جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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 ملي مهندسي ژنتيک و زيست فناوري

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 يكي از منابع مهم توليدي انرژي خصوصاً انرژي الكتريكي مطرح بوده است. اما حضور آلاينده‌هايي كه در مراحل مختلف پالايش و احتراق اين سوخت‌ها ايجاد مي‌شوند محدوديت‌هايي را در زمينه مصرف اين مواد ايجاد كرده‌اند. از مهم‌ترين آلاينده‌ها اكسيدهاي گوگردي هستند كه در اثر حضور گوگرد در نفت و در زمان احتراق بوجود مي آيند [۱۰-۶]

اين مواد در زمينه زيست محيطي و صنايع مشكلاتي را توليد نموده‌اند از جمله ايجاد باران‌هاي اسيدي ايجاد خوردگي در

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

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ادوات و تجهيزات پالايش و از بين بردن آ ـا خـرابي زودرس موتورهاي مولد انرژي و غير فعال ساختن كاتاليست‌هاي فلزي كه در فرايندهاي مختلف پالايش موثر هستند [۱,۳,۱۰,۶,۴].

بنابراين بايد در جستجوي راه كارهايي براي حذف گوگرد بود. يكي از متداول‌ترين روش‌هاي بكار رفته روش شـيميايي هيدرودسولفوريزاسـيون مـي‌باشـد در ايـن روش بـا كمـك كاتاليست‌هاي فلزي در فشار و دماي بالا گوگرد احياء شده و از نفت جدا مي‌شود [۶].

امـا مـشكلاتي كـه درايـن روش وجـود دارد ۱- صـرف هزينه‌هاي هنگفت براي توليد دما فشار و يه منبع هيـدروژن ۲- تركيبات هتروكسيل آروماتيک حاوي گوگرد مثل تيوفن و دي، وتيوفن به اين روش مقاوم مي‌باشند.

براي حل اين مشكلات حذف بيولوژيک گوگرد با استفاده از باكتري‌هاي گوگردزا پيشنهاد شد. يكـي از مهـم‌تـرين ايـن باكتري‌ها سويه رودوكوكوس اريتروپوليس IGTS8 بود كه بـه عنوان سويه مدل در تحقيقات گوگرد زدائي مطرح مي‌باشد. در اين باكتري سه ژن dszA,B,C بـر روي يـک پلاسميـد خطـي بزرگ به طول ۱۲۰ Kb قرار گرفته كه پروتئين‌هاي كـد شـده توسط اين سه ژن با همكاري پروتئين چهارمي بـه نـام dszD كه توسط ژني خارج از اين اپرون كد مي‌شود در يـک مـسير شناخته شده‌اي به نام ٤اس‌دي، وتيوفن را به تـدريج اكـسيده كرده و به صورت يون سولفات جداسازي مي‌كنند. از آن جائي كه براي انجام اين واكنش به FMNH2 و NADPH بـه عنـوان كاتاليزور مورد نياز است لذا پروتئين dszD با تامين FMNH2 نقش عمده‌اي در مسير گوگرد زدائي ايفا مي‌كند. با شناسـايي ژن كد كننده آنزيم اكسيدورودوكتاز، كه يكـي از اساسـي‌تـرين كاتاليزورهاي واسطه‌اي مسير گوگردزدايي ۴اس در باكتري‌هـا مي‌باشد، راه را در طرح‌هاي بعـدي و بيـان انبـوه ايـن ژن بـه موازات ژن‌هاي مسير سولفورزدايي ۴اس در باكتري‌ها ميـزان سولفورزدايي را مي‌توان بالاتر برد. از آنجائي كه آزمايش‌هاي invitroنشان داده است كه افزايش NADH, FMNH2 باعث افـزايش قـدرت سـولفورزدايي در بـاكتري‌هـاي سـولفورزدا مـي‌شـود، لـزوم كلونينـگ و بيـان ايـن ژن جهـت افـزايش سولفورزدايي قابل درك است. هدف ما جداسازي و كلونينـگ ژن اكـسيدوردوكتاز از يـک سـويه بـاكتري رودوكوكـوس اريتروپوليس و بررسي بيان بيوشيميايي اين ژن مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد: ماركروژن مولكولي weight , II Low Molecular و آنزيم‌هاي محدود الاثر EcoRI , HindIII بكار رفته از شركت Fermentase خريداري شد. كيـت خـالص سـازي پلاسميـد Agrose GeL DNA Extraction و آنزيم T4 DNA Ligase محصول شركت Roche مي‌باشد.

