

کلونینگ و بیان اپرون سولفورزدایی (dsz A,B,C) SOX در باکتری اشریشیاکلی DH5 α و مقایسه فعالیت سولفورزدایی آن با سویه‌های رودوکوکوس IGTS8، سودوموناس (آئروژینوزا و پوتیدا) و اشریشیاکلی CC118 λ p ir

فرهاد برزگر^{۱*} (M.Sc)، جمشید راهب^۲ (Ph.D)، میرلطیف موسوی^۱ (Ph.D)

۱- دانشگاه امام حسین (ع)

۲- پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

چکیده

سابقه و هدف: احتراق سوخت‌های فسیلی منبع آلودگی محیط زیست است. گوگردزدایی زیستی از سوخت‌های فسیلی به عنوان یک روش جایگزین برای گوگردزدایی شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. این روش، مقرون به صرفه بوده و برای محیط زیست بی‌ضرر می‌باشد. DBT به عنوان یک مولکول الگو جهت سنجش توانایی میکروارگانیسم‌ها در گوگردزدایی مورد استفاده قرار گرفته است. چندین باکتری گزارش شده که DBT را سولفورزدایی می‌کنند. در این میان، باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 که واجد اپرون گوگردزدایی dsz(A,B,C) می‌باشد، قادر است DBT (به عنوان منبع گوگرد) را از طریق مسیر ۴s به 2HBP تبدیل کند که در محیط کشت تجمع می‌یابد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق اپرون گوگردزدایی dsz(A,B,C) در باکتری E.coli DH5 α توسط وکتور PVLT31 کلون شد و فعالیت سولفورزدایی آن به اثبات رسید، برای تأیید وجود ژن‌های گوگردزا، از هضم آنزیمی و تکنیک PCR استفاده شد.

یافته‌ها: مقایسه فرایند گوگردزدایی در این باکتری نو ترکیب با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، سودوموناس پوتیدا EGSOX، cc118 λ pir E.coli توسط تست گیپس و HPLC، نشان داد که بالاترین میزان تولید 2HBP را سودوموناس آئروژینوزا EGSOX و E.coli DH5 α به ترتیب دارا هستند. نتیجه‌گیری: نتیجه‌گیری می‌شود که با افزایش کپی نامبر اپرون dsz(A,B,C) و مهار سولفور با جایگزین کردن پروموتور می‌توان فعالیت سولفورزدایی در DBT را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: سولفورزدایی زیستی، دای بنزوتایوفن (DBT)، ۲- هیدروکسی بای فنیل (2HBP)، باکتری E.coli DH5 α ، پلاسمید PVLT31

مقدمه

اکسیدهای نیتروژن و گوگرد در ایجاد باران‌های اسیدی، از بین بردن جنگل‌ها، مسموم شدن دریاچه‌ها و تخریب ساختمان‌ها نقش دارند. به این سبب دولت‌مردان سراسر جهان

انتشار ذرات حاصل از احتراق سوخت‌های فسیلی به اتمسفر مشکلات جدی را برای سیاره ما فراهم کرده است.

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۸۷-۰۲۱، نمابر: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۹۹-۰۲۱، E-mail: jam@nrcgeb.ac.ir

به منظور کاهش انتشار این ذرات دست به وضع قوانین تازه‌ای زده‌اند که به موجب آن‌ها استفاده از محصولات نفتی با محتوای گوگرد پایین ضروری شده است [۵،۴،۳،۲،۱]. روش رایج برای گوگردزدایی از ترکیبات واسطه مثل نفت سفید و گازوئیل، هیدرودسولفوریزاسیون (HDS) می‌باشد.

هیدرودسولفوریزاسیون یک پروسه کاتالیتیکی است که تحت فشار بالا (۳۰۰۰-۱۵۰ یوند بر اینچ مربع) و دمای بالا $^{\circ}\text{C}$ ۲۹۰-۴۵۵ و استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزور فلزی برای تبدیل گوگرد موجود در ترکیبات نفتی به سولفید هیدروژن (H_2S) صورت می‌پذیرد [۵]. ارزش سرمایه‌گذاری و بهره‌برداری از این پروژه بالاست، بعلاوه بیش‌تر گوگرد موجود در محصولات پتروشیمی به صورت 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 [۶،۸،۷]. اگرچه تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های شناخته شده گوگردزدا، ضمن جدا کردن گوگرد به پیوندهای کربن-کربن مولکول دای بنزوتایوفن حمله می‌کنند (از دای بنزوتایوفن به‌عنوان منبع کربن، گوگرد و انرژی استفاده می‌کنند)، تعداد کمی از این میکروارگانیسم‌ها مثل سویه رودوکوکوس، آگروباکتریوم، کورینه‌باکتریوم قادرند طی یک مسیر ویژه، گوگرد را از مولکول دای بنزوتایوفن جدا کرده و آن را به ۲- هیدروکسی‌بای‌فنیل تبدیل کنند، بدون آن‌که ساختمان ترکیبات قابل احتراق نفت آسیب ببیند و از ارزش سوختی نفت کاسته شود. روش گوگردزدایی بیولوژیک با کارایی بالا قادر به جداسازی گوگرد از ترکیبات هتروسیکلیک پلی‌آروماتیک می‌باشد که دشوارترین مرحله گوگردزدایی هیدروژنی است. این روش به دلیل ارزان بودن و شرایط ملایم‌تر تحت واکنش به‌عنوان یک جایگزین مناسب مورد توجه قرار گرفته است [۶،۴]. باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، یک

ارگانیسم کلیدی در پروسه گوگردزدایی بیولوژیک از DBT و مشتقات آن می‌باشد که توسط انستیتو تکنولوژی گاز و شرکت بیوسیستم‌های آمریکا در سال ۱۹۹۹ پتنت (تأیید) شده است. این باکتری قدرت اکسیداسیون DBT و تبدیل آن به ۲- هیدروکسی‌بی‌فنیل (2HBP) را دارد، که این ماده در محیط کشت بیش‌تر متابولیزه نمی‌شود. فنوتیپ سولفورزدایی این باکتری توسط ژن‌های اپرون dsz موجود بر روی پلاسمید کد می‌شود [۱۰،۹]. در سویه‌های مختلف رودوکوکوس مسیر سولفورزدایی (dsz) با کمک دو منواکسیژناز سیتوپلاسمی (dsz A, C) که به‌وسیله یک فلاوین ردوکتاز حمایت می‌شوند و یک دسولفیناز (dsz B) صورت می‌پذیرد. مسیر پیشنهادی برای دسولفوره کردن توسط این ارگانیسم، به‌نام مسیر 4S خوانده می‌شود [۱۱].

باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، شاخص‌ترین باکتری به‌عنوان یک سویه مدل در تحقیقات سولفورزدایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این باکتری سه ژن مسئول سولفورزدایی از DBT شامل dsz A, B, C بر روی یک پلاسمید خطی ۱۲۰ کیلو بازی قرار گرفته است. این پلاسمید سه ژن dsz A, B, C را در یک آرایش اپرونی به‌طول ۳/۸ کیلوبازی حمل می‌کند که مسئول متابولیسم DBT به ۲- هیدروکسی‌بی‌فنیل (2HBP) و سولفات می‌باشد. dsz C یک پروتئین به وزن ۴۵ kDa را کد می‌کند که به‌عنوان عضوی از خانواده اسپیل کوآنزیم A دهیدروژنازاها، واسطه اکسیداسیون ابتدایی DBT به DBT سولفون می‌باشد. این آنزیم به‌عنوان یک سولفید/سولفوکساید منواکسیژناز خوانده می‌شود که برای فعالیت خود نیاز به فلاوین منونوکلوئید (FMN) احیا شده دارد. dsz C (دی‌بنزوتیوفن منواکسیژناز) تبدیل متوالی



را کاتالیز می‌نماید. dszA یک پروتئین به وزن ۵۰ کیلودالتون را کد می‌کند. تبدیل DBT سولفون به سولفینات را همراه با مصرف FMNH₂ (به‌عنوان کوسوبسترا) با سرعتی ۵ تا ۱۰ برابر بیش‌تر از DSzC کاتالیز می‌کند. این آنزیم در سلول به‌صورت دایمر وجود دارد [۱۲]. dszB یک پروتئین

دی کلروکینون ۴- کلرامید) بافر 1x، TAE، تریپتون، Yeast extract agar، آگار معمولی و آگارز، که همگی از شرکت Merck خریداری شدند. دستگاه HPLC (C18, 250mm, 9.6mm) از دانشگاه امام حسین (ع)، آب مقطر و آب دیونیزه از مرکز تحقیقات ژنتیک، اتیدیوم بروماید از شرکت سیگما و سوکروز از شرکت Roche. آنتی بیوتیک‌ها شامل تتراسایکلین و کانامایسین به صورت پودر از شرکت بوهرینگر، انواع آنزیم‌های مورد استفاده شامل لیزوزیم، RNAase از شرکت Roche، آنزیم‌های محدودالتر EcoRI، EcoRV و HindIII از شرکت فرمنتاز و T4 DNA Ligase از شرکت سیناژن، مارکرهای وزن مولکولی II و III و مارکر پروتئینی از شرکت فرمنتاز تهیه گردید.

