مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۹، شماره ۲ (پیاپی ۲۶) ، زمستان ۱۳۸۶

افزایش قدرت سولفورزدایی بیولوژیک از طریق کلونینگ و بیان ژن اکسیدوردوکتاز بدست آمده از باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 با استفاده از وکتور بیانی PET21a

جمشید راهب* (Ph.D)، الهام آقایی مقدم (M.Sc)، حدیث بهزادی (M.Sc)
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

سابقه و هدف: بیودسولفوریزاسیون یک روش میکروبی است که طی آن با استفاده از سویه‌های بهینه شده باکتریایی سعی در افزایش توان قدرت گوگردزدایی از ترکیبات نفتی می‌شود، یکی از روش‌های موثر استفاده از ژن‌های اکسیدوردوکتاز افزایش یافته می‌باشد که FMNH2 مورد نیاز برای فعالیت ژن‌های گوگردزدایی را در دسترس قرار می‌دهند. در این مطالعه ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 که به عنوان یک سویه مدل در تحقیقات گوگردزدایی مطرح است با استفاده از تکنیک PCR بدست آمد. سپس برای بدست آوردن بیان بالاتر از وکتور بیانی PET21a استفاده شد.

مواد و روش‌ها: پلاسمید نوترکیب PTZ57 OR از باکتری Ecoli-DH5α استخراج و توسط آنزیم‌های محدود کننده EcorI وHindIII برش داده شد که ژن اکسیدوردوکتاز به طول 600 bp جدا شد سپس در وکتورهای بیانی مختلف PKK و PET-21a کلون گردید و برای بررسی بیان سیتوپلاسمی پروتئینی مورد نظر پس از القاء با IPTG در زمان‌های مختلف بر روی ژل آکریل آمید برده شد.

یافته ها: پس از تایید وجود ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید PTZ57R بوسیله PCR این ژن در وکتور بیانی PKK کلون شد که در شرایط القایی یک باند ضعیف بر روی ژل SDS-page درناحیه 25 KDa نشان داد. که برای بدست آوردن بیان بالاتر از وکتور PET-21a استفاده شد که باند شارپی را در همان ناحیه نشان داد.

نتیجه‌گیری: جداسازی کلونینگ و بیان انبوه ژن اکسیدوردوکتاز در باکتری Ecoli منجر به افزایش قدرت بیان ژن‌های گوگردزدائی در سویه‌های مهندسی شده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، گوگردزدائی بیولوژیک، اکسیدوردوکتاز.

مقدمه

نفت خام همواره بعنوان یکی از منابع مهم تولیدی انرژی خصوصاً انرژی الکتریکی مطرح بوده است. اما حضور آلاینده‌هایی که در مراحل مختلف پالایش و احتراق این سوخت‌ها ایجاد می‌شوند محدودیت‌هایی را در زمینه مصرف این مواد ایجاد کرده‌اند. از مهم‌ترین آلاینده‌ها اکسیدهای گوگردی هستند که در اثر حضور گوگرد در نفت و در زمان احتراق بوجود می آیند [۱۰-۶]

این مواد در زمینه زیست محیطی و صنایع مشکلاتی را تولید نموده‌اند از جمله ایجاد باران‌های اسیدی ایجاد خوردگی در ادوات و تجهیزات پالایش و از بین بردن آنها خرابی زودرس موتورهای مولد انرژی و غیر فعال ساختن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۸۰۳۸۷ - ۰۲۱ نمابر: ۴۴۵۸۰۳۹۹ -۰۲۱
Email: jam@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۵/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۶/۴/۵

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

کاتالیست‌های فلزی که در فرایندهای مختلف پالایش موثر هستند [۱,۳,۱۰,۶,۴].

بنابراین باید در جستجوی راه کارهایی برای حذف گوگرد بود. یکی از متداول‌ترین روش‌های بکار رفته روش شیمیایی هیدرودسولفوریزاسیون می‌باشد در این روش با کمک کاتالیست‌های فلزی در فشار و دمای بالا گوگرد احیاء شده و از نفت جدا می‌شود [۶].

اما مشکلاتی که دراین روش وجود دارد ۱- صرف هزینه‌های هنگفت برای تولید دما فشار و تهیه منبع هیدروژن ۲- ترکیبات هتروکسیل آروماتیک حاوی گوگرد مثل تیوفن و دی‌بنزوتیوفن به این روش مقاوم می‌باشند.

