‌سانی کامل آن‌را با سکانس ژن‌های dszA,B در باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 نشان می‌دهد که دلالت بر حفظ شدن مسیر گوگردزدایی در این باکتری دارد.

واژه‌های کلیدی: رودوکوکوس، رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، گوگردزدایی بیولوژیک، دی‌بنزوتیوفن

مقدمه

آزادسازی اکسیدهای گوگرد بعد از احتراق سوخت‌های فسیلی یک مسأله مهم زیست‌محیطی است. این مسأله یکی از علل مهم آلودگی هواست و به‌علاوه باعث ایجاد باران‌های اسیدی می‌شود [۶،۱۰،۹]. از طرف دیگر وجود گوگرد در ترکیبات نفتی باعث ایجاد خوردگی در وسائل تولید، پالایش و انتقال مواد نفتی و هم‌چنین باعث غیرفعال شدن کاتالیست‌ها می‌شود [۲]. روش رایج برای گوگردزدایی از ترکیبات نفتی، هیدرودسولفوریزاسیون (HDS) می‌باشد. هیدرودسولفوریزاسیون تحت فشار بالا (Ib/in^2 3000 -150) و دمای بالا ^oc ۴۵۵-۲۹۰ و استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزور فلزی برای تبدیل گوگرد موجود در ترکیبات نفتی به سولفید هیدروژن (H_2S) صورت می‌پذیرد [۸].

ارزش سرمایه‌گذاری و بهره‌برداری از این پروژه بالاست،

* نویسنده مسئول. تلفن: ۴۵۸۰۳۸۷-۰۲۱، نمابر:۴۵۸۰۳۹۹-۰۲۱، E-mail: jam@nrcgeb.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

به‌علاوه بیش‌تر گوگرد موجود در محصولات پتروشیمی به‌صورت ترکیبات آلی هتروسیکل می‌باشد که به این روش مقاوم است. بنابراین یک روش مؤثر در مقایسه با روش شیمیایی، مورد نیاز است. از آن‌جایی که پروسس‌های بیوکاتالیستی ارزان است، تحت شرایط ملایم صورت می‌پذیرد و دارای اختصاصیت بالاست. توجه زیادی به سمت توسعه روش‌های بیولوژیکی برای گوگردزدایی ترکیبات نفتی معطوف شده است. مشخص شده است که تعدادی از میکروارگانیسم‌ها با تخریب باندهای کربن- کربن قادرند DBT را به CO_2 و بیومس تبدیل کنند اما این روش ارزش سوخت فسیلی را کاهش می‌دهد [۳،۶،۷،۱۳].

چندین سویه از رودوکوکوس اریتروپولیس پیدا شده‌اند که قادرند سولفور را بدون تخریب حلقه‌های آلی از DBT جدا نمایند که شامل سویه‌های D-1 [۴]، IGTS8 [۵]، Q19-22 [۱۴]،SY1، N1-43 و N1-36 [۱۲،۱۱] می‌باشد، احتمالاً این سویه‌ها روابط کاملاً یک‌سان یا خیلی شبیه به‌هم دارند و با یک روش یک‌سان سولفورزدایی می‌کنند. سویه دیگری به‌طور تجربی از آنتروباکتر شناسایی شده که قادر است DBT را به ۲- هیدروکسی بی‌فنیل تبدیل نماید [۷].

در باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 سه ژن مسئول سولفورزدایی از DBT شامل dszA,B,C برروی یک پلاسمید خطی ۱۲۰ کیلوبازی قرار گرفته است و سه آنزیم Dsz A,B,C را کد می‌کند. آنزیم DszC دو واکنش متوالی را کاتالیز می‌کند که DBT را به DBT سولفون تبدیل می‌نماید. DszA یک فلاوین منواکسیژناز ثانویه است و DszB یک دسولفیناز می‌باشد که مرحله محدودکننده سرعت را در این مسیر، کاتالیز می‌نماید. این واکنش شامل تبدیلDBT سولفون به ۲- هیدروکسی بی‌فنیل (2HBP) و سولفیت می‌باشد. هر دو منواکسیژناز DszA,C به NADPH (فلاوین منونوکلئوتید اکسیدوردوکتاز) برای ایجاد موازنه نیاز دارند [۳،۶].