۳- پلاسمیدها، وکتورهای مورد استفاده شامل PVLT31 و PBSL118 می‌باشد.

۴- سویه‌های باکتریایی. در این تحقیق تعدادی از سویه‌های SOX3 DH5α E.coli، Rhodococcus، IGTS8 erythropolis، SOX4 CC118λpir E.coli، EGSOX Putida، Pesudomonas، aeruginosa EGSOX استفاده شده است.

۵- محیط‌ها و محلول‌های لازم جهت کشت باکتری.

- محیط Lauria Bertani (LB). شامل تریپتون ۱۰ گرم، NaCl ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم و آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر.

- محیط Basal Salt Medium (BSM)
 KH_2PO_4 ۲/۴۴ گرم، Na_2HPO_4 ۵/۵۷ گرم، NH_4Cl ۲ گرم، $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۰/۲ گرم، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۱ گرم، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۱ گرم و $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ۰/۰۰۴ گرم.

نمک‌های لازم بعد از توزین، به وسیله آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد و پس از تنظیم pH بر روی ۷/۲ به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید.

به وزن ۴۰ کیلوالتون را کد می‌کند. dsz B یک سولفینیک اسید هیدرولاز آروماتیک می‌باشد، که یک حمله نوکلئوفیلی به مولکول آب فعال شده بازی، بر روی گوگرد سولفینات انجام می‌دهد و باعث تشکیل 2HBP (۲- هیدروکسی بی‌فنیل) در یک واکنش غیرمعمول و محدود کننده سرعت در این مسیر می‌گردد. تولید سولفات معدنی و 2HBP به‌عنوان آخرین مرحله این مسیر است و اتم‌های اکسیژن شرکت کننده در این مسیر از اکسیژن مولکولی مشتق شده‌اند [۱۳].

به‌طور کلی هدف از تحقیق انجام شده، در وهله اول کلون کردن اپرون سولفورزدایی در باکتری اشریشیا کلی DH5α توسط وکتور PVLT31 و تأیید این کلون از طریق هضم آنزیمی و PCR و سپس بررسی فعالیت سولفورزدایی آن از طریق تست گیسیس ساده و استاندارد و دستگاه HPLC و در مرحله دوم مقایسه میزان فعالیت سولفورزدایی آن با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، سودوموناس پوتیدا EGSOX و اشریشیا کلی CC118λpir SOX4 که سویه‌های مهندسی شده حاوی اپرون SOX می‌باشند از طریق تست گیسیس ساده و استاندارد و دستگاه HPLC بود.

مواد و روش‌ها

۱- مواد شیمیایی، محلول‌های لازم و دستگاه‌ها. اسید کلریدریک، اسید استیک غلیظ، استات سدیم، اتیل استات، استات پتاسیم، استونیتریل، هیدروکسید سدیم، KH_2PO_4 ، K_2HPO_4 ، Na_2HPO_4 ، NH_4Cl ، CaCl_2 ، MgCl_2 ، FeCl_3 ، MnCl_2 ، اتانل، ایزوپروپانل، ایزوبوتانل، متانل، استن، کوماسی بلو، اکریل آمید و بیس اکریل آمید، کلرید لیتیم، فنل، کلروفورم، ایزوآمیل الکل، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، اتیلن‌دی‌آمین تتراستیک‌اسید (EDTA)، تریس اسیدی، تریس‌بازی، گلیسرول، گلوکز، گلایسین، آمونیوم پرسولفات، TEMED سوکروز، دی‌بنزوتیوفن (DBT)، دی‌هیدروکسی‌بی‌فنیل (2HBP)، معرف گیسیس (۶ و ۲

۶- رشد باکتری در محیط LB مایع. به منظور رشد

باکتری در محیط LB مایع، ابتدا باکتری *E.coli* cc118 λ pir در محیط LB-Km جامد کشت داده، سپس این پلیت در انکوباتور ۳۰ درجه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت یکی از تک کلنی‌های رشد کرده در این محیط برای انتقال به محیط LB مایع انتخاب (جهت استخراج پلاسمید SOX4) و بعد ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و به ازاء هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کانامایسین اضافه و تک کلنی انتخاب شده به این محیط منتقل گردید و در انکوباتور شیکردار در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ rpm قرار گرفت.

۷- استخراج پلاسمید به روش Large Scale. ابتدا

یک کشت بزرگ حاوی ۱۰۰-۲۰۰ ml باکتری در محیط LB به مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد. پلت حاصله به‌وسیله سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه به‌دست آمد و در ۴ ml محلول Plasmid Prep Mix که شامل mM Tris ۲۵، ۱۰ mM EDTA و ۱۵% W/V Sucrose، PH=۸ مجدداً حل گردید. نمونه به یک فالكون ۵۰ ml منتقل شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت، سپس ۸ ml از محلول ۱% SDS و ۰.۲N NaOH اضافه و مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد ۵ ml استات سدیم pH=۴/۶ ۳ M به نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط شدن به مدت چهار دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه سپس سانتریفیوژ (۵۰ دقیقه، ۲۱۰۰ rpm) و سوپرناتانت بین دو تیوب تقسیم گردید. به هر تیوب ۱۷ ml اتانل ۱۰۰٪ اضافه و DNA به‌وسیله انکوباسیون در ۲۰^o - به صورت اورنایت رسوب داده شد. نمونه مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید، سوپرناتانت خارج شده و رسوب با اتانل ۷۰٪ شسته و بر روی میز خشک شد. سپس پلت در ۳ ml بافر TE حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی میز قرار گرفت تا DNA کاملاً حل شود. ۱/۹ ml کلرید لیتیم ۸ M سرد یخی به نمونه اضافه و مخلوط گردید. سپس

به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. کلرید لیتیم باعث رسوب DNAی تک‌رشته‌ای می‌شود.

سوپرناتانت به یک تیوب تمیز حاوی ۵ ml ایزوپروپانل اضافه و در ۲۱۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این حالت یک پلت کوچک سفید در هر تیوب دیده شد. پلت مجدداً با اتانل ۷۰ درجه شسته و بعد از خشک شدن در ۵۰۰ μ l بافر TE حل شد و به آن ۵ μ l RnaseA اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (RT) انکوبه گردید.

در این مرحله نمونه ما به اندازه کافی خالص است، ولی می‌توان برای به‌دست آوردن خلوص بالاتر با افزودن ۳۳۰ μ l از مخلوط NaCl و PEG و سپس یک مرحله استخراج با فنل/کلروفرم یک نمونه با خلوص بالاتر به‌دست آورد.

۸- هضم آنزیمی (Digestion). دایجست به صورت

زیر انجام گرفت:

۱۵ میکرولیتر پلاسمید SOX4 به یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته شد و بر روی آن ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و یک میکرولیتر آب مقطر اضافه و سپس ۱ میکرولیتر آنزیم ECOR1 و ۱ میکرولیتر آنزیم Hind III ریخته شد، تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد، سپس در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت قرار گرفت و سپس به روی ژل برده شد.