برای حل این مشکلات حذف بیولوژیک گوگرد با استفاده از باکتری‌های گوگردزا پیشنهاد شد. یکی از مهم‌ترین این باکتری‌ها سویه رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 بود که به عنوان سویه مدل در تحقیقات گوگرد زدائی مطرح می‌باشد. در این باکتری سه ژن dszA,B,C بر روی یک پلاسمید خطی بزرگ به طول Kb ۱۲۰ قرار گرفته که پروتئین‌های کد شده توسط این سه ژن با همکاری پروتئین چهارمی به نام dszD که توسط ژنی خارج از این اپرون کد می‌شود در یک مسیر شناخته شده‌ای به نام ۴اس‌دی‌بنزوتیوفن را به تدریج اکسیده کرده و به صورت یون سولفات جداسازی می‌کنند. از آن جائی که برای انجام این واکنش به FMNH2 و NADPH به عنوان کاتالیزور مورد نیاز است لذا پروتئین dszD با تامین FMNH2 نقش عمده‌ای در مسیر گوگرد زدائی ایفا می‌کند. با شناسایی ژن کد کننده آنزیم اکسیدورودوکتاز، که یکی از اساسی‌ترین کاتالیزورهای واسطه‌ای مسیر گوگردزدایی ۴اس در باکتری‌ها می‌باشد، راه را در طرح‌های بعدی و بیان انبوه این ژن به موازات ژن‌های مسیر سولفورزدایی ۴اس در باکتری‌ها میزان سولفورزدایی را می‌توان بالاتر برد. از آنجائی که آزمایش‌های invitroنشان داده است که افزایش NADH, FMNH2 باعث افزایش قدرت سولفورزدایی در باکتری‌های سولفورزدا می‌شود، لزوم کلونینگ و بیان این ژن جهت افزایش سولفورزدایی قابل درک است. هدف ما جداسازی و کلونینگ ژن اکسیدوردوکتاز از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس و بررسی بیان بیوشیمیایی این ژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد: مارکروژن مولکولی weight , II Low Molecular و آنزیم‌های محدود الاثر EcoRI , HindIII بکار رفته از شرکت Fermentase خریداری شد. کیت خالص سازی پلاسمید Agrose GeL DNA Extraction و آنزیم T4 DNA Ligaseمحصول شرکت Roche می‌باشد.

سویه‌های باکتریایی: مطالعات بر روی کلون PTZ57OR صورت پذیرفت که در اثر کلونینگ ژن اکسیدوردوکتاز از باکتری IGTS8 به داخل وکتور PTZ57R بدست آمده است. پس از تائید کلون حاصل توسط PCR، ژن اکسیدوردوکتاز از داخل آن تخلیص شده و به داخل وکتور PKK223-3 کلون شد و سپس به داخل سویه DH5α و Ecoli ترانسفورم گردید. بعد از تأئید صحت کلونینگ با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر بررسی برای بیان پروتئین موردنظر صورت گرفت

استخراج پلاسمید: استخراج پلاسمید به روش Large Scale (لیز قلیایی) و طبق رفرنس شماره ۱۱ صورت گرفت.

طراحی پرایمر و روش PCR : ابتدا پرایمرهای مناسب با سکانس های زیر طراحی شد:

رفت ۵ `-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG AAT GCC-3`

برگشت ۵ `-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG AGT CGG-3`

و سپس تکثیر قطعات نوکلئوتیدی ژن اکسیدوردوکتاز با استفاده از یک دستگاه Corbett Research انجام گردید.

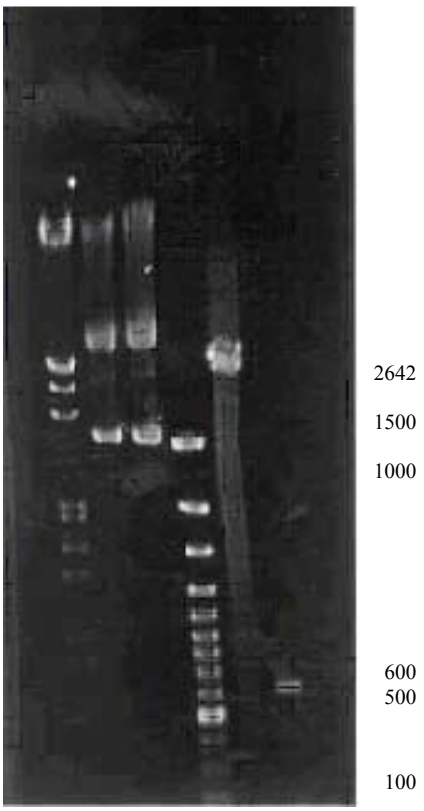
بیان پروتئین: بررسی برای بیان پروتئین مورد نظر با استفاده از ژل اکریلامید (SDS PAGE) انجام شد.