سويه‌هاي باكتريايي: مطالعات بر روي كلون PTZ57OR صورت پذيرفت كـه در اثـر كلونينـگ ژن اكـسيدوردوكتاز از باكتري IGTS8 به داخل وكتور PTZ57R بدست آمـده اسـت. پس از تائيد كلون حاصل توسط PCR، ژن اكسيدوردوكتاز از داخل آن تخليص شده و به داخل وكتور PKK223-3 كلون شد و سپس به داخل سويه DH5α و Ecoli ترانسفورم گرديد. بعد از تأئيد صحت كلونينگ با استفاده از آنـزيم‌هـاي محـدودالاثر بررسي براي بيان پروتئين موردنظر صورت گرفت

استخراج پلاسميد: اسـتخراج پلاسميـد بـه روش Large Scale (ليز قليايي) و طبق رفرنس شماره ۱۱ صورت گرفت.

طراحي پرايمر و روش PCR : ابتدا پرايمرهاي مناسـب بـا سكانس هاي زير طراحي شد:

رفـت 0 `-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG AAT GCC-3`

برگشت 0 `-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG AGT CGG-3`

و سپس تكثير قطعات نوكلئوتيدي ژن اكـسيدوردوكتاز بـا استفاده از يك دستگاه Corbett Research انجام گرديد.

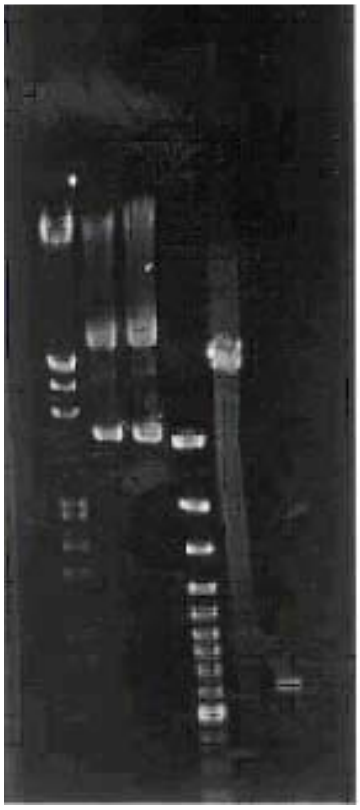
بيان پروتئين: بررسي براي بيان پـروتئين مـورد نظـر بـا استفاده از ژل اكريلاميد (SDS PAGE) انجام شد.

نتايج

ابتدا سكانس ژن اكسيدوردوكتاز در باكتري رودوكوكـوس اريتـروژوليسIGTS8 از طريـق Gene bank و بـه طـول

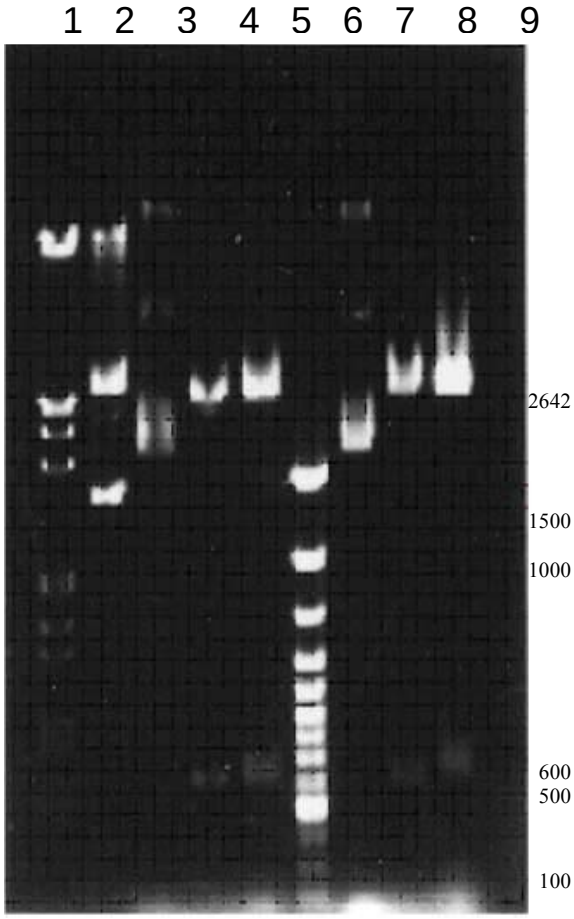
جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