۹- استخراج و تخلیص DNA از روی ژل آگارز.

برای به‌دست آوردن قطعات DNA حاوی اپرون سولفورزادی از داخل پلاسمید PESOX4، این پلاسمید بعد از بریده شدن با آنزیم‌های محدودالانر ECOR1-HindIII به مقدار زیاد (۲۰۰ میکرولیتر) و درست کردن چاهک‌های بزرگ نمونه‌ها به مقدار زیاد به چاهک‌ها لود شد و الکتروفورز گردید؛ سپس قطعه حاوی اپرون SOX در ناحیه ۳/۸ Kb از روی ژل با تیغ اسکالپل بریده شد و برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت Agarose gel DNA extraction صورت گرفت. به این ترتیب که قطعات ژل در داخل یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم از ژل، ۳۰۰ میکرولیتر

مولتی پل کلونینگ خود با آنزیم‌های ECOR1-HindIII بریده شد، در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به صورت اورنایت صورت پذیرفت (طبق دستور کیت کلونینگ مقدار ۰/۱۶۵ میکروگرم وکتور و ۰/۶۳ میکروگرم قطعه خالص شده به‌کار برده شد).

۱۲- تهیه سلول‌های مستعد (Competent cell).

۱- یک کلونی از باکتری‌های E.coli DH5α در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB بدون آنتی‌بیوتیک به صورت شبانه‌روزی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

۲- مقدار یک میلی‌لیتر از محیط کشت شماره یک به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB بدون آنتی‌بیوتیک انتقال داده شد، محیط مذکور به مدت ۲ تا ۳ ساعت در شیکر انکولاتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا میزان جذب آن در ۵۴۰ نانومتر به ۰/۴-۰/۵ برسد.

۳- نمونه‌ها به صورت دو تیوب ۲۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۴- رسوب به‌دست آمده در هر تیوب در ۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم (CaCl₂) ۱۰۰ mM کاملاً سرد، حل و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شد.

۵- نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

۶- رسوب به‌دست آمده هر تیوب در ۲ ml کلرید کلسیم ۱۰۰ mM کاملاً سرد حل شد.

۷- برای نگهداری سلول‌های کامپتنت در دمای ۷۰- به محلول شماره ۶، ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل افزوده و در مقادیر ۲۰۰ میکرولیتر داخل ویال‌ها ریخته و تا موقع کلونینگ نگهداری شد.

۱۳- ترانسفورمیشن (Transformation).

۱- مقدار ۱۰ میکرولیتر از DNA پلاسمیدی حاوی Insert مورد نظر به ۲۰۰ میکرولیتر سلول کامپتنت افزوده و به مدت ۰/۵ ساعت روی یخ قرار داده شد. در این حالت DNA پلاسمیدی به دیواره سلول میزبان متصل می‌شود.

(Binding buffer) اضافه و به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۰-۵۶ درجه قرار گرفت و هر دو یا سه دقیقه یک بار ورتکس شد تا زل کاملاً حل گردد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم زل آگارز به تیوب‌ها ریخته و ورتکس گردید. سپس وارد High pure filter tube شد و مجموعه به داخل تیوب ۱/۵ میلی‌لیتر وارد گردید (دقت شد که بیش‌تر از ۷۰۰ rpm میکرولیتر ریخته نشود)؛ بعد به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول، دور ریخته شد و به روی فیلتر تیوب‌ها ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (Washing buffer) اضافه شد. بعد باز هم به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و دوباره این‌کار انجام گرفت و فقط به جای ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر ریخته شد (این مرحله شستشو برای خالص‌سازی بیش‌تر صورت گرفت)؛ سپس محلول فیلتر شد و تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری دور ریخته و فیلتر تیوب‌ها به تیوب‌های تمیز دیگری قرار داده شد و این بار به روی آن ۵۰ میکرولیتر Elution Buffer ریخته شد و سپس تحت سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm قرار گرفت. تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تازه شامل DNA خالص شده است و سپس این DNA بر روی ژل آگارز برده شد.

۱۰- کلونینگ. قطعه ژنی ۳/۸ Kb بعد از استخراج و خالص‌سازی از روی ژل آگارز در سایت‌های ECOR1 و HindIII، که در مولتی‌پل کلونینگ سایت پلاسمید PVL31 قرار دارند کلون شد. علت انتخاب این پلاسمید این است که دارای پروموتور قوی هیبرید Tac بوده و در طیف وسیعی از باکتری‌ها قابل عملکرد می‌باشد. کلون حاصله PESOX3 نام‌گذاری شد. این پلاسمید مشتق از لایگیشن قطعه اپرون سولفورزدایی در PVL31 می‌باشد و این پلاسمید به صورت آزاد درون سلول تکثیر می‌یابد.

۱۱- مرحله الحاق (Ligation). مرحله الحاق با اضافه کردن ۵ واحد آنزیم T4 DNA ligase به هم‌راه بافر مربوطه آن به محلول حاوی پلاسمید PVL31 که قبلاً در

5' AAGCTTCTATCGGTGGCGATTGAGGC 3'
 پرایمر برگشت
 در این حالت سایت برش با EcoRI در ابتدای پرایمر
 رفت که از ابتدای ژن A شروع به خواندن می‌کند و سایت
 برش با HindIII در ابتدای پرایمر برگشت که از انتهای ژن B
 شروع به خواندن می‌کند، قرار داده شد.

ترکیب واکنش PCR شامل:

غلظت نهایی	حجم	
۱x	۱۰ul	10x PCR buffer
۰/۲mM each	۲ul	10mM dNTP mix
۱/۵m M	۳ul	50mM MgCl ₂
۰/۵uM	۱ul	Primer 1(10uM)
۰/۵uM	۱ul	Primer 1(10uM)
۰/۵uM	۱ul	Primer2 (10uM)
۲۵unit per 10 ul	۱ul	Tag DNA polymerase
۱ul که در انتها با ۸۰ μl آب مقطر به حجم ۱۰۰ μl رسانده شد.		Templet DNA

مرحله آمپلی فیکاسیون. تکثیر قطعات نوکلئوتیدی با
 استفاده از دستگاه Corbett Research و مطابق برنامه زیر
 صورت پذیرفت:

الف) دناتوراسیون آغازین که با قرار دادن نمونه‌ها در
 ۹۴^{oC} به مدت ۵ دقیقه انجام شد. ب) مرحله تکثیر که در آن
 سه مرحله Denaturation، Annealing و Extention به
 تعداد سی سیکل تکرار شد. در این تحقیق دناتوراسیون
 به مدت یک دقیقه در ۹۴^{oC}، جفت شدن پرایمرها به مدت یک
 دقیقه در ۶۸^{oC} و مرحله طویل شدن به مدت ۳ دقیقه در ۷۲^{oC}
 صورت پذیرفت. ج) پلیمریزاسیون نهایی که به مدت ۷ دقیقه
 در ۷۲^{oC} صورت گرفت.

۱۶- تست‌های بیوشیمیایی.

تست گیس کیفی: برای تأیید فعالیت پروتئین‌های DSZ
 A, B, C در مسیر ۴S در سویه نوترکیب اشریشیا کلی
 DH5α SOX3 و مقایسه آن با باکتری‌های رودوکوکوس
 اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آروژینوزا EGSOX،
 سودوموناس پوتیدا EGSOX و اشریشیا کلی SOX4

۲- نمونه به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد
 قرار گرفت و بلافاصله روی یخ انتقال داده شد (به مدت ۳-۲
 دقیقه). در این جا به وسیله ایجاد شوک حرارتی در دمای ۴۲
 درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱/۵ دقیقه منافذ موجود در دیواره
 سلولی میزبان باز شد و پلاسمید به داخل سلول منتقل گردید.
 ۳- سپس به اندازه ۶۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB بدون
 آنتی‌بیوتیک به نمونه اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در شیکر
 انکوباتور (با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. در این
 حالت سلول‌ها فرصت ترمیم و بازآرایی پیدا می‌کنند.