نتایج

ابتدا سکانس ژن اکسیدوردوکتاز در باکتری رودوکوکوس اریتروژولیسIGTS8 از طریق Gene bank و به طول ۵۹۷ bp بدست آمد و برای طراحی پرایمر مورد استفاده قرار

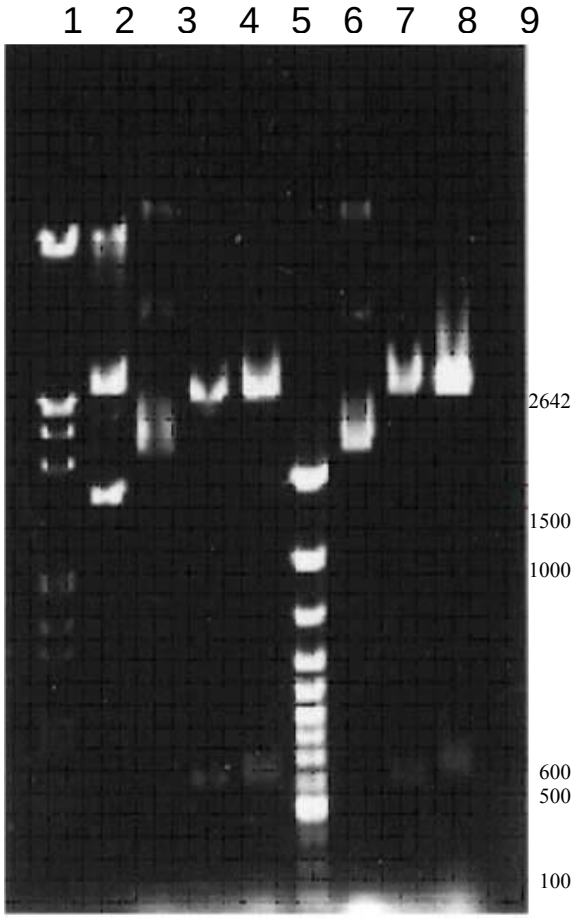
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

گرفت. در این حالت سایت برش با آنزیم EcoRI در ابتدای پرایمر رفت و سایت برش با آنزیم HindIII در انتهای پرایمر برگشت قرار داده شد. PCR از DNA ی پلاسمید PTZ57OR (پژوهش‌گاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) در دمای 57 Annealing درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ سیکل با انجام شد. در این حالت یک باند در ناحیه ۶۰۰ bp مشاهده شد که نشان دهنده وجود ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید PTZ57OR می‌باشد. سپس پلاسمید توسط آنزیم‌های محدود الاثر بریده شد و ژن اکسیدوردوکتاز جدا گردید (شکل ۱) و در داخل وکتور بیانی PKK223-3 که توسط آنزیم‌های محدودالاثر , EcoRI HindIII بریده شده بود، کلون شد.



شکل ۱. لکتروفورز پلاسمید pKK 233-3 و پلاسمید pKK 233-3بریده شده، جهت کلونینگ روی ژل آگارز 1%
۱) مارکر وزن مولکولی 100bp ۲ و ۳) پلاسمید pKK 233-3
۴) مارکر وزن مولکولی 100bp ۵) وکتورpKK 233-3 بریده شده با HindIII و EcoRI ۶) ژن اکسیدوردوکتاز بطول (600 bp) که از داخل وکتور pTZ57OR بریده و تخلیص شده است.

سپس محصول Ligation بداخل باکتری پذیرای مناسب (Ecoli, DH5α) ترانسفورم گردید و پس از استخراج پلاسمید، کلون‌ها با آنزیم‌های محدود الاثر بریده شد (شکل ۲).