bp ۵۹۷ بدست آمد و براي طراحي پرايمر مورد استفاده قـرار گرفت. در اين حالت سايت برش با آنزيم EcoRI در ابتـداي پرايمر رفت و سايت برش با آنـزيم HindIII در انتـهاي پرايمـر برگشت قرار داده شد. PCR از DNA ي پلاسميد PTZ57OR (پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيک و زيست فناوري) در دمـاي 57 Annealing درجه سانتي گراد به مدت يـک دقيقـه و ۳۰ سيکل با انجام شد. در اين حالت يک باند در ناحيـه bp ۶۰۰ مشاهده شد کـه نـشان دهنـده وجـود ژن اکـسيدوردوکتاز در پلاسميد PTZ57OR مي‌باشد. سپس پلاسميد توسط آنزيم‌هـاي محدود الاثر بريده شد و ژن اکسيدوردوکتاز جدا گرديد (شـکل ۱) و در داخل وکتور بياني PKK223-3 که توسط آنزيم‌هاي محدودالاثر EcoRI , HindIII بريده شده بود، کلون شد.



شکل۱. لکتروفورز پلاسميـد pKK 233-3 و پلاسميـد pKK 233-3بريده شده، جهت کلونينگ روي ژل آگارز 1%
۱) ماركر وزن مولكولي 100bp ۲ و ۳) پلاسميد pKK 233-3
٤) ماركر وزن مولكولي 100bp ۵) وكتورpKK 233-3 بريده شده با HindIII و EcoRI ٦) ژن اكسيدوردوكتاز بطول (600 bp) كه از داخل وكتور pTZ57OR بريده و تخليص شده است.

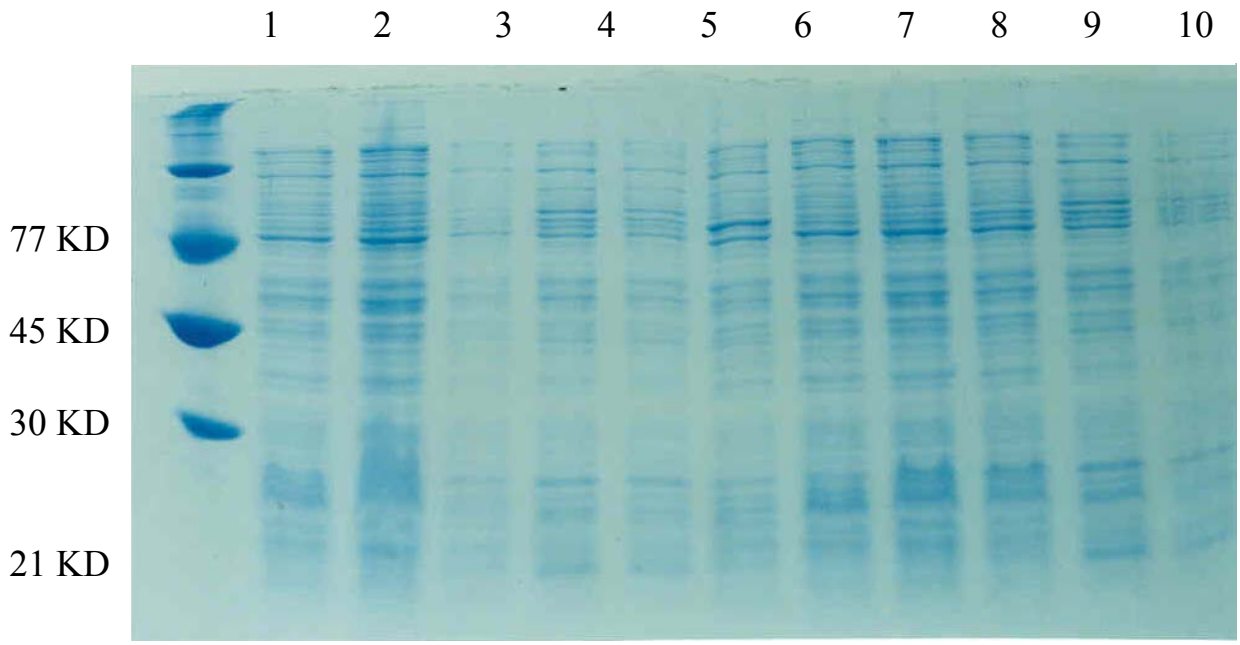
سپس محصول Ligation بداخل بـاکتري پـذيراي مناسـب (Ecoli, DH5α) ترانسفورم گرديد و پس از استخراج پلاسميد، کلون‌ها با آنزيم‌هاي محدود الاثر بريده شد (شکل ۲).



