

جداسازی و کلونینگ ژن اکسیدوردوکتاز از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

جمشید راهب^{۱*} (Ph.D)، الهام آقائی مقدم^{۱،۲} (M.Sc)، شمیم نقدی^۱ (M.Sc)، مه‌لقا قربانلی^۳ (Ph.D)، غلامرضا بخشی‌خانیکی^۲ (Ph.D)

۱- پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

۲- دانشگاه پیام‌نور تهران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی گرگان

چکیده

سابقه و هدف: یکی از محدودیت‌های فرآیند پالایش و مصرف مواد نفتی مشکلات ناشی از وجود ترکیبات گوگردی در آن‌ها است. استفاده از سوخت‌های فسیلی منجر به آزادسازی SO₂ و به دنبال آن آلودگی محیط‌زیست می‌شود. برای حل این مشکلات، حذف میکروبی گوگرد پیشنهاد شده است. از آن‌جا که کارایی باکتری‌های سولفورزدا محدود است، توجه محققین به افزایش کارایی آن‌ها از طریق دست‌کاری‌های ژنتیکی معطوف شده است. انجام چنین دست‌کاری‌هایی معطوف به بررسی ژنتیک فرآیند حذف گوگرد باکتری‌های بومی و سپس کلون کردن ژن‌های مؤثر در این فرآیند است. در این رابطه، چند سویه باکتری در ایران جداسازی شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. سه ژن B، C و dsz A، دارای توالی DNA، ۴ کیلوبازی هستند که حامل ژن‌های سولفورزدا برای مسیر 4S می‌باشند، که این توالی، در باکتری تازه جدا شده رودوکوکوس FMF شناسایی و جداسازی شد و سپس در باکتری سودوموناس آئروجینوزا کلون گردید. ژن dszD تولید کننده آنزیم اکسیدوردوکتاز در جهت مسیر سولفورزدایی 4S می‌باشد. در این طرح اقدام به شناسایی، جداسازی و کلونینگ dszD از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس نموده و سپس کلون مذکور را تأیید نمودیم.

مواد و روش‌ها: یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس را که دارای فعالیت سولفورزدایی است در داخل شیکر انکوباتور RPM ۲۰۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد و DNA ژنومی آن استخراج گردید و سپس در شرایط بهینه، PCR انجام گرفت. ژن اکسیدوردوکتاز (dszD) از روی ژل آگارز استخراج و در پلاسمید PTZ57R کلون و داخل میزبان *E-coli (DH5 α)* ترانسفورم شد. نقشه ژنی این پلاسمید نو ترکیب با آنزیم‌های محدودکننده به دست آمد و سپس تعیین توالی و همولوژی‌های لازم انجام گرفت.

یافته‌ها: با توجه به این که باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد، دارای سویه‌های مختلف می‌باشد و همین‌طور از تشابه توالی نوکلئوتیدی بین ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد و ژن اکسیدوردوکتاز رودوکوکوس اریتروپولیس مورد آزمایش، این‌طور به نظر می‌رسد که سویه در دست بررسی می‌تواند شباهت‌ها و یا قرابت‌هایی با باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد داشته باشد. نتیجه‌گیری: نتیجه سکانس ژن اکسیدوردوکتاز این سویه از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس که تحت نام FRF.Seq است، نشان می‌دهد که تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به ژن اکسیدوردوکتاز باکتری مورد آزمایش مساوی با تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد یعنی ۵۷۹bp است.

واژه‌های کلیدی: ژن اکسیدوردوکتاز (dszD)، باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس، سولفورزدایی، پلاسمید PTZ57R

مقدمه

با توجه به مشکلاتی که در چند دهه اخیر از یک سو نسبت به کاهش ذخایر سوخت‌های فسیلی و افت آن‌ها در دنیا به وجود آمده و از سوی دیگر با پیچیده‌تر شدن واحدهای پالایشگاهی برای تطبیق و رعایت مقررات خاص حفظ محیط‌زیست و افزایش هزینه تمام شده انرژی مورد نیاز؛ لازم گردیده تا کشورهای پیشرفته درصد برآیند با روش‌های ساده و کم‌هزینه‌تر، از فشار حاصل بر محیط‌زیست بکاهند. یکی از موفق‌ترین روش‌ها، استفاده از ترشحات سلول‌های زنده (آنزیم) می‌باشد. در این رابطه محققین و دانشمندان از حدود ۵۰ سال قبل سعی بر آن داشته‌اند که جداسازی گوگرد را از طریق روش‌های بیوشیمی و میکروارگانیزم‌ها انجام دهند که خوشبختانه در این راه موفقیت‌هایی به دست آورده‌اند، به طوری که واحدهای تجاری آن، در آینده نزدیکی نصب و مورد بهره‌برداری قرار خواهند گرفت و با اجرای این پروژه، کیفیت ساختاری مواد نفتی ارتقاء می‌یابد.