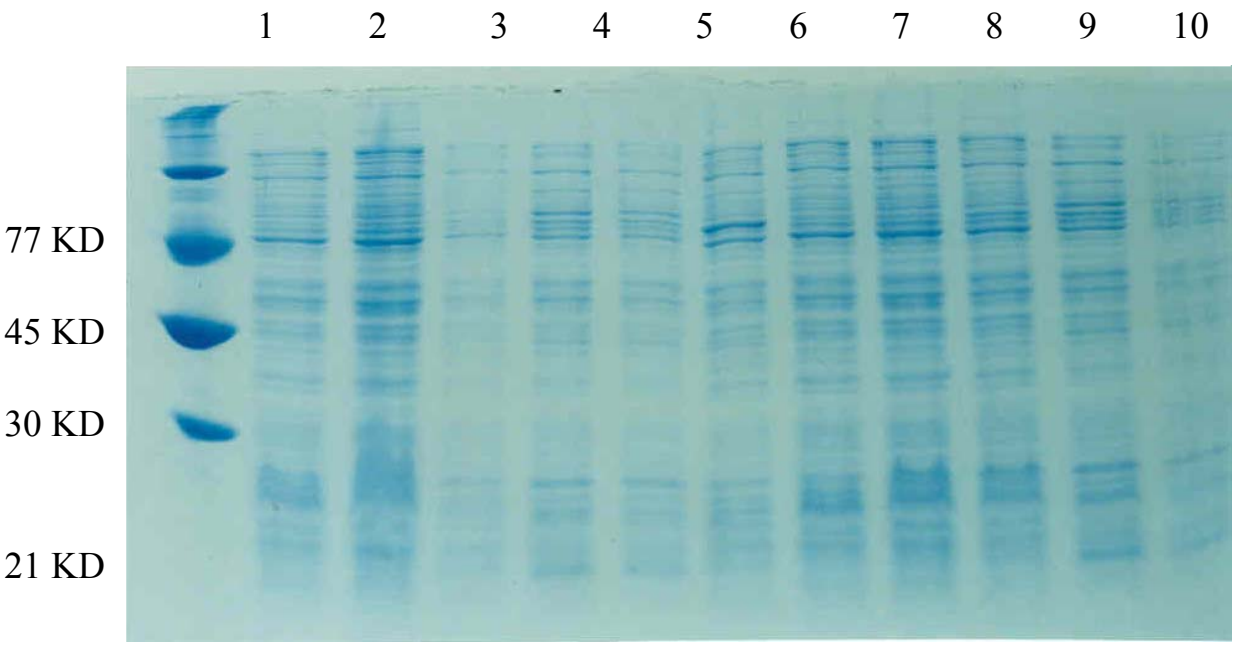


شکل –۲ : کلون ژن اکسیدوردوکتاز به داخل وکتور بیانی pKK 233-3
۱) مارکروزن مولکولی λ_3 ۲) وکتور pKK 233-3 فاقد insert
۳) کلون A شامل وکتور pKK 233-3 حاوی ژن اکسیدوردوکتاز
۴و۵) کلون A بریده شده با آنزیمهای HindIII و EcoRI
۶) مارکر وزن مولکولی 100 bp ۷) کلون A شامل وکتور pKK 233-3 حاوی ژن اکسیدوردوکتاز ۸ و۹) کلون D بریده شده با آنزیمهای HindIII و EcoRI

در این‌حالت ژن اکسیدوردوکتاز در ناحیه ۶۰۰ bp جدا گردید که نشان دهنده صحت کلونینگ می‌باشد. سپس برای بررسی بیان پروتئین موردنظر، یک تک کلون باکتری بصورت اورنایت کشت داده شد و بعد با ضریب رقت ۱/۵۰ در محیط LB حاوی Amp تلقیح گردید و بعد از رسیدنOD به میزان مناسب، ایندکشن با IPTG ۱mM انجام شد سپس در