شکل -۲ : کلون ژن اکسيدوردوکتاز به داخل وکتور بياني pKK 233-3
۱) ماركروزن مولكولي λ_3 ۲) وكتور pKK 233-3 فاقد insert
۳) کلون A شامل وکتور pKK 233-3 حاوي ژن اکسيدوردوکتاز
٤و۵) کلون A بريده شده با آنزيمهاي HindIII و EcoRI
٦) ماركر وزن مولكولي 100 bp ۷) کلون A شامل وکتور pKK 233-3 حاوي ژن اکسيدوردوکتاز ۸ و۹) کلون D بريده شده با آنزيمهاي HindIII و EcoRI

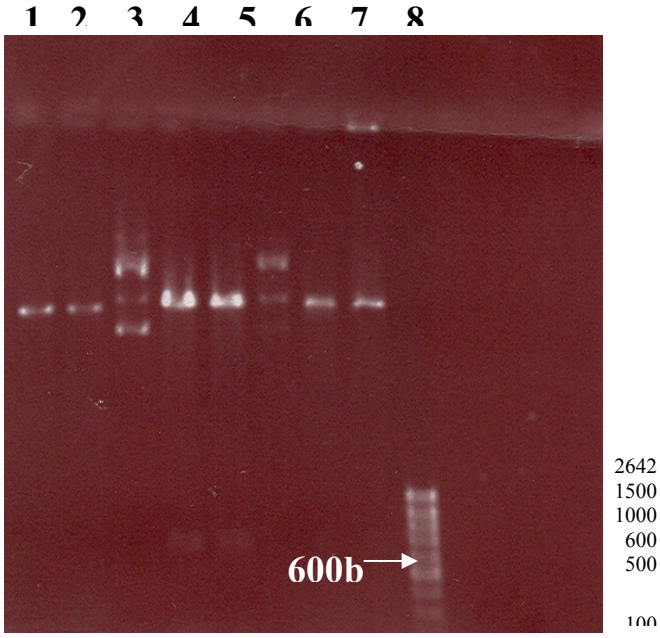
در اين‌حالت ژن اکسيدوردوکتاز در ناحيه bp ٦۰۰ جـدا گرديد که نشان دهنده صحت کلونينگ مي‌باشد. سـپس بـراي بررسي بيان پروتئين موردنظر، يك تك کلون بـاکتري بـصورت اورنايت کشت داده شد و بعد با ضريب رقـت ۱/۵۰ در محـيط LB حاوي Amp تلقيح گرديد و بعد از رسيدنOD به ميزان مناسـب، اينداکـشن بـا IPTG ۱mM انجـام شـد سـپس در زمان‌هاي مختلف بعد از القاء نمونه‌برداري انجام شـد و بـر روي

ژل اكريلاميد ۱۲% حاوي SDS برده شد (شكل ۳)، در اين‌حالت باند مشخصي در ناحيه KD25 ديده نشد كه به علت بيان كم ژن اكسيدوردوكتاز در وكتور PKK223-3 مي‌باشد. بنابراين ژن اكسيدوردوكتاز تحت يک پرومتور قوي‌تر در يک وكتور بياني جديد تحت عنوان pet-21a كلون گرديد. براي اطمينان از وجود ژن اكسيدوردوكتاز در وكتور بياني PET-21a كلون‌هاي مشكوك توسط آنزيم‌هاي ECORI/HindIII, HindIII, ECORI برش داده شد. (شكل ۳ و٤).