۴- نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ
 شدند.

۵- رسوب با اندکی از محلول رویی پیت شد و روی سه
 پلیت LB-Tet، PTG و XGal کشت داده شد و به صورت
 یک شبانه‌روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

۴- غربال‌گری یا Screening. بعد از یک شبانه‌روز
 کشت، تعداد زیادی کلنی سفید و تعدادی کلنی آبی بر روی
 سطح پلیت‌ها ظاهر شد. کلنی‌های سفید میزبان‌هایی هستند که
 پلاسمید حاوی Insert مورد نظر را دریافت کرده‌اند. چند تا
 از کلنی‌های سفید انتخاب شدند و سپس در محیط LB-Tet
 کشت داده شدند و بعد از یک شب انکوباسیون، ۳ میلی‌لیتر از
 محیط کشت برداشته و تخلیص پلاسمید شدند و سپس با
 کمک آنزیم‌های محدودالایثر کلونی‌های مذکور برش داده شدند
 و از لحاظ وجود ژن مورد نظر بررسی قرار گرفتند.

۱۵- روش PCR. برای روش PCR از قطعه ژنی
 مربوط به اپرون SOX (dsz A, B) از سویه SOX3
 DH5α، واکنش PCR انجام شد. در این آزمایش از پلاسمید
 SOX4 به عنوان کنترل مثبت و از DH5α فاقد اپرون
 سولفورزدایی به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

طراحی پرایمر: پرایمرهای مناسب با توجه به سکانس
 باکتری رودوکوکوس ارتروپولیس IGTS8 به صورت زیر
 طراحی شدند:

5' GAATTCGCGATGACTCAACAACGAC 3'
 پرایمر رفت

به‌عنوان منبع کربن، تحت آنتی‌بیوتیک مناسب انتقال داده شد. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه با ۲۰۰ rpm انکوبه شد. اولین نمونه‌برداری بعد از ۱۲ ساعت صورت پذیرفت و سپس بعد از هر ۱۲ ساعت یک بار نمونه‌برداری شد؛ به این ترتیب که:

۱- هر دفعه میزان یک میلی‌لیتر از هر نمونه برداشته شد و بعد از سانتریفیوژ سوپرناتانت جدا و به آن ۱۰ میکرولیتر معرف گیبس اضافه شد، سپس ویال‌ها به مدت ۳ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و جذب آن‌ها خوانده شد. تعیین میزان کمی تولید 2HBP و در نتیجه فعال بودن مسیر ۴S در این سویه‌ها با استفاده از خواندن جذب نوری نمونه‌ها و مقایسه آن با منحنی استاندارد صورت پذیرفت. در طی این پروسه دقت شد که با توجه به این‌که فعالیت آنزیم‌های موجود در مراحل ۴S برای سولفورزدایی در هر مرحله PH محیط را کاهش می‌دهند و از طرفی چون تست گیبس در PH=۸ جواب مثبت می‌دهد، لذا برای بالا بردن PH نمونه‌ها بعد از نمونه‌برداری از کربنات سدیم (Na_2CO_3) یک مولار استفاده شد.

۲- در هر مرحله نمونه‌برداری ۲ میلی‌لیتر از نمونه‌ها برداشته شد و نمونه‌ها توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال (HCl) (1N با PH=۲ تنظیم گردید و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای اندازه‌گیری مقدار تولید 2HBP به دستگاه HPLC تزریق گردد.

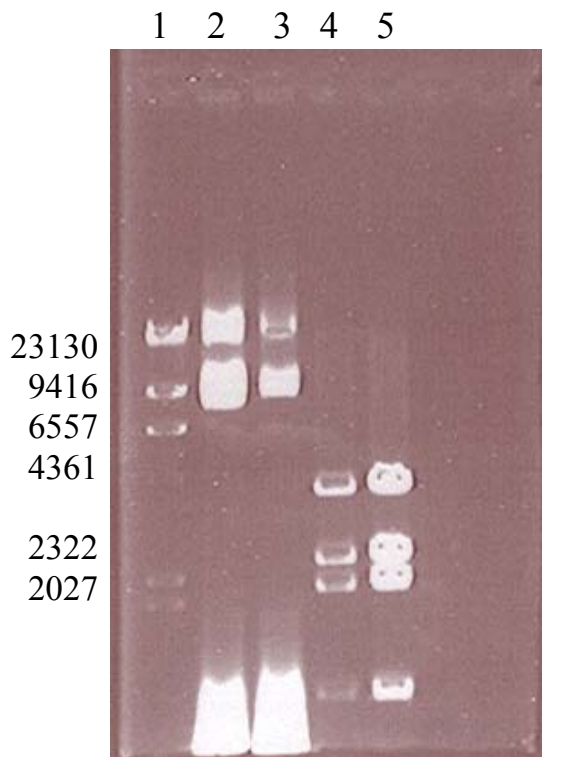
منحنی استاندارد: به منظور اندازه‌گیری میزان تولید 2HBP در محیط اقدام به تهیه منحنی استاندارد شد. به این ترتیب که میزان ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکرومول از 2HBP در محیط BSM تهیه گردید. سپس به هریک از غلظت‌ها ۱۰ μl معرف گیبس اضافه شد و سه ساعت در 30°C قرار گرفت. طول موج هر یک از استانداردها در ۶۰۰ nm قرائت شد و منحنی جذب بر حسب غلظت ماده استاندارد به‌دست آمد.

تهیه نمونه برای تزریق HPLC: نمونه‌هایی را که قبلاً در هنگام گرفتن تست گیبس با PH=۲ تنظیم شده بود، به هم

CC118 λ pir و سویه اشیشیا کلی DH5 α منفی به‌عنوان کنترل منفی، این تست گذاشته شد. به این صورت که ابتدا باکتری‌ها به مدت یک شبانه‌روز در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک مناسب در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در RPM ۲۰۰ رشد داده شدند و بعد از رشد ۱۰ میلی‌لیتر از این محیط برداشته و سانتریفیوژ شد، پلت باکتریایی به‌دست آمده را یک‌بار با آب دیونیزه و یک‌بار با محیط کشت BSM شسته شد و پلیت به‌دست آمده را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BSM که حاوی ۳۰۰ ppm DBT، به‌عنوان منبع گوگرد، ۲۰۰ میکرولیتر گلیسرول به‌عنوان منبع کربن و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک مناسب برای هر سویه منتقل و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در ۲۰۰ rpm قرار داده شد. هر روز یک میلی‌لیتر از محیط برداشته و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و به محلول رویی ۱۰ میکرولیتر از معرف گیبس اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید، ظهور رنگ آبی در نمونه‌ها نشان دهنده حضور 2HBP و مثبت بودن تست گیبس است.

تست گیبس کمی (استاندارد). برای تعیین میزان فعالیت اپرون سولفورزدایی در باکتری نوترکیب اشیشیا کلی DH5 α SOX3 و مقایسه آن با باکتری‌های رودوکوکوس ایتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، سودوموناس پوتیدا EGSOX و اشیشیا کلی SOX4 CC118 λ pir که سویه‌های مهندسی شده حاوی اپرون SOX می‌باشند، تست گیبس استاندارد انجام شد. برای این کار، اول نمونه‌های فوق در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BSM تحت آنتی‌بیوتیک مناسب رشد داده شدند، بعد از ۵ روز جذب آن‌ها بین ۱/۵-۱ رسید. طبق روش اولدیلد و همکاران مقدار نمونه انتخاب شده باید طوری باشد که در نهایت همه‌شان (OD=1) را داشته باشند و به‌خاطر همین نمونه‌های رشد کرده با محیط BSM استریل رقیق شد تا نمونه‌ها با OD مساوی انتخاب شوند و بعد به ۴۰۰ میلی‌لیتر محیط BSM که حاوی ۱۰۰ ppm DBT به‌عنوان منبع گوگرد و ۲۰۰ ppm گلیسرول

کلونینگ (MCS) وکتور PVL31 که اندازه‌اش ۱۰ Kb است (در سایت‌های ECOR1 و HindIII کلون گردید) و پلاسمید حاصله، PESOX4 نام‌گذاری شد. سپس این پلاسمید به داخل سلول *E. coli* DH5 α مستعد ترانسفورم و بر روی پلیت کشت داده شد. بعد از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های رشد کرده مورد بررسی قرار گرفتند و بعد از کشت مجدد کلنی‌های سفید در محیط LB پلاسمید آن‌ها استخراج شد (شکل ۳).