گوگرد موجود در ترکیبات نفتی باید حذف گردد. راه حل موجود سولفورزدایی به طریق شیمیایی (Hydrodesulfurization, HDS) می‌باشد. در این روش گوگرد آلی تحت فشار و حرارت بالا در حضور کاتالیست‌های فلزی احیا شده و ایجاد گاز (H_2S) می‌گردد. ضمناً روش سولفورزدایی (HDS) هزینه بالایی در بردارد. بنابراین روش HDS یک روش مطلوب نیست، ولی با این حال به طور گسترده‌ای در صنایع نفتی در جهان استفاده می‌شود [۷،۳،۸،۲،۹،۱]. برای حل این مشکلات، حذف بیولوژیک گوگرد پیشنهاد شده است. یکی از این روش‌ها، روش حل میکروبی گوگرد (Microbial Desulfurization, MDS) می‌باشد. باکتری‌های زیادی شناسایی شده‌اند که با استفاده از مسیرهای هوازی و بی‌هوازی اقدام به حذف گوگرد از ترکیبات نفتی می‌نمایند. بنابراین گزارشات اندکی در استفاده از این طریق وجود دارد. اما در فرآیند هوازی، باکتری‌های زیادی شناسایی شده‌اند که به طور انتخابی دی‌بنزوتیوفن (DBT) یا ترکیبات دیگر را سولفورزدایی می‌کنند. در حالی

که بیش‌تر باکتری‌ها با استفاده از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و گوگرد، کیفیت سوخت را پائین می‌آورند؛ فرآیند ایده‌آل آن است که در آن حذف گوگرد بدون آسیب دیدن اسکلت کربنی صورت گیرد [۱۴،۱۲]. انواع مختلفی از ترکیبات آلی حلقوی حاوی گوگرد در سوخت‌های فسیلی وجود دارد اما دی‌بنزوتیوفن (DBT) که یک ترکیب آلی گوگردار است از طرف محققین به عنوان مولکول شاخص در مطالعات حذف میکروبی گوگرد مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۲،۸]. شاخص‌ترین گونه باکتری که مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی روی آن انجام شده است رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* نام دارد. بررسی حذف اختصاصی گوگرد توسط این باکتری پیشرفت‌های زیادی داشته است، به طوری که مدت زمان استفاده از دی‌بنزوتیوفن و تبدیل آن به HBP-۲ از سال ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۷ به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. سویه *R.IGTS8* با استفاده از مسیر ۴S قادر به جداسازی گوگرد از دی‌بنزوتیوفن طی یک فرآیند چهار مرحله‌ای و در نهایت تولید HBP-۲ است. در این فرآیند، دو آنزیم منواکسیژناز به نام‌های DSZA و DSZC و یک آنزیم دسولفیناز به نام DSZB شرکت دارند. DSZA باعث تبدیل $DBTO_2$ به HBPSi می‌گردد.

DSZB با استفاده از اتصال نوکلئوفیلی مولکول‌های آب روی اتم گوگرد HBPSi، باعث تشکیل HBP-۲ و آزاد شدن SO_2 می‌گردد. در طرح قبلی موفق شدیم که سه ژن کدکننده آنزیم‌های مسیر ۴S را در سودوموناس آئروجینوزا کلون کرده و صنعت سولفورزدایی را در این باکتری بررسی نماییم [۵،۱۵،۱۳،۷،۱۱،۱۰،۴]. با شناسایی ژن کدکننده آنزیم اکسیدورودوکناز، که یکی از اساسی‌ترین کاتالیزورهای واسطه‌ای مسیر گوگردزدایی ۴S در باکتری‌ها می‌باشد، در طرح‌های بعدی با بیان انبوه این ژن به موازات ژن‌های مسیر سولفورزدایی ۴S در باکتری‌ها، میزان سولفورزدایی را می‌توان بالاتر برد. از آنجایی که آزمایش‌های *in vitro* نشان داده است که افزایش NADH و FMNH₂ باعث افزایش قدرت سولفورزدایی در باکتری‌های سولفورزدا می‌شود، لزوم

مقادیر زیر با استفاده از کیت (شرکت سیناژن) استفاده شد.