شكل ۳. بررسي بيان سيتوپلاسمي ژن اكسيدوردوكتاز در پلاسميد pKK 233-3 تحت پروموتور tac الكتروفورز عصاره باكتري DH5α كه شامل پلاسميد pKK 233-3 حاوي ژن اكسيدوردوكتاز ميباشد، توسط ژل SDS-PAGE ۱۲درصد

۱) ماركروزن مولكولي ۳و۲) عصاره باكتري حاوي پلاسميد) pKK 233-3 كنترل منفي) ۴) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده A قبل از القاء با IPTG ۵) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده 2.A ساعت بعد از القاء با IPTG ۶) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده 4.A ساعت بعد از القاء با IPTG ۷) آنزيم اكسيدوردوكتاز ۹و۸) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده A درزماي ۷ ,۶ ساعت بعد از القاء با IPTG ۱۲و۱۱و۱۰) عصاره باكتري حاوي پلاسميد كلون شده A. درزماي۲۱ ,۸,۹ ساعت بعد از القاء با IPTG



شكل ٤. كلون ژن اكسيدوردوكتاز به داخل وكتور بياني PET-21a

۱) وكتور PET-21a فاقد insert

۲) وكتور PET-21a بريده شده با آنزيمهاي HindIII و EcoRI

۳) كلون D شامل وكتور PET-21a حاوي ژن اكسيدوردوكتاز

4) كلون D بريده شده با آنزيمهاي HindIII و EcoRI

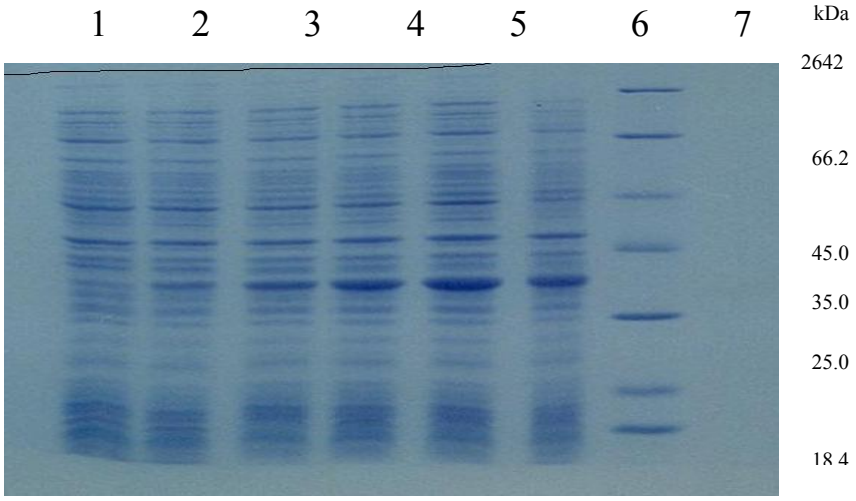
۵) كلون E بريده شده با آنزيمهاي HindIII و EcoRI

٦) كلون E شامل وكتورPET-21a حاوي ژن اكسيدوردوكتاز

۷) وكتور PET-21a فاقد insert

۸) وكتور PET-21a بريده شده با آنزيمهاي HindIII و EcoRI

۹) ماركر وزن مولكولي 100 bp



شکل۵. بررسي بيان سيتوپلاسمي ژن اکسيدوردوکتاز در پلاسميد PET-21a تحت پروموتور T7

الکتروفورز عصاره باکتري DH5α که شامل پلاسميد حاوي پلاسميد PET-21a ژن اکسيدوردوکتاز ميباشد، توسط ژل SDS-PAGE ۱۳ درصد

۱) عصاره باکتري حاوي پلاسميد کلون شده قبل از القاء با IPTG ۴,۳,۲) عصاره باکتري حاوي پلاسميد کلون شده در زماي ۴,۲,۱ ساعت بعد از القاء با IPTG ۶,۵) عصاره باکتري حاوي پلاسميد کلون شده در زماي ۷,۶ ساعت بعد از القاء با IPTG ۷) ماركروزن مولكولي