شکل ۱. هضم آنزیمی SOX4 λ pir با CC118 با HindIII-ECOR1

خط ۱) مارکر وزن مولکولی II

خطوط ۲ و ۳) SOX4 uncut

خطوط ۴ و ۵) SOX4 digeste

باند بریده شده اولی: وکتور PBSL118(4.7 kb) دایجست با

HindIII-ECOR1

باند بریده شده دومی: قطعه SOX(3.8kb) دایجست با

ECOR1

باند بریده شده سومی: قطعه بریده شده با آنزیم

HindIII-ECOR1
باند بریده شده چهارمی: قطعه بریده شده با آنزیم

HindIII-HindIII

حجم نمونه‌ها اتیل استات ریخته و دیده شد که محیط، دو فازی شد (فاز آبی و فاز آبی یا فاز محیط) و سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس گردید تا 2HBP که در فاز محیط است به داخل فاز آبی برود، سپس ۲۴ ساعت در یخچال گذاشته شد. بعد از ۲۴ ساعت فاز بالایی توسط پیپت کشیده و به لوله‌های شیشه‌ای ریخته شد. بعد نمونه‌ها در زیر هود قرار داده شد تا اتیل استات آن‌ها بپرد و 2HBP آن باقی بماند (سه بار این کار انجام شد) و بعد از این که اتیل استات نمونه‌ها تبخیر گردید، 2HBP در ته لوله‌ها به صورت پودر نازک دیده شد، به روی آن ۱ میلی‌لیتر استونیتریل ۵۰٪ و TFA (تری‌فلورواستیک اسید) ۱٪ ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه ورتکس گردید تا 2HBP کاملاً در محلول استونیتریل حل شود و بعد به مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه به HPLC تزریق گردید. مشخصات ستون HPLC:

- مدل CECIL 1100, England ستون (C18)، با

سایز ذرات ۱۰ μ M (۲۵۰ mm و ۹/۶ mm)

- جذب: ۲۸۰ نانومتر

- Flow rate: ۰/۹ mL/min

- Mobile phase: استونیتریل ۵۰٪ و TFA

(تری‌فلورواستیک اسید) ۱٪

نتایج

شناسایی و کلونینگ. باکتری *E. coli* CC118 λ pir

که حاوی پلاسمید SOX4 می‌باشد، یک سویه مهندسی شده است که در آن اپرون سولفورزدایی از باکتری رودوکوکوس IGTS8 تحت کنترل پروموتور tac کلون شده است. پلاسمید SOX4 بعد از خالص‌سازی به وسیله آنزیم‌های محدودالتر ECOR1-HindIII برش داده و بر روی ژل آگارز ۱٪ برده شد (شکل ۱). سپس اپرون سولفورزدایی در این پلاسمید که یک قطعه ۳/۸ Kb را تشکیل می‌دهد از روی ژل بریده شد و با استفاده از کیت Agarose gel DNA extraction جداسازی و تخلیص گردید (شکل ۲). سپس این قطعه بعد از استخراج و خالص‌سازی از روی ژل آگارز در سایت مولتی‌پل

نتایج تست‌های بیوشیمیایی.

نتایج تست گیبس کیفی: نتایج به دست آمده از روش ۱۶ در عکس ۶ دیده می‌شود. به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر سولفورزدایی ۴S در سویه نوترکیب و مقایسه آن با سویه‌های مورد نظر از تست گیبس کیفی استفاده شد. این تست بر روی سویه نوترکیب اشریشیا کلی DH5α SOX3 و مقایسه آن با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، سودوموناس پوتیدا EGSOX و اشریشیا کلی CC118λpir SOX4 انجام گرفت که ظاهر شدن رنگ آبی، نشان‌دهنده مصرف DBT و در نتیجه تولید 2HBP در محیط می‌باشد.

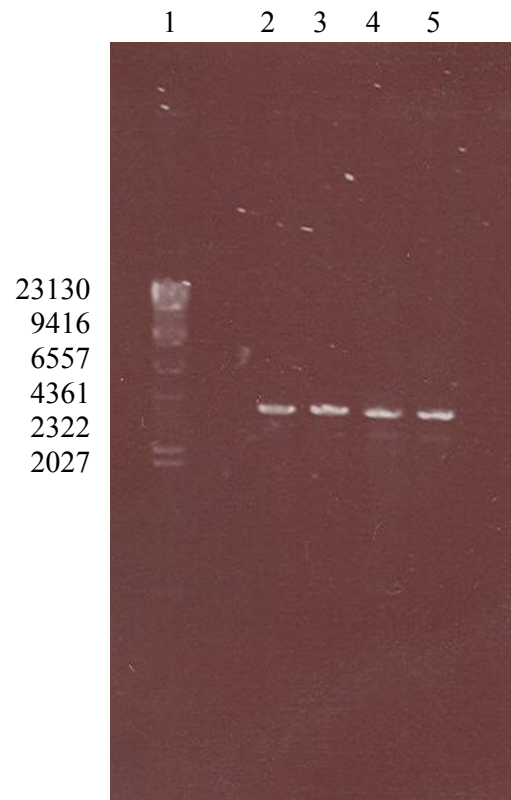
جدول ۱. جذب به دست آمده نمونه‌های استاندارد در ۶۰۰ نانومتر

استاندارد	غلظت (میکرومولار)	جذب (OD=600nm)
۰	۰	۰
۱	۱	۰/۲۵۴۳
۳	۳	۰/۴۴۳۰
۵	۵	۰/۸۲۲۴
۷	۷	۱/۹۹۵

نتایج تست گیبس کمی (استاندارد): برای تعیین میزان فعالیت سولفورزدایی از DBT در باکتری نوترکیب اشریشیا کلی DH5α SOX3 و مقایسه آن با سایر سویه‌ها آزمایش تست گیبس استاندارد طبق روش ۱۶ (که توسط اولدفیلد و همکاران به کار رفت) انجام شد. بعد از کشت اولیه نمونه‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط BSM و مساوی شدن جذب (OD=1) نمونه‌ها و انتقال به محیط بزرگ‌تر (۴۰۰ میلی‌لیتری) BSM که حاوی ۱۰۰ ppm DBT به‌عنوان منبع گوگرد و ۲۰۰۰ ppm گلیسرول به‌عنوان منبع کربن، تحت آنتی‌بیوتیک مناسب، قرار گرفت؛ به این ترتیب که نمونه‌برداری هر ۱۲ ساعت یک بار انجام شد و بعد از سانتریفیوژ کردن و افزودن معرف گیبس، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس جذب آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ nm خوانده شد.

برای تأیید این‌که کلنی‌های رشد کرده قطعه مورد نظر را دریافت کرده‌اند، بعد از استخراج پلاسمید حاصله برش آنزیمی صورت گرفت (شکل ۴).

تکنیک PCR. این تکنیک برای تأیید کلونینگ، به کار برده شد. با توجه به طول زیاد اپرون سولفورزدایی (۳/۸ kb)، پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های B, dszA, که حدود ۲/۵ kb طول دارند، طراحی شد. سایت برش با آنزیم EcoRI در سر 5' پرایمر رفت و سایت برش با آنزیم HindIII در سر 5' پرایمر برگشت قرار گرفت.