برای حجم ۱۰۰ میکرولیتر،

10µl	10X Buffer
2µl	dNTP
6µl	MgCl ₂
1µl	پرایمر رفت
1µl	پرایمر برگشت
1µl	Taq آنزیم
78µl	آب مقطر

استخراج ژن اکسیدوردوکتاز از روی ژل آگارز با استفاده

از کیت Agarose Gel DNA Extraction (شرکت

Roche) انجام شد.

(۴) تهیه سلول پذیرا و انجام کلونینگ. در این

مرحله از کیت InsT/A clone TM PCR product

cloning kit (شرکت Fermentase) استفاده شد.

(۵) استخراج پلاسمید. بعد از یک شبانه روز چند کلنی

سفید انتخاب کرده و از کلنی سفید به روش Miniprep

استخراج پلاسمید انجام گردید.

(۶) Mapping. با کمک آنزیم‌های محدودکننده‌ای که در

وکتور پلاسمیدی PTZ57R و همین‌طور آنزیم‌هایی که در دو

طرف پرایمر رفت و پرایمر برگشت ژن اکسیدوردوکتاز

طراحی شده، آنالیز کلون‌ها انجام گرفت.

(۷) آماده کردن نمونه‌های کلون شده جهت تعیین

توالی.

(۸) بررسی هومولوژی‌ها با استفاده از نرم‌افزار

DNA star

نتایج

جهت طراحی پرایمرها، ابتدا سکانس ژن اکسیدوردوکتاز

(ژن dszD)، رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 را از بانک

اطلاعاتی ژن (Gene bank) به دست آورده که ۵۷۹bp

می‌باشد و سپس برای طراحی پرایمر رفت (Forward)، ۲۱

کلونینگ و بیان انبوه این ژن جهت افزایش سولفورزدایی قابل

درک است. در این طرح هدف، جداسازی و کلونینگ ژن

اکسیدوردوکتاز از یک سویه باکتری رودوکوکوس

اریتروپولیس و تعیین توالی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

(۱) سویه‌های باکتریایی.

(الف) یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس که از

دانشگاه شهید بهشتی (ابراهیم پور غلامحسین، دانشگاه شهید

بهشتی) که دارای فعالیت سولفورزدایی است در اختیار ما قرار

گرفت.

(ب) سویه‌هایی از *E. coli* تحت عنوان *DH5a* و *Jm110*

متعلق به مرکز ژنتیک بوده و مورد استفاده قرار گرفت.

(۲) کشت سویه‌ای از باکتری رودوکوکوس

اریتروپولیس و استخراج DNA ژنومی آن. این

باکتری در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین به مدت

یک روز در داخل شیکر انکوباتور با ۲۰۰ RPM و ۳۷ درجه

سانتی‌گراد رشد داده شد.

(۳) طراحی پرایمر و روش PCR.

ابتدا پرایمرهای مناسب با سکانس‌های زیر طراحی شدند.

توالی ۳'-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG AAT GCC-۵'

به عنوان پرایمر رفت و توالی

۵'-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG AGT CGG-۳'

به عنوان پرایمر برگشت در نظر گرفته شدند. تکثیر قطعات

نوکلئوتیدی ژن اکسیدوردوکتاز به وسیله روش PCR با استفاده

از دستگاه Corbett research صورت گرفت. برنامه PCR

به صورت یک سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵

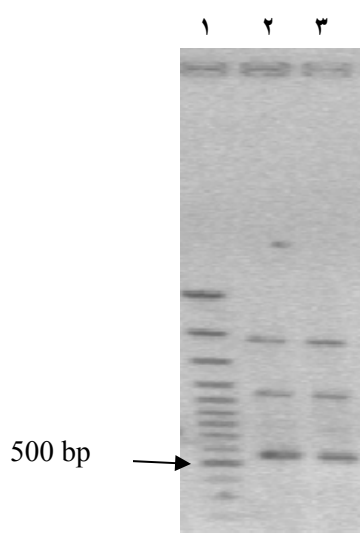
دقیقه، ۳۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱

دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۴ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی ۷۲ درجه

سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود.