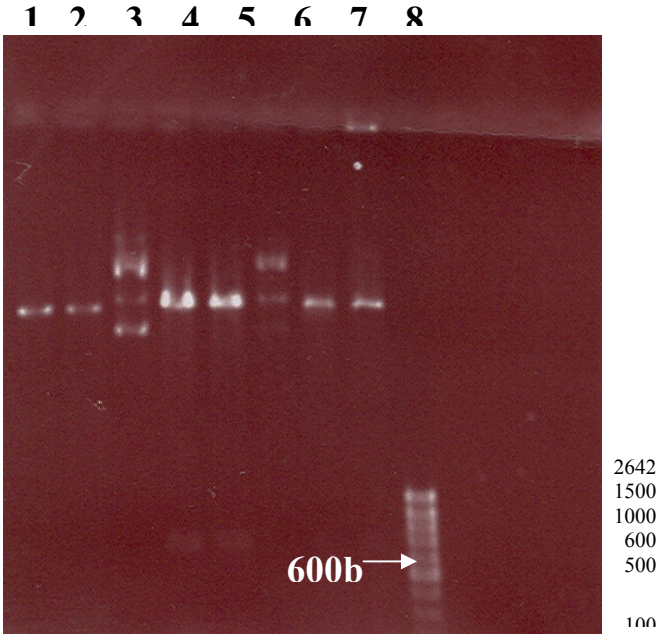
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

زمان‌های مختلف بعد از القاء نمونه‌برداری انجام شد و بر روی ژل اکریلامید ۱۲٪ حاوی SDS برده شد (شکل ۳)، در این‌حالت باند مشخصی در ناحیه KD25 دده نشد که به علت بیان کم ژن اکسیدوردوکتاز در وکتور PKK223-3 می‌باشد. بنابراین ژن اکسیدوردوکتاز تحت یک پرومتور قوی‌تر در یک وکتور بیانی جدید تحت عنوان pet-21a کلون گردید. برای اطمینان از وجود ژن اکسیدوردوکتاز در وکتور بیانی PET-21a کلون‌های مشکوک توسط آنزیم‌های ECORI/HindIII, HindIII, ECORI برش داده شد. (شکل ۳ و۴).



شکل ۳. بررسی بیان سیتوپلاسمی ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید pKK 233-3 تحت پروموتور tac الکتروفورز عصاره باکتری DH5α که شامل پلاسمید pKK 233-3 حاوی ژن اکسیدوردوکتاز میباشد، توسط ژل SDS-PAGE ۱۲درصد

۱) مارکروزن مولکولی ۳و۲) عصاره باکتری حاوی پلاسمید pKK 233-3 کنترل منفی) ۴) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده A قبل از القاء با IPTG ۵) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده 2.A ساعت بعد از القاء با IPTG ۶) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده 4.A ساعت بعد از القاء با IPTG ۷) آنزیم اکسیدوردوکتاز ۹و۸) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده A درزمانهای ۶, ۷ ساعت بعد از القاء با IPTG ۱۲و۱۱و۱۰) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده A. درزمانهای ۸,۹, ۲۱ ساعت بعد از القاء با IPTG



شکل ۴. کلون ژن اکسیدوردوکتاز به داخل وکتور بیانی PET-21a

۱) وکتور PET-21a فاقد insert

۲) وکتور PET-21a بریده شده با آنزیمهای HindIII و EcoRI

۳) کلون D شامل وکتور PET-21a حاوی ژن اکسیدوردوکتاز

4) کلون D بریده شده با آنزیمهای HindIII و EcoRI

۵) کلون E بریده شده با آنزیمهای HindIII و EcoRI

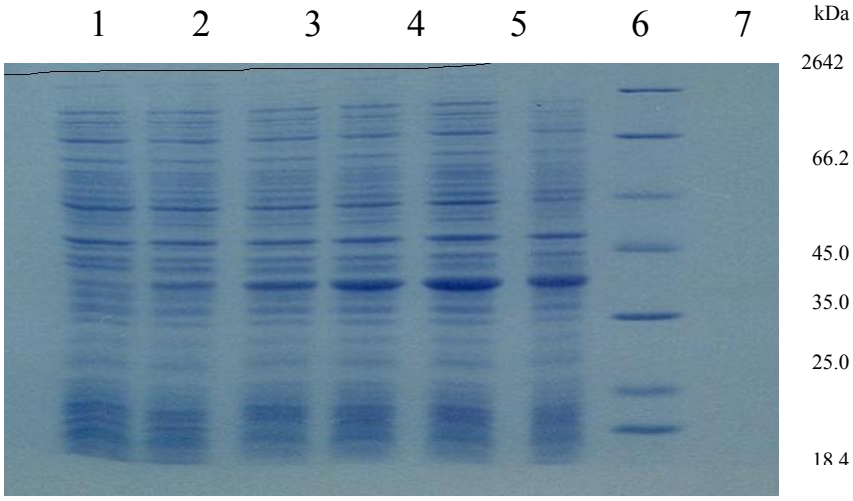
۶) کلون E شامل وکتورPET-21a حاوی ژن اکسیدوردوکتاز