در این تحقیق باکتری بومی رودوکوکوس FMF که توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران جداسازی شده بود، مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از تأیید خاصیت گوگردزدایی در این باکتری با استفاده از آزمون گیبس استاندارد [۱] مطالعات برای شناسائی ژن‌های درگیر در فرآیند گوگردزدایی در این باکتری آغاز گردید. در این حالت در دو تحقیق مجزا که به‌صورت موازی صورت پذیرفت ژن‌های dszA,B و ژن dszC جداسازی و کلون گردید و با سکانس اپرون، گوگردزدایی در باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 که به‌عنوان یک سویه استاندارد در مطالعات گوگردزدایی بیولوژیک در دنیا مطرح است، مقایسه گردید. در این حالت سکانس به‌دست آمده به میزان ۹۹/۹۷٪ با سکانس حاصل از ژن باکتری R. E. IGTS8 هم‌خوانی دارد.

مواد و روش‌ها

۱) مواد. کلیه آنزیم‌های محدودالاثر به‌کار رفته در این‌کار به‌علاوه کیت InsT/A clone^{TM} PCR Product cloning از شرکت Fermentas خریداری شد. مارکر وزن مولکولی و سایر کیت‌های به‌کار رفته شامل DIG DNA labeling and detction kit, high pure PCR product purification kit, high pure plasmid purification kit, Agarose gel DNA extraction kit از شرکت Roche خریداری شد. همگی مواد مورد استفاده ساخت شرکت Merck آلمان می‌باشد.

۲) کشت باکتری و استخراج DNAی ژنومی. باکتری بومی R. FMF به‌مدت ۴-۳ روز در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد داده شد سپس رسوب باکتری، جدا شده و با EDTA (0/5M, pH=8/0) شسته شد. سلول‌ها در 10ml بافر لیزکننده حاوی لیزوزیم، RNase و پروتئیناز K حل شد و بعد از نیم ساعت انکوباسیون در $37^{o}c$ تا روز بعد در فریزر $-70^{o}c$ قرارگرفت سپس پروتئین‌ها با استفاده از دو مرحله فنل/کلروفورم حذف شد و DNAی ژنومی بعد از جداسازی و شستشو در بافر TE حل گردید.

۳) سادرن بلاتینگ. DNAی ژنومی، بعد از استخراج و برش با آنزیم‌های محدودالاثر برای انجام تکنیک سادرن

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا DNAی ژنومی برروی ژل آگارز ۱٪ به‌صورت اورنایت با ولتاژ ۲۰^{v} ران شد، سپس ژل به ترتیب با 0/25N HCl، محلول دناتوره‌کننده و محلول خنثی‌کننده تیمار گردید. DNAی موجود در ژل توسط روش کاپیلاری ترانسفر به‌صورت شبانه بر روی غشاء نایلونی N^{+} منتقل گردید. غشاء نایلونی بعد از خشک شدن، به‌وسیله اشعه UV با طول موج ۲۵۴nm به‌مدت پنج دقیقه تثبیت شد. مرحله بلاتینگ با استفاده از یک دستگاه هیبریداسیون آون و با استفاده از پروب تهیه شده از اپرون sox4 انجام گرفت به این ترتیب که بعد از انجام شستشوهای لازم، مراحل پری‌هیبریداسیون و هیبریداسیون صورت پذیرفت. بعد از بلوک‌کردن جایگاه‌های آزاد، محلول آنتی‌دیگ آلکالین فسفاتاز به نمونه اضافه گردید؛ ممبران بعد از انجام شستشوهای لازم، رنگ‌آمیزی و ظاهر شد.

۴) روش PCR. روش PCR برای جداسازی و تکثیر ژن‌های dszA,B به‌کار رفت. پرایمرهای مناسب با قراردادن سایت برش آنزیمی HindIII و EcoRI به ترتیب در پرایمر رفت و برگشت طراحی شد.