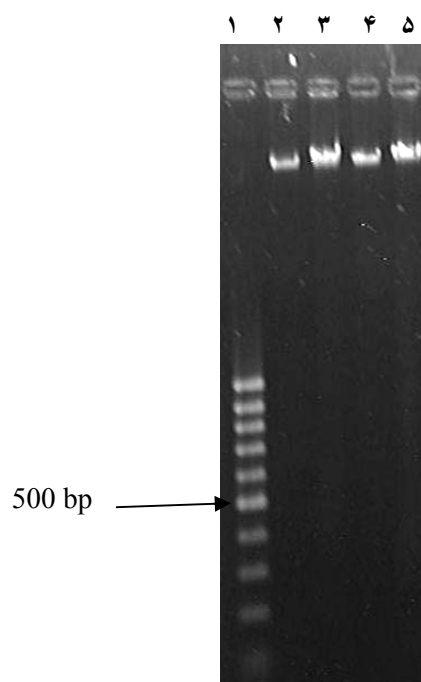
استخراج شد. این باند ژن اکسیدوردوکتاز متعلق به سویه‌ای از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس، بعد از خالص‌سازی و تغلیظ به‌عنوان Insert، با استفاده از کیت در InsT/Aclone TM PCR Product cloning kit ناحیه مولتی‌پل کلونینگ سایت وکتور *pTZ57R* کلون شد. پلاسمید *pTZ57R* حاوی مارکر *bla* (سایت مقاومت به آمپی‌سیلین و توانایی α -Complementation) می‌باشد. سپس این محصول Ligation به‌داخل باکتری پذیرای مناسب به نام *E. coli (DH5 α)* ترانسفورم شد. در مرحله بعد، استخراج پلاسمید انجام شد و هر دو کلون با آنزیم‌های محدودکننده بریده شد (شکل ۳).



شکل ۲. ستون اول: مارکر ۱۰۰۰bp، ستون دوم و سوم: محصول PCR مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

نتیجه سکانس باکتری این سویه از رودوکوکوس اریتروپولیس که تحت نام FRF.seq است، نشان می‌دهد که تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به ژن اکسیدوردوکتاز باکتری مورد آزمایش مساوی با تعداد نوکلئوتیدهای مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد، یعنی ۵۷۹bp است. در مرحله بعد توسط برنامه DNA star، توالی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس (FRF.seq) با توالی ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس *IGTS8* استاندارد، Align و مقایسه شد (ضمیمه ۱).

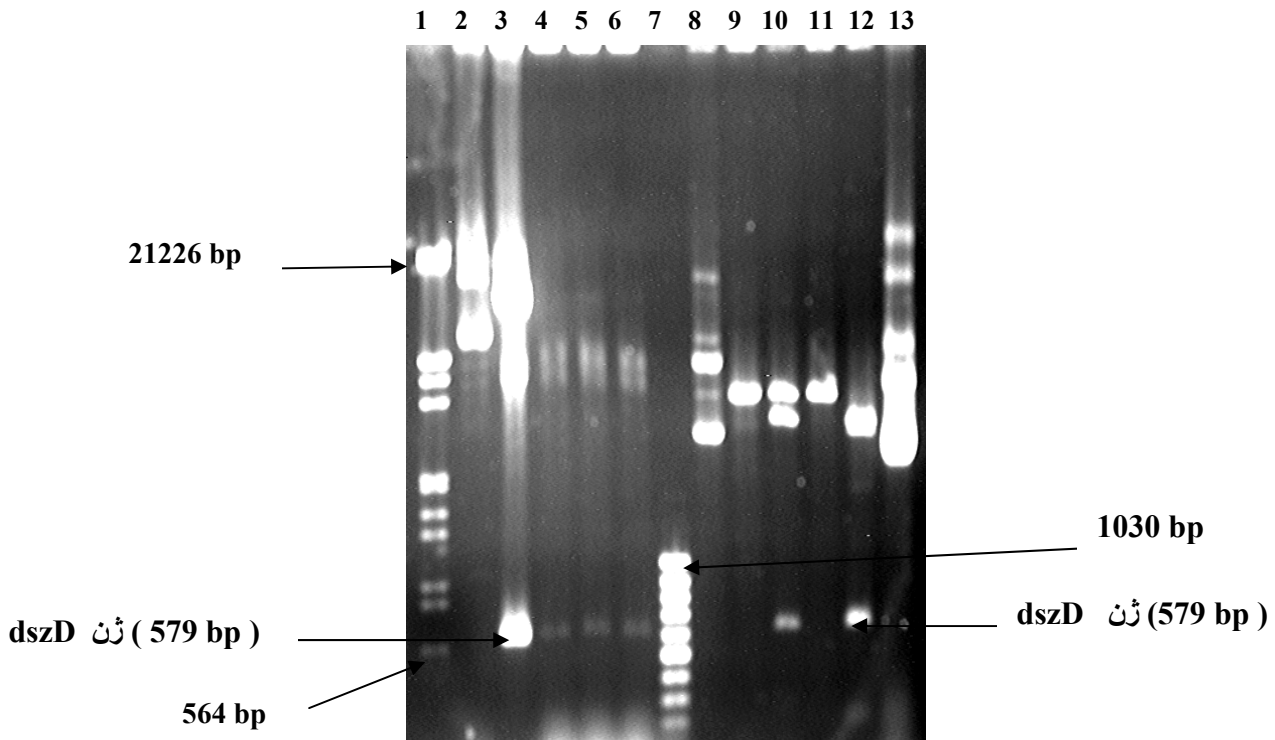
نوکلئوتید از اول سکانس این ژن برداشته و با ابتدای آن توالی آنزیم EcoRI (GAA TTC) اضافه شد. برای طراحی پرایمر برگشت (Reverse)، از آخر سکانس ژنومی اکسیدوردوکتاز *IGTS8* استاندارد، ۲۱ نوکلئوتید به صورت معکوس و Compelement شده، انتخاب و به اول پرایمر برگشت، توالی آنزیم XbaI (TCT AGA) اضافه شد. سپس یکی از سویه‌های باکتری رودوکوکوس که از دانشگاه شهید بهشتی در اختیار ما قرار گرفت کشت داده و DNA ژنومی آن استخراج شد (شکل ۱).