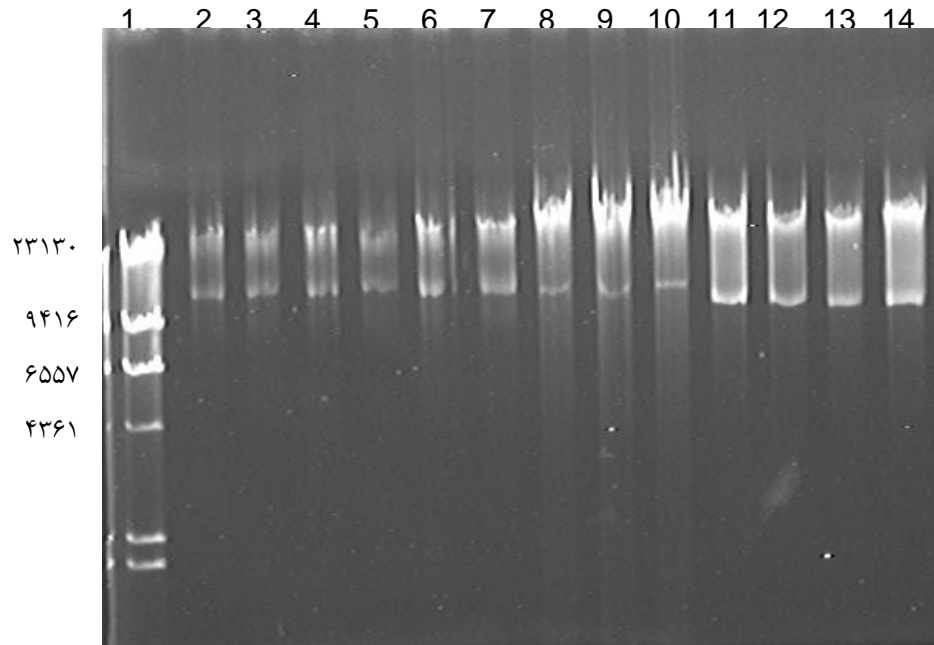
شکل ۲. استخراج و تخلیص قطعه ۳/۸ Kb

خط ۱: مارکر وزن مولکولی II

خطوط ۲، ۳، ۴ و ۵: قطعه ۳/۸ Kb استخراج و تخلیص شده از ژل

به‌وسیله Agarose gel DNA extraction

بعد از بهینه‌سازی برنامه PCR ژن‌های A و B تکثیر شد. و برای تأیید PCR از نمونه CC118 SOX4 به‌عنوان کنترل مثبت (باند‌های ۷ و ۸ از شکل ۵) و از DH5α فاقد اپرون سولفورزدایی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (خطوط ۵ و ۶ از شکل ۵).



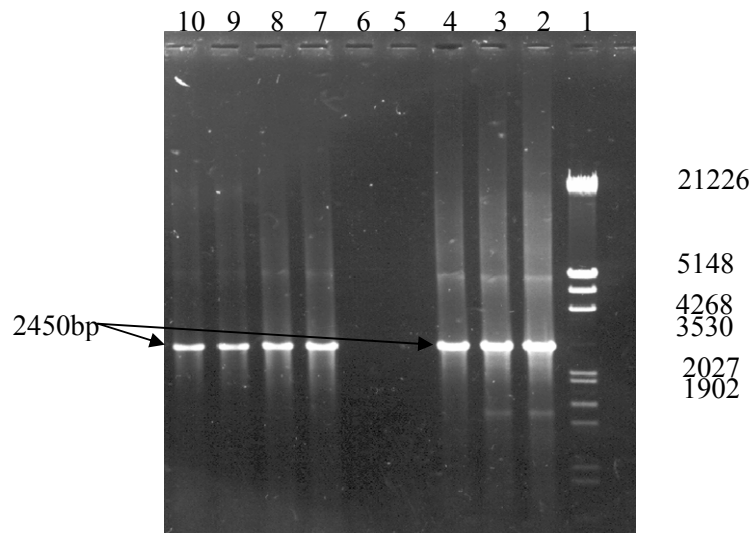
شکل ۳. پلاسمید SOX3 به دست آمده از سویه E.coli DH5α بعد از انتقال از CC118λpirSOX4

(۱) مارکر وزن مولکولی II

(۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷) کنترل مثبت SOX4 از باکتری CC118λpirSOX4

(۸ الی ۱۴) پلاسمید SOX3 به دست آمده از سویه E.coli DH5α بعد از انتقال از CC118λpirSOX4 به DH5α

(خالص سازی به روش Large scale)



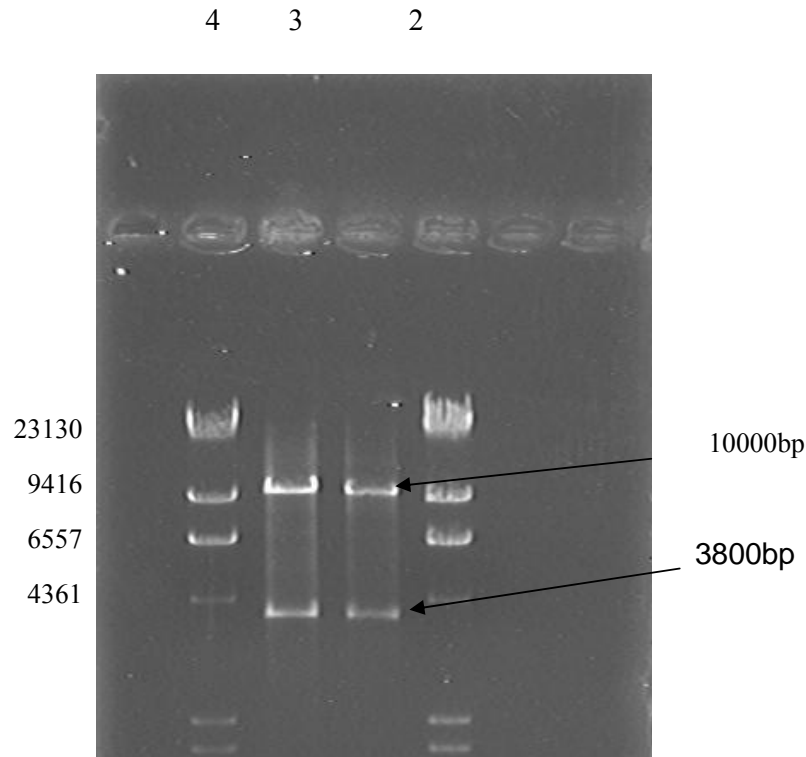
شکل ۴. تأیید صحت کلونینگ با استفاده از برش آنزیمی پلاسمید SOX3 بعد از برش با آنزیم‌های محدودالانتر Hind III و ECOR I.

(۱ و ۴) مارکر وزن مولکولی II

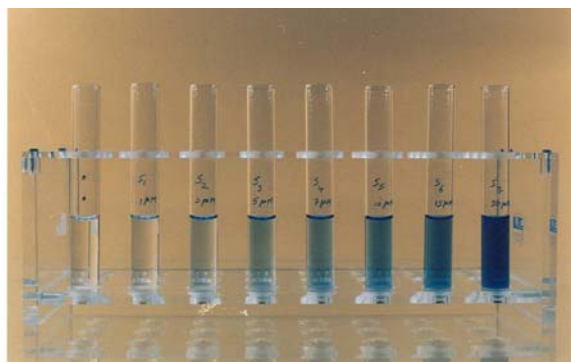
(۲ و ۳) DNA پلاسمیدی بریده شده

باند بالایی وکتور PVL31 (10kb)

باند پایینی قطعه بریده شده اوپرون سولفورزدایی (3.8kb)



شکل ۵. تکثیر قطعات ژنی (dsz A, B) با استفاده از PCR
 خطوط ۱، ۲، ۳، ۴ قطعات ژن AB به دست آمده از E.coli DH5α SOX3
 خطوط ۵ و ۶ فاقد اپرون سولفورزدایی به عنوان کنترل منفی
 خطوط ۷، ۸، ۹، ۱۰ قطعات ژن AB به دست آمده از PE SOX4 به عنوان کنترل مثبت
 خط ۱) مارکر وزن مولکولی III



شکل ۶. نتایج تست گیسب کیفی از چپ به راست: رودوکوکوس
 اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آنروژینوزا EGSOX، اشیریشیا کلی
 CC118λpi SOX4، اشیریشیا کلی DH5α SOX3، سودوموناس پوتیدا
 EGSOX و اشیریشیا کلی - DH5α

برای به دست آوردن جذب بر حسب غلظت ماده تولید شده اقدام به تهیه منحنی استاندارد شد. به این ترتیب که میزان ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکرومول از 2HBP در محیط BSM تهیه گردید؛ سپس به هر یک از غلظت‌ها ۱۰ μl معرف گیسب اضافه شد (شکل ۷) و سه ساعت در ۳۰°C قرار گرفت. طول موج هر یک از استانداردها در ۶۰۰ nm قرائت شد و منحنی جذب بر حسب غلظت ماده استاندارد به دست آمد (جدول ۱)؛ سپس با استفاده از منحنی استاندارد و جذب به دست آمده در تست گیسب، میزان تولید 2HBP در باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه یک منحنی بر اساس میزان تولید 2HBP بر حسب میکرومولار در واحد زمان رسم گردید و منحنی‌های مختلف با هم مقایسه شدند (نمودار ۱).