در اين‌حالت ژن اکسيدوردوکتاز در ناحيه 600 bp جدا گرديد که نشان دهنده صحت کلونينگ مي‌باشد پس از انجام کلونينگ جهت بررسي بيان ژن اکسيدوردوکتاز در وکتور بياني PET-21a ، همانند مرحله قبل۲ نمونه باکتري بصورت اورنايت کشت داده شد، يکي باکتري aDH5 که حاوي پلاسميد PET-21a (بعنوان کنترل منفي) و نمونه ديگر حاوي کلون PET-21a بعلاوه ژن اکسيدوردوکتاز (بعنوان کنترل مثبت) بود، سپس به آن‌ها IPTG ۱ mM اضافه شد در ساعات مختلف نمونه‌برداري انجام گرفت آمد و اضافه گرديد و سپس بر روي ژل SDS - PAGE، ۱۳% برده شد (شکل۵).

بحث و نتيجه‌گيری

پروتئين‌هاي dszA dszC منواکسيژنازي هستند که NADH را بطور مستقيم به مصرف نمي‌رساند، بلکه از FMNH2 توليد شده توسط DszD استفاده مي‌نمايد. موقعي که فلاوين‌ردوکتاز به مخلوط واکنش اضافه مي‌شوند يا در کانستراکت‌هاي نوترکيب اوراکسپرس مي گردند، سرعت سولفورزدايي تا ۱۰۰ برابر افزايش مي‌يابد. در نتيجه ژن‌هاي سولفورزدايي نياز به محصولات ژن dszD دارند. بنابراين پس از شناسايي و کلونينگ ژن‌هاي سولفورزدايي در وکتور بياني PET-21a که قبلا انجام شده بود ژن dszD را که از يک باکتري رودوکوکوس‌اريتروپوليس که از دانشگاه شهيد ـشتي در اختيار ما قرار گرفته بود جدا و تعيين توالي کرديم که ۹۸ درصد با ژن اکسيدوردوکتاز باکتري رودوکوکوس اريتروپوليس IGTS8 استاندارد مطابقت داشت.

سپس اين ژن در ناحيه مولتي پل کلونينگ سايت وکتور PTZ57R به منظور تکثير کلون شد. براي اينکه مشخص شود اين ژن داخل سلول بيان مي‌شود در وکتور بياني PKK233-3 تحت پروموتور tac کلون شد. که چون بيان انبوهي در ژل آکريلاميد ديده نشد و با توجه به رفرنسي که داشتيم که اين ژن در وکتور PKK233-3 تنها ۲۰ برابر و در وکتور PET-21a به مقدار ۱۰۰۰ برابر افزايش مياب بنابراين ژن اکسيدوردوکتاز تحت پروموتور قوي تر T7 در وکتور PET-21a کلون شد. و در ناحيه 22 KD در ژل آکريلاميد اوراکسپرس ديده شد که نشان مي‌دهد اين ژن در وکتور PET-21a بيان مي‌شود.

DszD اکسيداسيون NADH را با اکسيژناسيون سوبسترا بوسيله Dsz A, C متصل مي‌کند و فعال سازي dsz A,C

بوسيله Dsz D از نظر كنيتيكي اشباع مـي‌گـردد. مـوقعي كـه فلاوين‌ردوكتـاز، فلاويـن‌منونوكلئوتيـدردوكتازهاي ديگـر بـه مخلوط واكنش اضافه مي‌شوند يا در كانستراكت‌هاي نوتركيـب اوراكسپرس مي‌گردند، سـرعت سـولفورزدايي تـا ۱۰۰ برابـر افزايش مي‌يابد.

نتيجه اين كه ژن‌هاي سولفورزدايي نياز بـه محـصولات ژن dszD دارند. بنابراين ژن dszD را جدا و تعيين تـوالي كـرديم. هدف ما اين است كه با بيان انبـوه ايـن ژن و كلونينـگ آن در امتداد ژن‌هاي سولفورزدايي، فعاليت سولفورزدايي را افـزايش دهيم.

هدف بعدي ما در آينده اين است كه با بيان انبوه اين ژن و كلونينـگ آن در امتـداد ژن‌هـاي سـولفورزدايي، فعاليـت سولفورزدايي را افزايش دهيم.

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.