شکل ۱. ۱) مارکر ۱۰۰۰bp، ۲) ستون‌های بعدی مربوط به DNA کروموزومی باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس

جهت تکثیر ژن اکسیدوردوکتاز، از DNA ژنومی استخراج شده و تکنیک PCR با Annealing ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ سیکل با پرایمرهای طراحی شده استفاده شد (شکل ۲).

نتیجه PCR، حضور سه باند بر روی ژل آگارز ۱ درصد بود، یکی از این قطعات که از نظر وزنی و تعداد نوکلئوتیدها به ژن اکسیدوردوکتاز *IGTS8* استاندارد (۵۷۹bp) شبیه‌تر بود، یعنی باندی که در حدود ۶۰۰bp بر روی ژل آگارز بود بریده و سپس باند مورد نظر از روی ژل، با استفاده از کیت Agarose Gel DNA Extraction kit خالص‌سازی و



شکل ۳. Mapping کلون ژن اکسیدوردوکتناز مربوط به رودوکوکوس اریتروپولیس

(1) مارکر ۸۳ = ۴ ماکرولیتر

(2) کلون شماره ۱ حاوی ژن اکسیدوردوکتناز = ۵ ماکرولیتر

(3) کلون شماره ۱ دایجست شده با آنزیم BamHI = ۱۰ ماکرولیتر

(4) کلون شماره ۱ دایجست شده با آنزیم EcoRI = ۱۰ ماکرولیتر

(5) کلون شماره ۱ دایجست شده با آنزیم HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

(6) کلون شماره ۱ دایجست شده با آنزیم E. coli + HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

(7) مارکر ۱۰۰ bp = ۴ ماکرولیتر

(8) کلون شماره ۳ حاوی ژن اکسیدوردوکتناز = ۵ ماکرولیتر

(9) کلون شماره ۳ دایجست شده با آنزیم BamHI = ۱۰ ماکرولیتر

(10) کلون شماره ۳ دایجست شده با آنزیم EcoRI = ۱۰ ماکرولیتر

(11) کلون شماره ۳ دایجست شده با آنزیم HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

(12) کلون شماره ۳ دایجست شده با آنزیم EcoRI + HindIII = ۱۰ ماکرولیتر

(13) کنترل منفی = ۱۰ ماکرولیتر

در نهایت بیان آنزیم اکسیدوردوکتناز دارد یا خیر؛ دوباره توسط برنامه کامپیوتری DNA star توالی ژن اکسیدوردوکتناز مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس (Translate DNA sequence FRF.seq) و همین‌طور توالی ژن اکسیدوردوکتناز مربوط به باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 استاندارد (Translate DNA sequence IGTS8.seq) نیز ترجمه شد، که ترجمه هر دو

نتیجه این که فقط در ۱۴ نوکلئوتید با یکدیگر متفاوت بودند یعنی حدود ۹۸ درصد توالی ژن اکسیدوردوکتناز باکتری‌ها شبیه توالی ژن اکسیدوردوکتناز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 استاندارد می‌باشد، بنابراین ۹۸ درصد توالی، Conserve شده است و فقط در ۲ درصد از توالی با هم اختلاف دارند. برای پی بردن به این که آیا وجود ۲ درصد اختلاف نوکلئوتیدی، تأثیری در بیان اسیدهای آمینه و

استفاده کردند و بازده این مسیر را چندین برابر افزایش دادند. به این ترتیب آنچه ضروری به نظر می‌رسد کار بر روی افزایش بیان این ژن و استفاده از تشدیدکننده‌ها در بیان آن است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری حمایت شده است. از مسئول واحد ارسال سکانسینگ جناب آقای مهدی شفا به خاطر همکاری‌های لازم قدردانی می‌شود.