۷) وکتور PET-21a فاقد insert

۸) وکتور PET-21a بریده شده با آنزیمهای HindIII و EcoRI

۹) مارکر وزن مولکولی 100 bp

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



شکل۵. بررسی بیان سیتوپلاسمی ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید PET-21a تحت پروموتور T7
الکتروفورز عصاره باکتری DH5α که شامل پلاسمید حاوی پلاسمید PET-21a ژن اکسیدوردوکتاز میباشد، توسط ژل SDS-PAGE ۱۳ درصد
۱) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده قبل از القاء با IPTG ۲،۳،۴) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده در زمانهای ۱،۲،۴ ساعت بعد از القاء با IPTG ۵،۶) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده در زمانهای ۶،۷ ساعت بعد از القاء با IPTG ۷) مارکروزن مولکولی

در این‌حالت ژن اکسیدوردوکتاز در ناحیه 600 bp جدا گردید که نشان دهنده صحت کلونینگ می‌باشد پس از انجام کلونینگ جهت بررسی بیان ژن اکسیدوردوکتاز در وکتور بیانی PET-21a ، همانند مرحله قبل۲ نمونه باکتری بصورت اورنایت کشت داده شد، یکی باکتری aDH5 که حاوی پلاسمید PET-21a (بعنوان کنترل منفی) و نمونه دیگر حاوی کلون PET-21a بعلاوه ژن اکسیدوردوکتاز (بعنوان کنترل مثبت) بود، سپس به آن‌ها IPTG ۱ mM اضافه شد در ساعات مختلف نمونه‌برداری انجام گرفت آمد و اضافه گردید و سپس بر روی ژل SDS - PAGE، ۱۳٪ برده شد (شکل۵).

بحث و نتیجه‌گیری

پروتئین‌های dszC dszA منواکسیژنازی هستند که NADH را بطور مستقیم به مصرف نمی‌رساند، بلکه از FMNH2 تولید شده توسط DszD استفاده می‌نماید. موقعی که فلاوین‌ردوکتاز به مخلوط واکنش اضافه می‌شوند یا در کانستراکت‌های نوترکیب اوراکسپرس می گردند، سرعت سولفورزداییی تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد. در نتیجه ژن‌های سولفورزدایی نیاز به محصولات ژن dszD دارند. بنابراین پس از شناسایی و کلونینگ ژن‌های سولفورزدایی در وکتور بیانی PET-21a که قبلا انجام شده بود ژن dszD را که از یک باکتری رودوکوکوس‌اریتروپولیس که از دانشگاه شهید بهشتی در اختیار ما قرار گرفته بود جدا و تعیین توالی کردیم که ۹۸ درصد با ژن اکسیدوردوکتاز باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 استاندارد مطابقت داشت.

سپس این ژن در ناحیه مولتی پل کلونینگ سایت وکتور PTZ57R به منظور تکثیر کلون شد. برای اینکه مشخص شود این ژن داخل سلول بیان می‌شود در وکتور بیانی PKK233-3 تحت پروموتور tac کلون شد. که چون بیان انبوهی در ژل آکریلامید دیده نشد و با توجه به رفرنسی که داشتیم که این ژن در وکتور PKK233-3 تنها ۲۰ برابر و در وکتور PET-21a به مقدار ۱۰۰۰ برابر افزایش میابد بنابراین ژن اکسیدوردوکتاز تحت پروموتور قوی تر T7 در وکتور PET-21a کلون شد. و در ناحیه 22 KD در ژل آکریلامید اوراکسپرس دیده شد که نشان می‌دهد این ژن در وکتور PET-21a بیان می‌شود.

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

DszD اکسیداسیون NADH را با اکسیژناسیون سوبسترا بوسیله Dsz A, C متصل می‌کند و فعال سازی dsz A,C بوسیله Dsz D از نظر کنیتیکی اشباع می‌گردد. موقعی که فلاوین‌ردوکتاز، فلاوین‌منونوکلئوتیدردوکتازهای دیگر به مخلوط واکنش اضافه می‌شوند یا در کانستراکت‌های نوترکیب اوراکسپرس می‌گردند، سرعت سولفورزدایی تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد.