پرایمر رفت

5' GAA TTC CGC GAT GAC TCA ACA ACG AC 3'

پرایمر برگشت

5' AAG CTT CTA TCG GTG GCG ATT GAG GC 3'

سپس از دو کیت Fast start taq DNA polymerase و High fidelity برای انجام PCR استفاده شد. تزاید ژنی با استفاده از یک دستگاه Corbett Research و در دمای $۶۵^{o}c$ Annealing صورت پذیرفت. بعد از به‌دست آمدن یک باند مشخص در ناحیه 2/48 kb، محصول PCR با استفاده از کیت High pure PCR product purification خالص‌سازی و تغلیظ شد.

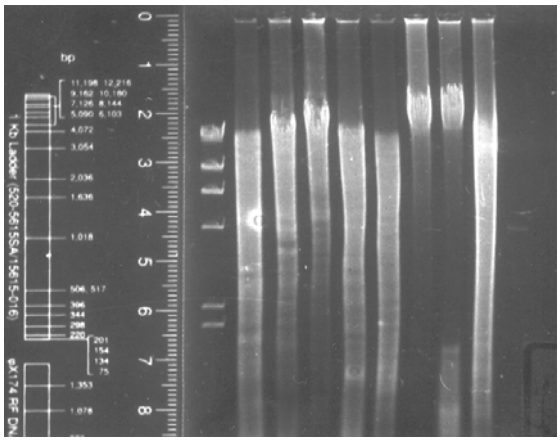
۵) کلونینگ. محصول PCR حاوی ژن dszA,B بعد از خالص‌سازی و تغلیظ به داخل پلاسمید PTZ57R کلون شد. پلاسمید PTZ57R حاوی مارکر bla (سایت مقاومت به آمپی‌سیلین) و توانائی α-complementation می‌باشد. برای این کار کیت InsT/A clone ^{TM} PCR Product cloning مورد استفاده قرار گرفت که دارای توانائی کلون‌کردن قطعات با انتهای صاف می‌باشد. مرحله Ligation با اضافه کردن آنزیم T4 DNA ligase به محلول حاوی قطعه PCR و وکتورPTZ57R به‌صورت اورنایت در دمای $۲۲^{o}c$ انجام پذیرفت. محصول Ligation به داخل باکتری کامپتنت مناسب (DH5α،E.coli) ترانسفورم شد. در مرحله بعد میزان ۱۰۰µl از باکتری ترانسفورم شده بر روی یک پلیت LB حاوی X-Gal، IPTG،Amp پخش شد و به‌صورت اورنایت در انکوباتور $۳۷^{o}c$ قرار گرفت. کلنی‌های سفید، بعد از کشت دادن و استخراج پلاسمید از نظر وجود ژن‌های dszA,B مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

باکتری بومی رودوکوکوس FMF سویه‌ای است که از خاک اطراف پالایشگاه نفت تبریز جدا شده و دارای فعالیت سولفورزدایی اختصاصی از دی بنزوتیوفن (DBT) به‌عنوان یک مولکول مدل می‌باشد. بعد از این‌که به‌وسیله تست‌های بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر سولفورزدایی (مسیر4S) در این باکتری به اثبات رسید، بررسی‌ها برای شناسایی و کلون‌کردن اپرون مربوطه آغاز شد. DNAی ژنومی باکتری بعد از جداسازی و خالص کردن به‌وسیله آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI،EcoRV، HindIII، BglII، ClaI، XbaI و NdeI که فاقد سایت برش در اپرون سولفورزدایی باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 می‌باشند، برش داده شد و سپس به‌صورت اورنایت بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید ران گردید. در این حالت از DNAی ژنومی باکتری T3 به‌عنوان کنترل منفی و از فرگمنت به‌دست آمده از پلاسمید sox4 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۱).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



شکل ۱. پروفایل DNAی ژنومی در باکتری بومیR.FMF

1) مارکر وزن مولکولی (λ DNA digested with HindIII)

2,3,4,5,6,7,8) DNAی ژنومی باکتری R.FMF که به ترتیب توسط آنزیم‌های EcoRI, EcoRV, Hind III, BglII, ClaI, XbaI, NdeI بریده شده است.