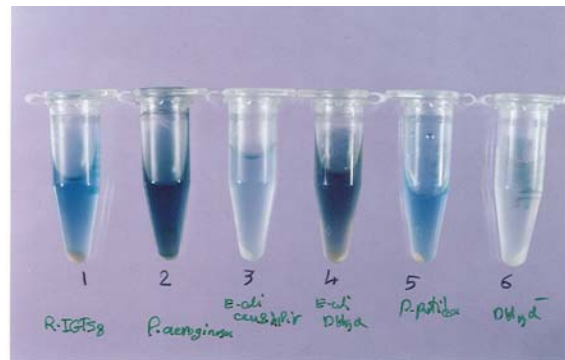
نتایج تزریق نمونه‌ها به HPLC: نمونه‌ها بعد از آماده شدن به مقدار ۵۰ میکرولیتر به HPLC تزریق شد. برای هر نمونه یک منحنی بر اساس میزان تولید 2HBP بر حسب ppm در واحد زمان رسم گردید و منحنی‌های مختلف با هم مقایسه شدند (نمودار ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

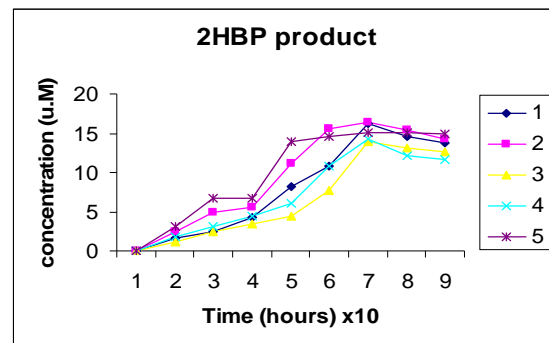
آزاد سازی اکسیدهای سولفور بعد از احتراق سوخت‌های فسیلی یک مسأله مهم زیست محیطی است. این مسأله یکی از علل مهم آلودگی هواست و بعلاوه باعث ایجاد باران‌های اسیدی می‌گردد. از طرف دیگر وجود گوگرد در ترکیبات نفتی باعث ایجاد خوردگی در وسایل تولید، پالایش و انتقال مواد نفتی و همچنین باعث غیرفعال شدن کاتالیست‌ها می‌شود. به همین دلیل سران تعدادی از کشورهای صنعتی شامل اسکانندیناوی، اروپای غربی، آمریکا و ژاپن در طی نشست‌های سال ۱۹۹۴ قانونی را به تصویب رساندند که بر طبق آن لازم است به‌طور پیش‌رونده درصد گوگرد ترکیبات پتروشیمی کاهش یابد [۱]. از طرف دیگر از آنجایی که میزان ذخایر نفتی با محتوای گوگرد کم، رو به اتمام است و اکثر نفت استخراج شده دارای محتوی گوگرد بالاست، اهمیت این مسأله بیش‌تر آشکار می‌شود.

روش رایج برای گوگردزدایی از ترکیبات نفتی، هیدروفسولفوریزاسیون (HDS) می‌باشد. هیدروفسولفوریزاسیون تحت فشار بالا (۳۰۰-۱۵۰ Ib/in²) و دمای بالا (۴۵۵-۲۹۰ °C) و استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزور فلزی برای تبدیل گوگرد موجود در ترکیبات نفتی به سولفید هیدروژن (H₂S) صورت می‌پذیرد.

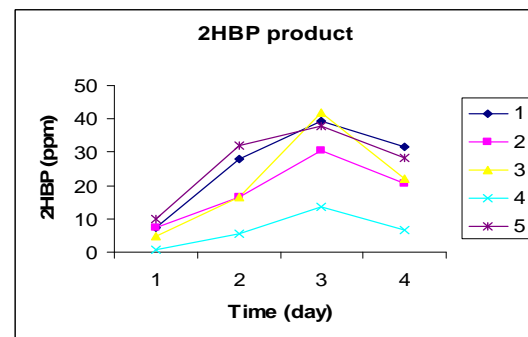
ارزش سرمایه‌گذاری و بهره‌برداری از این پروژه بالاست، بعلاوه بیش‌تر گوگرد موجود در محصولات پتروشیمی به‌صورت ترکیبات آلی هتروسیکل می‌باشد، که به این روش مقاوم است. بنابراین یک روش مؤثر در مقایسه با روش شیمیایی مورد نیاز است.



شکل ۷. نمونه‌های استاندارد میزان ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکرومول از 2HBP در محیط BSM تهیه شد، سپس به هر نمونه 50ul معرف گیبس اضافه و سپس جذب آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ nm خوانده شد.



نمودار ۱. منحنی عمل‌کرد باکتری‌های ۱- رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، ۲- سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، ۳- سودوموناس پوتیدا EGSOX، ۴- اشیریشیا کلی CC118λpi SOX4، ۵- اشیریشیا کلی DH5α SOX3 برای تولید 2HBP برحسب میکرومولار در واحد زمان نشان داده شد



نمودار ۲. مقایسه منحنی‌های 2HBP به‌دست آمده از سویه‌های ۱- سویه نوترکیب اشیریشیا کلی DH5α SOX3، ۲- سویه رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، ۳- سویه سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، ۴- سویه سودوموناس پوتیدا EGSOX و ۵- سویه اشیریشیا کلی CC118λpir همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود تقریباً با کتری مهندسی شده اشیریشیا کلی DH5α SOX3، مثل سودوموناس آئروژینوزا EGSOX فعالیت مطلوبی در جهت تولید 2HBP دارد.

از آن جایی 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 CO₂ و بیومس تبدیل کنند. اما این روش ارزش سوخت فسیلی را کاهش می‌دهد.

چندین سویه از رودوکوکوس اریتروپولیس پیدا شده‌اند که قادرند سولفور را بدون تخریب حلقه‌های آلی از DBT جدا نمایند که شامل سویه‌های IGTS8, D-1, SY1, N1-36, N1-43 و H-2 می‌باشند. احتمالاً این سویه‌ها روابط کاملاً یک‌سان یا خیلی شبیه به هم دارند و با یک روش یک‌سان سولفورزدایی می‌کنند. سویه دیگری به‌طور تجربی از آنتروباکتر شناسایی شده که قادر است DBT را به ۲- هیدروکسی بی‌فیل تبدیل نماید.

باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، یکی از اولین سویه‌هایی است که مطالعات گوگردزدایی در مورد آن به انجام رسیده و ژن‌های گوگردزا در آن شناسایی، کلون و تعیین سکانس شده‌اند و به‌عنوان یک سویه مدل در مطالعات سولفورزدایی مطرح است.