منابع

- [1] Bressler DC, Fedorak PM. Identification of disulfides from the biodegradation of dibenzothiophene. *Appl Microbiol*, 2001; 67:5084-93.
- [2] Chang JH, Rhee SK, Chang YK, Chang HN. Desulfurization of diesel oils by a newly isolated dibenzothiophene-degrading *Nocarida* sp. strain CYKS2. *Biotechnol Prog*, 1998; 14(6):851-5.
- [3] Denis-Larose C, Bergeron H, Labbe D, Greer CW, Hawari J, Grossman MJ, Sankey BM, et al. Characterization of the basic replicon of *Rhodococcus* -*Escherichia* shuttle vector. *Appl Envir Microbiol*, 1998; 64:4363-7.
- [4] Frassinetti S, Setti L, Corti A, Farrinelli P, Montevecchi P, Vallini G. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Can J Microbiol*, 1998; 44:289-97.
- [5] Gallagher JR, Olson ES, Stainley DC. Microbial desulfurization of dibenzothiophene A-sulfure specific pathway. *FEMS Microbiol letters*, 1993; 107(1):31-6.
- [6] Gray KA, Pogrebinsky OS, Mrachko GT, Xi L, Monticello DJ, Squires CH. Molecular mechanism of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat Biotechnol*, 1996; 14:1705-9.
- [7] Iwabuchi N, Sunairi M, Urai M, Itoh C, Anzai H, Nakajima M, et al. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Appl Envir Microbiol*, 2002; 68:2337-43.
- [8] 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; 178:6409-18.
- [9] Lee MK, Senius JD, Grossman MJ. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl Envir Microbiol*, 1995; 61:4362-6.
- [10] Lizama HM, Wilkins LA, Scott TM. Debenzothiophene sulfure can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate reducing bacteria. *Biotechnol Letters*, 1995; 17(1):113-6.
- [11] Oldfield C, Pogrebinsky O, Simmonds J, Olson ES, Kulpa CF. Elucidation of metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* strain IGTS8 (ATCC53968). *Microbiology*, 1997; 143:2961-73.
- [12] Ohshiro T, Kanbayashi Y, Hine Y, Izumi Y. Involvement of coenzyme in dibenzothiophene degrading enzyme system from *Rhodococcus erythropolis* D-I. *Biosci Biotech Biochem*, 1995; 59:1349-51.
- [13] Purdy RF, Lepo JE, Ward B. Biodesulfurization of organic-sulfur compounds. *Curr Microbiol*, 1993; 27:219-22.
- [14] Piddington CS, Kovacevich BR, Rambosek J. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *Appl Envir Microbiol*, 1995; 61:468-75.
- [15] Mcfarland BL. Biodesulfurization. *Curr Opin Microbiol*, 1999; 2:257-64.

دقیقاً ۱۹۳ اسید آمینه است. سپس توالی هر دو اسید آمینه توسط همین برنامه کامپیوتری با هم مقایسه و Align گردید، که کاملاً توالی اسیدهای آمینه هر دو آنزیم اکسیدوردوکتاز شبیه یکدیگر بود و تنها تفاوت آن در یک اسید آمینه واقع در ناحیه Stop codon می‌باشد که تأثیری در بیان آنزیم ندارد (ضمیمه ۲). از تشابه توالی نوکلئوتیدی در این دو باکتری این طور به نظر می‌رسد که سویه در دست بررسی، می‌تواند شباهت‌ها و یا قرابت‌هایی با باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 استاندارد داشته باشد.

بحث و نتیجه گیری

در طی این تحقیق، ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، با استفاده از پرایم‌هایی که قبلاً بر اساس ژن اکسیدوردوکتاز باکتری استاندارد طراحی شده بود به وسیله تکنیک PCR جداسازی و کلون گردید و پس از تأیید کلونینگ، تعیین توالی شد. نتایج حاصل از تعیین توالی، مبین شباهت صددرصدی این ژن با ژن اکسیدوردوکتاز باکتری استاندارد بود.

در رابطه با شناسایی ژن اکسیدوردوکتاز و بررسی توالی آن مک فارلند [۱۱]، در مقاله خود متذکر شده که پروتئین مربوط به این ژن از نظر توالی با پروتئین دیگری از خانواده رودوکوکوس به نام *ThcE* همولوژی دارد. *ThcE* به الکل دهیدروژنازهای گروه III تعلق دارد و سنتز آن به وسیله آترازین، تیوکربامات، هربی‌سایدها یا الکل‌های نوع اول القا می‌شود.