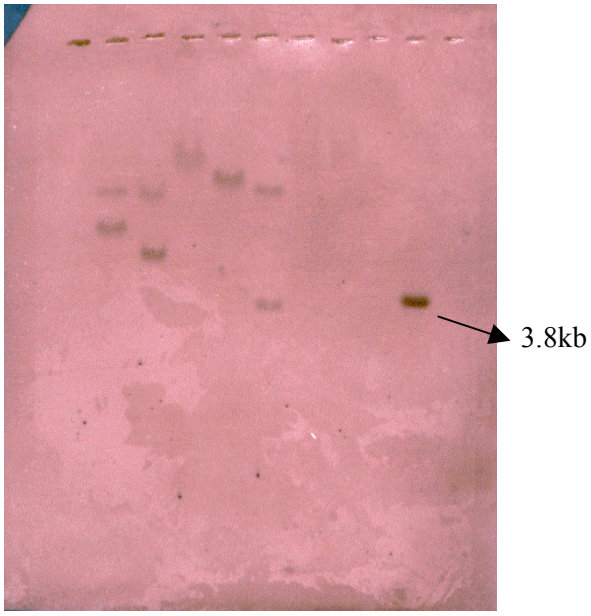
9) DNAی ژنومی باکتری T3 بریده شده با آنزیم EcoRI به‌عنوان کنترل منفی

10) فرگمنت حاوی اپرون SOX به‌عنوان کنترل مثبت

بعد از دناتوره شدن، DNAی ژنومی از داخل ژل به روی ممبران منتقل گردید و سپس مراحل مختلف سادرن بلاتینگ مطابق پروتکل مربوطه صورت پذیرفت. DNAی ژنومی برش داده شده با EcoRI دو باند در نواحی kb ۲۰/۵، ۹ و DNAی ژنومی برش داده شده با EcoRV دو باند در نواحی ۲۰kb و ۷ نشان می‌دهد، درحالی‌که در مورد آنزیم‌های HindIII وBglII یک باند به ترتیب در نواحی kb ۲۳ و ۲۵ دیده می‌شود. در برش با آنزیم ClaI دو باند در نواحی kb ۲۰ و۴ دیده می‌شود که باند پائینی با پروب در یک عرض قرار دارد. آنزیم‌های XbaI و NdeI که بر روی DNAی ژنومی عمل نکرده بودند در این‌جا نیز باندی را نشان نمی‌دهند. ردیف ۹ کنترل منفی و ردیف ۱۰، کنترل مثبت می‌باشد که دارای یک باند شارپ در ناحیه kb ۳/۸ می‌باشد (شکل۲).

از آن‌جایی‌که تمام گزارشات ارائه شده، دلالت بر حفظ‌شدن اپرون سولفورزدایی در داخل سویه‌ها و گونه‌های مختلف دارد، به‌نظرمی‌آید ایجاد دو باند در برش با آنزیم‌های ClaI، EcoRI و EcoRV به علت وجود توالی‌های داخل شونده در دو طرف اپرون سولفورزدایی در این باکتری می‌باشد. توالی‌های داخل شونده، ابزارهای مناسبی برای بررسی تفاوت‌های بین‌سویه‌ای است. دو عدد از مشهورترین این توالی‌ها IS1166 و IS1295 می‌باشند که در سر '۳ ژن soxC در تعدادی از سویه‌های رودوکوکوس گزارش شده است. وجود دو باند مشخص در آزمون سادرن‌بلاتینگ می‌تواند به‌علت قرار گرفتن سایت برش این آنزیم‌ها در درون توالی‌های داخل شونده باشد که قادرند با پروب sox4 واکنش نشان دهند.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



شکل ۲. سادرن بلاتینگ. در این تکنیک نوکلئوتیدهای مکمل با اپرون سولفورزدایی در باکتری بومی R. FMF توسط پروب SOX4 شناخته شده و با ایجاد باندهای هیدروژنی تثبیت گردید. ظاهرسازی این باندها توسط آنتی‌دیگ آلکالین فسفاتاز که به دیجوکسی جنین متصل شده به پروب SOX4 ملحق می‌گردد، بعد از رنگ‌آمیزی با NBT/ BCIP صورت گرفت.