در باکتری رودوکوکوس IGTS8 سه ژن مسئول سولفورزدایی از DBT شامل dsz A, B, C بر روی یک پلاسمید خطی ۱۲۰ کیلوبازی قرار گرفته است و سه آنزیم dszA, B, C را کد می‌کند. آنزیم Dsz C دو واکنش منواکسیژناز متوالی را کاتالیز می‌کند، که DBT را به DBT سولفون تبدیل می‌نماید. Dsz A یک فلاوین منواکسیژناز ثانویه است و Dsz B یک دسولفیناز می‌باشد که مرحله محدودکننده سرعت را در این مسیر کاتالیز می‌کند. این واکنش شامل تبدیل DBT سولفون به ۲-هیدروکسی بی‌فیل (2HBP) و سولفیت می‌باشد. هر دو منواکسیژناز Dsz A, C به NADPH (نوکلتوتید آدنوزین دی‌فسفات) برای ایجاد موازنه نیاز دارند.

از آن‌جا که کشور ما یک سرزمین نفت‌خیز و دارای ذخایر فراوان نفت و گاز می‌باشد، خودکفایی در زمینه پالایش و فرآوری مواد نفتی یک ضرورت اساسی می‌باشد. یکی از مهم‌ترین مسایل پالایش مواد نفتی، حذف گوگرد از این ترکیبات می‌باشد و لازم است ما نیز هم‌زمان با تکنولوژی روز دنیا در این زمینه گام برداریم. یکی از مهم‌ترین تکنولوژی‌هایی که در چند سال اخیر در دنیا بسیار توسعه یافته، روش حذف بیوکاتالیستی گوگرد (BDS) می‌باشد. در این زمینه تا کنون سویه‌های مختلفی مطالعه شده‌اند و با طراحی سویه‌های ریکامیننت، جواز استفاده تجاری به‌دست آورده‌اند. در این شرایط استفاده از سویه‌های بومی دارای مزیت نسبی فراوان می‌باشد.

در این تحقیق ابتدا اپرون سولفورزدایی (dszA,B,C) از طریق یک پلاسمید وسیع الطیف (PVL31) تحت کنترل پروموتور tac به سویه E.coli DH5 α کلون شد، که این کلونینگ به‌وسیله برش آنزیمی و PCR و سپس توانایی گوگردزدایی آن در محیط BSM تأیید شد. با استفاده از تست دسترسی زیستی گوگرد در محیط BSM، بدون منبع سولفات، و تست گیبس کیفی و کمی و گراف‌های به‌دست آمده از HPLC روش‌های بسیار مهمی برای تأیید بیان ژن‌های گوگردزدایی و بررسی توانایی باکتری در استفاده از DBT به‌عنوان منبع گوگرد است. نتایج این آزمون با گزارش Gallardo و همکارانش در سال ۱۹۹۷ و Li و همکارانش در سال ۲۰۰۵ مطابق بود.

کار دیگر در این تحقیق مقایسه فعالیت سولفورزدایی باکتری‌هایی شامل اشیریشیا کلی SOX3 DH5 α با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX4، سودوموناس پوتیدا EGSOX4 و اشیریشیا کلی CC118 λ pir SOX4 که سویه‌های مهندسی شده حاوی اپرون SOX می‌باشند، با استفاده از تست گیبس ساده و استاندارد و مهم‌تر از آن‌ها دستگاه HPLC است؛ که نشان داده شد، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX4 و

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و دانشگاه امام حسین (ع) حمایت شده است.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر جمشید راهب عضو هیأت علمی مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و دکتر میرلطیف موسوی از دانشگاه امام حسین (ع) به‌خاطر همکاری‌های لازم قدردانی می‌شود.

منابع

- [1] Adams MW, Kelly RM. Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnol*, 1998; 16(8):329-32.
- [2] Beil S, Kehrl H, James P, Staudenmann W, Cook AM, Leisinger T, et al. Purification and characterization of the arylsulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (atsA). *Eur J Biochem*, 1995; 229(2):385-94.
- [3] 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 Environ Microbiol*, 2002; 68(5):2337-43.
- [4] Ishihara A, Kabe T. Deep desulfurization of light oil. 3. Effects of solvents on hydrodesulfurization of dibenzothiophene. *Ind Eng Chem Res*, 1993; 32(4):753-5.
- [5] Hummerjohann J, Kuttel E, Quadroni M, Ragaller J, Leisinger T, Kertesz MA. Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: role of cysteine biosynthetic intermediates. *Microbiology*, 1998; 144 (Pt 5):1375-86.
- [6] Han AA, Wang RF, Cao WW, Doerge DR, Wennerstrom D, Cerniglia CE. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(8):3577-85.
- [7] Bressler, D. C. and Fedorak P. M. (2001) "Purification, stability, and mineralization of 3-Hydroxy-2-Formylbenzothiophene, a metabolite of dibenzothiophene". *Appl. Envir. Microbiol.* 67: 821-826.
- [8] Izumi Y, Ohshiro T, Ogino H, Hine Y, Shimaio M. Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol*, 1994; 60(1):223-226.
- [9] Ohshiro T, Hirata T, Izumi, Y. Microbial Desulfurization of Di-benzothiophene in the Presence of Hydrocarbon," *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 1995; 44:249.
- [10] Ohshiro T, Izumi Y. Purification, characterization and crystallization of enzymes for dibenzothiophene desulfurization. *Bioseparation*, 2000; 9(3):185-8.
- [11] Bos P, Kuenen JG. Microbial treatment of coal. In: *Microbial mineral recovery*. Ehrlich HL, Brierley CL, eds. 1st ed. New York: McGraw-Hill, 1990. p.343-77.
- [12] Ohshiro T, Hirata T, Hashimoto I, Izumi Y. Characterization of dibenzothiophene desulfurization reaction by whole cells of *Rhodococcus* H-2 in the presence of hydrocarbon. *J Ferment Bioeng*, 1996; 82(6):610-2.
- [13] Gallagher JR, Olson ES, Stanley DC. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiol Lett*, 1993; 107(1):31-5.

اشریشیا کلی SOX3 DH5 α ، بیش‌تر از بقیه باکتری‌ها توانایی سولفورزدایی را دارند.

مطابق اطلاعات داده شده توسط Denis-Larose و همکاران (۱۹۹۷)، اپرون سولفورزدایی در اکثر سویه‌های رودوکوکوس یک مسیر حفظ شده را نشان می‌دهد که دلالت بر اهمیت آنزیم‌های تولید شده توسط این اپرون در فرایند گوگردزایی ترکیبات نفتی است.

برای به‌دست آوردن یک سویه صنعتی لازم است این اپرون‌ها تحت یک پروموتور قوی قرار بگیرند و در یک باکتری که در نفت به راحتی رشد می‌کند مثل سودوموناس‌ها و رودوکوکوس‌ها استفاده کرد. در این حالت می‌توان بیان این اپرون را در شرایط مختلف بررسی کرد و شرایط ایتیم را به‌دست آورد و در مرحله بعد میزان بیان و فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر ۴S در شرایط کشت انبوه و در محیط فرماتور بررسی خواهد شد و شرایط برای استفاده صنعتی از این سویه‌ها فراهم خواهد گردید. ۲-هیدروکسی‌بای‌فیل (2HBP) به‌عنوان محصول نهایی در محیط تجمع یافته که تأیید حضور آن در محیط کشت با استفاده از تست گیسی کیفی و ظهور رنگ آبی مشخص شد که با نتایج آزمایشات Oldfield در سال ۱۹۹۷ مطابق است؛ اما به دلیل این‌که معرف گیسی با هر ماده آروماتیک هیدروکسیل‌داری واکنش داده و رنگ آبی ظاهر می‌شود، لذا برای تأیید تولید 2HBP در محیط برای سویه‌هایی که کار شده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده گردید که نتایج به‌دست آمده از سطح زیر پیک گراف‌های HPLC مؤید تولید 2HBP در مدت ۴ روز در محیط کشت است. چون هدف در این مطالعه اثبات تولید 2HBP در کلونینگی که انجام دادیم و مقایسه آن با سویه‌های مهندسی شده دیگری که در این تحقیق آمده است، توسط HPLC است، این‌طور به نظر می‌رسد که این باکتری نو ترکیب هم دارای فعالیت سولفورزدایی هست و با مقایسه با باکتری‌های مذکور توان گوگردزایی آن تقریباً برابر سودوموناس آئروژینوزا EGSOX است.