در رابطه با شناسایی نحوه عملکرد پروتئین اکسیدوردوکتاز، با بررسی مسیر 4S، متوجه شدند که آنزیم خاصی باید حضور داشته باشد تا تأمین کننده عامل احیا (FMNH₂) باشد. با این پیش فرض، Gray و همکارانش [۶] برای اولین بار اقدام به جداسازی ژن *dszD* از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس نمودند. در مراحل بعد، افرادی هم چون Xi و همکارانش [۱۶]، از پروتئین اکسیدوردوکتاز و ویرو هاروی برای تأمین عامل احیای مسیر گوگردزایی

ضمیمه‌ها

[16] Xi L, Squires CH, Monticello DJ, Childs JD. A flavin reductase stimulates dszA and dszC proteins of Rhodococcus erythropolis IGTS8 in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 1997; 230:73-5.

ضمیمه ۱.

Alignment Report of Untitled ClustalV (Weighted)
Sunday, October 24, 2004 10:36 AM

	A T G T C T G A C A A G C C G A A T G C T G T T T C C A G C	Majority
	10 20 30	
1	A T G T C T G A C A A G C C G A A T G C T G T T T C C A G C	FRf
1	A T G T C T G A C A A G C C G A A T G C C G T T T C C A G C	IGTS8
	C A C A C C A C C C C C G A C G T C C C C G A A G T A G C G	Majority
	40 50 60	
31	C A C A C C A C C C C C G A C G T C C C C G A A G T A G C G	FRf
31	C A C A C C A C C C C C G A C G T C C C C G A A G T A G C A	IGTS8
	G C G A C G C C C G A G T T G T C C A C C G G C A T C T G C	Majority
	70 80 90	
61	G C G A C G C C C G A G T T G T C C A C C G G C A T C T G C	FRf
61	G C G A C G C C C G A G T T G T C C A C C G G C A T C T G C	IGTS8
	G C C G G T G A C T A C C G T G C T G C G C T T C G C C G C	Majority
	100 110 120	
91	G C C G G T G A C T A C C G C G C T G C G C T T C G C C G C	FRf
91	G C C G G T G A C T A C C G T G C A G C G C T T C G C C G C	IGTS8
	C A C C C C G C C G G T G T C A C C G T C G T G A C C C T C	Majority
	130 140 150	
121	C A C C C C G C C G G T G T C A C C G T C G T G A C C C T C	FRf
121	C A C C C C G C A G G T G T C A C C G T C G T G A C C C T C	IGTS8
	G A T T C G G G T A C C G G C C C G G T G G G T T T C A C C	Majority
	160 170 180	
151	G A T T C G G G T A C C G G C C C G G T G G G T T T C A C C	FRf
151	G A T T C G G G T A C C G G C C C G G T G G G T T T C A C C	IGTS8
	G C C A C C T C G T T C T C G T C C G T C T C C C T G G A G	Majority
	190 200 210	
181	G C C A C C T C G T T C T C G T C C G T C T C C C T C G A G	FRf
181	G C C A C C T C G T T C T C G T C C G T C T C C C T G G A G	IGTS8

Alignment Report of Untitled ClustalV (Weighted)
Sunday, October 24, 2004 10:36 AM

	C C G C C G C T C G T C T C G T T C A A C A T C G C G G A G	Majority
	220 230 240	
211	C C G C C G C T C G T C T C G T T C A A C A T C G C G G A G	FRf
211	C C G C C G C T C G T C T C G T T C A A C A T C G C G G A G	IGTS8
	A C G T C G T C G A G C A T C A A T G C G C T C A A G G C A	Majority
	250 260 270	
241	A C G T C G T C G A G C A T C A A T G C A C T C A A G G C A	FRf
241	A C G T C G T C G A G C A T C A A T G C G C T C A A G G C A	IGTS8
	G C C G A G T C C T T G G T G A T C C A C C T T C T C G G C	Majority
	280 290 300	
271	G C C G A G T C C T T G G T G A T C C A C C T T C C G G C	FRf
271	G C C G A G T C C T T G G T G A T C C A C C T T C C G G C	IGTS8
	G A A C A T C A G C A G C A T C T G G C C C A G C G C T T T	Majority
	310 320 330	
301	G A A C A T C A G C A G C A T C T G G C C C A G C G C T T T	FRf
301	G A A C A T C A G C A A C A T C T G G C C C A G C G C T T T	IGTS8
	G C G C G T A G T G C C G A T C A G C G T T T T G C A G A C	Majority
	340 350 360	
331	G C G C G T A G T G C C G A T C A G C G T T T T G C A G A C	FRf
331	G C G C G T A G C G C C G A T C A G C G T T T T G C A G A C	IGTS8
	G A G T C A C T G T G G G C A G T G C T C G A C A C C G G G	Majority
	370 380 390	
361	G A G T C A C T G T G G G C A G T G C T C G A C A C C G G G	FRf
361	G A G T C A C T G T G G G C A G T G C T C G A C A C C G G G	IGTS8
	G A G C C G G T T C T G C A C G G C A C C C C C A G C T G G	Majority
	400 410 420	
391	G A A C C G G T G C T G C A C G G C A C C C C C A G C T G G	FRf
391	G A G C C G G T T C T G C A C G G C A C C C C C A G C T G G	IGTS8