1) DNAی ژنومی برش داده شده با EcoRI

2) DNAی ژنومی برش داده شده با EcoRV

3) DNAی ژنومی برش داده شده با HindIII

4) DNAی ژنومی برش داده شده با BglII

5) DNAی ژنومی برش داده شده با ClaI

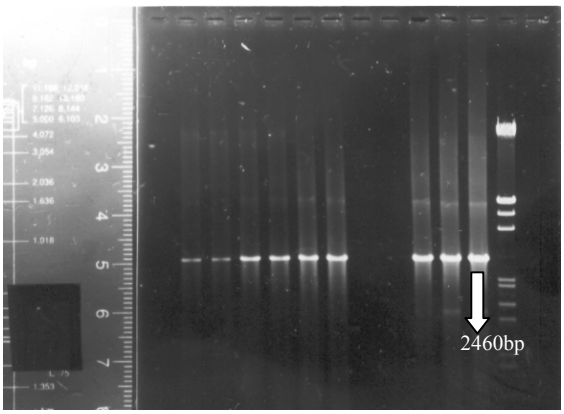
6,7) DNAی ژنومی برش داده شده با XbaI, NdeI

8) DNAی ژنومی باکتری T3 بریده شده با آنزیم EcoRI: کنترل منفی

9) فرگمنت حاوی اپرون SOX: کنترل مثبت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



شکل ۳. تکثیر قطعات ژنی sox (dszA,B) با استفاده از PCR.

1,2,3,4) قطعه ژنی dszA,B بدست آمده ازDNAی ژنومی باکتری R.FMF

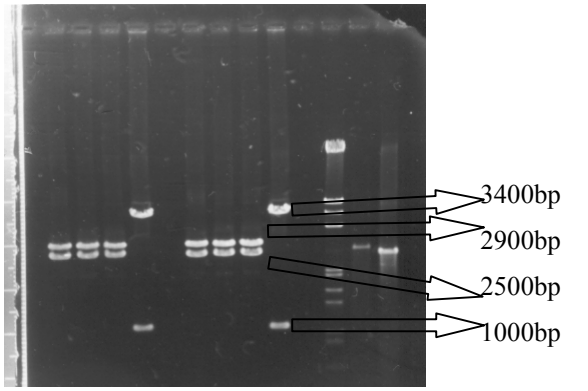
5,6) قطعه ژنی dszA,B بدست آمده از پلاسمید pESOX4 بعنوان کنترل مثبت

7,8) DH5α: کنترل منفی

9,10,11) قطعه ژنی dszA,B بدست آمده از R.FMF بعد از خالص‌سازی وتغلیظ

12) مارکر وزن مولکولی(λ DNA digested with EcoRI/HindIII).

1 2 3 4 5 6 7 8 101112



شکل ۴. تأیید صحت کلونینگ با استفاده از برش‌های آنزیمی.

خطوط ۱ تا ۴) پلاسمید T7 که به ترتیب با آنزیم‌های EcoRI, HindIII, EcoRI/HindIII, Xho بریده شده است.

خطوط ۵ تا ۸) پلاسمید T8 که به ترتیب با آنزیم‌های EcoRI, Xho, HindIII, EcoRI/HindIII, بریده شده است.

خط ۱۰) مارکر وزن مولکولی(λ DNA digested with EcoRI/HindIII)

خط ۱۱) وکتور pTZ57R بعد از خالص‌سازی از یک کلنی آبی و برش با آنزیم‌های EcoRI, HindIII

خط ۱۲) محصول PCR ژن dszA,B

برای بررسی‌های بیش‌تر، کلونینگ مولکولی اپرون سولفورزدایی در دستور کار قرار گرفت. به‌علت طول زیاد اپرون (۳/۸kb) پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های dszA,B که حدود ۲/۵kb طول دارند، طراحی شد؛ سپس سایت برش با آنزیم EcoRI در سر '۵ پرایمر رفت و سایت برش با آنزیم HindIII در سر'۵ پرایمر برگشت قرار گرفت. بعد از ست شدن برنامه PCR، ژن‌های dszA,B آمپلی فاید شد که با استفاده از دو کیت Fast start taq DNA polymerase (شکل۳. باندهای۱ و ۲) و High fidelity (شکل۳. باندهای ۴ و ۳) صورت پذیرفت. برای تأیید PCR از نمونه SOX4 CC118 به‌عنوان کنترل مثبت (شکل۳. باندهای۶ و ۵) و از DH5α به‌عنوان کنترل منفی (شکل۳. باندهای۸ و ۷) استفاده شد. ژن dszA,B بعد از تکثیر با استفاده از کیت High pure PCR product purification خالص‌سازی و تغلیظ شد. جذب نمونه با یک دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲۶۰ nm و۲۸۰ خوانده شد و بعد از تعیین غلظت معادل ۰/۵ µg از DNA، برای کلونینگ به داخل وکتور مورد استفاده قرار گرفت.