نتیجه این که ژن‌های سولفورزدایی نیاز به محصولات ژن dszD دارند. بنابراین ژن dszD را جدا و تعیین توالی کردیم. هدف ما این است که با بیان انبوه این ژن و کلونینگ آن در امتداد ژن‌های سولفورزدایی، فعالیت سولفورزدایی را افزایش دهیم.

هدف بعدی ما در آینده این است که با بیان انبوه این ژن و کلونینگ آن در امتداد ژن‌های سولفورزدایی، فعالیت سولفورزدایی را افزایش دهیم.

منابع

[1] In H.L. Ehrlich and C.L. Brierley (ed.) Microbial mineral recovery. Mc Graw-Hill book co. New York.

[2] Denis-Larose C. Labbe D. Bergeron H. and et al. Conservation of plasmid-encode dibenzothiophene deulfurization genes in several rhodococci. Appl. Envir. Microbiol. 1997; 63: 2915-2919.

[3] Denis-larose C. Bergeron H. Labbe D. and et al. Characterization of the basic replicon of rhodococcus plasmid Psox and development of a Rhodococcus-Escherichia coli Shuttlevector. Appl. Envir. Microbiol. 1998; 64: 4363-4367.

[4] Denome S.A. Olson E.S. and Young, K.D. Identification and cloning of genes involved in specificdesulfurization of debenzothiophene by Rhodococcus SP.strain IGTS8. Appl. Envir. Microbial. 1993; 59: 2837-2843.

[5] Foght J.M. Fedorak P.M. Gray M.R. and et al. Microbial desulfurization of petroleum. 1990; 379-407. In H.L.Ehrlich and C.L.Brierley(et.) microbial mineral recovery. Mc Graw Hill book Co. New York.

[6] Gray K.A. Pogrebinsky O.S. Mrachko G.T. and et al. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. Nature Biotechnology. 1996; 14: 1705-1709.

[7] Grossman M.J. Lee. M.K prince R.C. and et al. Microbial desulfurization of a crudeoil middle distillate fraction:analysis of the extent of sulfur removal and the effect of removal on remaining sulfur. Appl. Envir. Microbial. 1999; 65: 181-188.

[8] Honda H. Sugiyama D. Saito I. and et al. High cell density culture of Rhodococcus rhodochrous by PH-stat feeding and debenzothiophene degradation. J of Fermentation and Bioengineering. 1998; 85: 334-338.

[9] Maghsoudi S. Kheirolomoon A. Vossoughi M. and et al. Selective desulfurization of debenzothiophene by newly isolated Corynebacterium sp. Strain P32C1. Biochemical engineering Journal. 2000; 5: 11-16.

[10] Oldfield C. Poogrebinsky O. Simmonds J. and et al. Elucidation of the metabolic pathway for debenzothiophene desulfurization why Rhodococcus SP.strain IGTS8 (ATCC53968). Microbiology. 1997; 143: 2961-2973.

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

Enhansment of Biodesulfurization activity via the over expression of the oxidoreductase gene from R.erytheropolis IGTS8using pet 21a vector

J. Raheb (Ph.D)*, E. Aghaei (M.Sc), H. Behzadi (M.Sc)
National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, IRAN

Introduction: Biological desulforezation is a microbial procedure which uses manipulated bacterial strains for increasing of desulforezation from petroleum products.

Materials and methods: The method is being tested by several big oil companies for making a safe fuel and for preventing air pollution one of the methods for enhancement of desulforezation of microbial oil strains is increasing of copy number of oxidoreductase gene. this gene is able to supply the required FMNH2 for desulforezation genes of Rhodococcus erythropolis IGTS8 , which is used as a model micro organism in desulforezation researches, was amplified with PCR and was cloned in to the PTZ57R vector. Then the oxidoreductase gene was extracted by agarose gel DNA extraction kit as a 600 bp fragment and was inserted in to the pkk223-3 expression vector.

Result: After induction, the desired protein was weakly detected as a 25 KD band in SDS-PAGE gel . However using another expression vector(PET 21a), a sharp band was detected in the same area.

Discussions: At present , the studies was focused on increasing the production in National Instutute of genetic Engineering and bio technology we are trying to apply genetic Engineering tools to increase gene dosage of oxidoreductase gene to enhancement of desulforezation gene expression.

Key words: Biological desulfurization, *Rhodococcus-erythropolis IGTS8*

* Corresponding author: Fax: +98 21 44580399; Tel: +98 21 44580387
jam@nigeb.ac.ir

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