Alignment Report of Untitled ClustalV (Weighted)

Sunday, October 24, 2004 10:36 AM

	A T G C G C G T C A A G G T C G A C C A G T T G A T C C C T	Majority
	430 440 450	
421	A T G C G C G T C A A G G T C G A C C A G C T G A T C C C T	FRf
421	A T G C G C G T C A A G G T C G A C C A G T T G A T C C C T	IGTS8
	G T C G G C G A C C A C A C G C T G G T C A T C G G A C T C	Majority
	460 470 480	
451	G T C G G C G A C C A C A C G C T G G T C A T C G G A C T C	FRf
451	G T C G G C G A C C A C A C G C T G G T C A T C G G A C T C	IGTS8
	G T C A C G C G G G T T C A C G C C G A A G A G G A C G A C	Majority
	490 500 510	
481	G T C A C G C G G G T T C A C G C C G A A G A A G A C G A C	FRf
481	G T C A C G C G G G T T C A C G C C G A A G A G G A C G A C	IGTS8
	G A A T C C G C T G C C G C G C C G C T G C T C T A C C A C	Majority
	520 530 540	
511	G A A T C C G C T G C C G C G C C G C T G C T C T A C C A C	FRf
511	G A A T C C G C T G C C G C A C C G C T G C T C T A C C A C	IGTS8
	G A G G G C A A G T A C T A C C G C G C G A C T C C G T T A	Majority
	550 560 570	
541	G A G G G C A A G T A C T A C C G C G C G A C T C C G T T A	FRf
541	G A G G G C A A G T A C T A C C G C C C G A C T C C G T T A	IGTS8
	G G T C A A T A G	Majority
571	G G T C A A T A G	FRf
571	G G T C A A T A G	IGTS8

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that match the Consensus exactly.

Alignment Report of Untitled ClustalV (PAM250)
 Sunday, October 24, 2004 10:44 AM

	M S D K P N A V S S H T T P D V P E V A A A T P E L S T G I C	Majority
	10 20 30	
1	M S D K P N A V S S H T T P D V P E V A A A T P E L S T G I C	igts8
1	M S D K P N A V S S H T T P D V P E V A A A T P E L S T G I C	frf
	A G D Y R A A L R R H P A G V T V V T L D S G T G P V G F T	Majority
	40 50 60	
31	A G D Y R A A L R R H P A G V T V V T L D S G T G P V G F T	igts8
31	A G D Y R A A L R R H P A G V T V V T L D S G T G P V G F T	frf
	A T S F S S V S L E P P L V S F N I A E T S S S I N A L K A	Majority
	70 80 90	
61	A T S F S S V S L E P P L V S F N I A E T S S S I N A L K A	igts8
61	A T S F S S V S L E P P L V S F N I A E T S S S I N A L K A	frf
	A E S L V I H L L G E H Q Q H L A Q R F A R S A D Q R F A D	Majority
	100 110 120	
91	A E S L V I H L L G E H Q Q H L A Q R F A R S A D Q R F A D	igts8
91	A E S L V I H L L G E H Q Q H L A Q R F A R S A D Q R F A D	frf
	E S L W A V L D T G E P V L H G T P S W M R V K V D Q L I P	Majority
	130 140 150	
121	E S L W A V L D T G E P V L H G T P S W M R V K V D Q L I P	igts8
121	E S L W A V L D T G E P V L H G T P S W M R V K V D Q L I P	frf
	V G D H T L V I G L V T R V H A E E D D E S A A A P L L Y H	Majority
	160 170 180	
151	V G D H T L V I G L V T R V H A E E D D E S A A A P L L Y H	igts8
151	V G D H T L V I G L V T R V H A E E D D E S A A A P L L Y H	frf
	E G K Y Y R A T P L G Q -	Majority
	190	
181	E G K Y Y R P T P L G Q .	igts8
181	E G K Y Y R A T P L G Q .	frf

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that match the Consensus exactly.