بعد از انجام مراحل Ligation و Transformation دوازده کلنی سفید بررسی شد و پلاسمید آن‌ها به روش Mini prep استخراج گردید. در این‌حالت یک باند سوپرکویل در ناحیه ۳/۵ kb مشاهده شد که با توجه به طول قطعه وکتور به نظر می‌آید تمام کلنی‌های سفید، Insert مورد نظر را دریافت کرده باشند. سپس دو کلنی برای مطالعات بیش‌تر انتخاب شد و پلاسمید آن‌ها به ترتیب با آنزیم‌هایEcoRI، HindIII، EcoRI/HindIII و Xho بریده شد (شکل۴). بعد از برش با آنزیم‌های EcoRI و HindIII دو باند در نواحی ۲/۹ kb و ۲/۵ مشاهده شد. با توجه به این‌که جایگاه '۳ وکتور و '۵ insert دارای سایت برش با EcoRI و جایگاه '۵ وکتور و '۳ insert دارای سایت برش با HindIII می‌باشد، مشخص می‌شود که این قطعه به‌طور کامل کلون شده است. تأیید نهایی کلون‌شدن ژن AB به‌وسیله برش با آنزیم Xho به‌دست آمد. از آن‌جایی‌که این آنزیم فاقد سایت برش بر روی وکتور و دارای دو سایت برش به فاصله ۱۰۰۰ bp بر روی ژن AB می‌باشد، خروج یک قطعه ۱۰۰۰ bp از داخل وکتور، نشان‌دهنده کلونینگ قطعی ژن‌های dszA,B می‌باشد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

بحث

یکی از مسائل اصلی صنعت نفت کشور حذف گوگرد از فرکشن‌های مختلف نفت خام می‌باشد. روش رایج در گوگردزدایی از این ترکیبات، هیدرودسولفوریزاسیون می‌باشد که در پالایشگاه‌ها به‌صورت گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد ولی این روش علی‌رغم قیمت بالا، فاقد توانایی لازم در حذف گوگرد از ترکیبات آروماتیک حاوی گوگرد مثل بنزوتیوفن و دی‌بنزوتیوفن می‌باشد. هم اکنون مطالعات زیادی بر روی روش بیولوژیکی حذف گوگرد صورت پذیرفته است و باکتری‌های زیادی شناسایی شده‌اند که قادرند گوگرد را از ترکیبات آروماتیک حاوی گوگرد جدا نمایند، بدون این‌که باعث شکستن اسکلت کربنی آن‌ها شوند. یکی از مهم‌ترین این سویه‌ها، باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 می‌باشد که توسط انستیتوتکنولوژی نفت و گاز آمریکا پتنت شده و دارای توانایی بالایی در حذف گوگرد از ترکیبات نفتی می‌باشد، به‌علاوه به‌عنوان یک سویه مدل در تحقیقات گوگردزدایی مطرح است.

در این تحقیق باکتری بومی رودوکوکوس FMF که از خاک اطراف پالایشگاه نفت تبریز جدا شده بود، مورد مطالعه قرار گرفت و بعد از این‌که وجود فعالیت گوگردزدایی توسط این باکتری با استفاده از آزمون گیبس استاندارد به تأیید رسید، مطالعات برای شناسایی مکانیسم مولکولی و ژن‌های درگیر در فرایند گوگردزدایی در این باکتری آغاز شد. ابتدا با استفاده از تکنیک سادرن بلاتینگ وجود ژن‌های مسیر 4S (مسیر اصلی متابولیکی حذف گوگرد) در این باکتری به تأیید رسید سپس با توجه به طول زیاد اپرون (3800bp)، دو جفت پرایمر برای تکثیر ژن‌های dszAB و dszC به‌طور جداگانه طراحی شد و قطعات به‌دست آمده به داخل وکتور pTZ57R کلون گردید. در این حالت بعد از تعیین توالی، سکانس کامل اپرون گوگردزدایی در باکتری بومی رودوکوکوس FMF به‌دست آمد که فقط در یک نوکلئوتید با سکانس اپرون گوگردزدایی در باکتری R.E.IGTS8 تفاوت دارد که آن هم به‌علت واقع شدن در محل باز سوم باعث تغییر اسیدآمینه نمی‌شود.

در مطالعات گوگردزدایی، استفاده از سویه‌های بومی دارای مزیت نسبی فراوان می‌باشد. چون اگرچه سویه‌های متعدد حاوی اپرون گوگردزدایی در بانک ژنی موجود می‌باشد ولیکن حق استفاده از این سویه‌ها فقط برای مطالعات تحقیقاتی است و فاقد جواز استفاده تجاری می‌باشد. درعین حال که به‌نظر می‌رسد، قابلیت سویه‌های بومی برای کار بر روی نفت ایران که از نظر حضور گوگرد بسیار سنگین است متفاوت از توانایی سویه‌های غیربومی موجود می‌باشد که بررسی فعالیت آن‌ها نیازمند یک‌سری آزمایشات وسیع و دنباله‌دار می‌باشد و حمایت سازمان‌های مربوطه را می‌طلبد.

منابع

[1] Akbarzadeh S, Raheb J, Aghaei A, Karkhane AA. Study of desulfurization rate in Rhodococcus FMF native bacterium. Iranian J Biotechnol, 2003; 1: 36-40.

[2] Denome SA, Olson ES, Young K. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by Rhodococcus sp. strain IGTS8. Appl Environ Microbiol, 1993; 59(9): 2837-2843.

[3] Gallardo ME, Ferrandez A, Lorenzo VD, Garcia JL, Diaz E. Designing recombinant pseudomonas strain to enhance biodesulfurization. J Bacteriol, 1997; 179(22): 7156-7160.

[4] Izumi Y, Ohshiro T, Ogino YH, Hine Y, Shimao M. Selective desulfurization of debenzothiophene by Rhodococcus erythropolis D-1. Appl Environ Microbiol, 1994; 60: 223-226.

[5] Kilbane JJ, Jackowski K. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by Rhodococcus rhodochrous IGTS8. Biotechnol Bioengin, 1992; 40: 1107-1114.

[6] Larose CD, Labbe D, Bergeron H, Jones AM, Greer GW, Al-Hawari J. Conservation of plasmid encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several Rhodococci. Appl Environ Microbiol, 1997; 63(7): 2915-2919.

[7] Li MZ, Squires CH, Monticello DJ, Childs JD. Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory regions of Rhodococcus erythropolis IGTS8. J Bacteriol, 1996; 175(22): 6409-6418.

[8] Maghsoudi S, Kheirolomoom A, Vossoughi M, Tanaka E, Kotoh S. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. strain P32C1. Biochem Engin J, 2000; 5: 11-16.

[9] Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheirolomoom A, Tanaka E, Kotoh S. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by Rhodococcus sp. strain P32C1. Biochem Engin J, 2001; 8: 151-156.

[10] Oldfield C, Poogrebinsky O, Simmonds J, Olson ES, Kulpa CF. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by Rhodococcus sp. strain IGTS8 (ATCC53968). Microbiol, 1997; 143: 2961-2973.

[11] Omori T, Monna L, Saiki Y, Kodama T. Desulfurization of debenzothiophene by Corynebacterium sp. strain SY1. Appl Environ Microbiol, 1992; 53: 911-915.

[12] Omori T, Saiki Y, Kasuga K. Desulfurization of alkyl and aromatic sulfides and sulfonates by dibenzothiophene desulfurizing Rhodococcus sp. strain SY1. Biosci Biotech Biochem, 1995; 59:1195-1198.

[13] Piddington CS, Kovacevich BR, Rambosek J. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

dibenzothiophene desulfurization operon of Rhodococcus sp. strain IGTS8. Appl Environ Microbiol, 1995; 61(2): 468-475.

[14] Wang P, Karawiec S. Desulphurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated strain. Arch Microbiol, 1994; 161: 266-271.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]