

## شناسایی و کلونینگ اپرون سولفورزدایی (dszA, B) SOX در باکتری

### بومی رودوکوکوس FMF

سودابه اکبرزاده شهرباف (M.Sc)، جمشید راهب\* (Ph.D)

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

#### چکیده

سابقه و هدف: باکتری بومی رودوکوکوس FMF از میان چندین سوبه که از خاک مناطق مختلف ایران جدا شده بود، انتخاب گردید. مطالعات اولیه نشان داد که این باکتری دارای توانایی مصرف دی‌بنزوتیوفن به عنوان منبع گوگرد می‌باشد. از آنجا که فعالیت حذف گوگرد طی یک مسیر حفظ شده صورت می‌پذیرد، طرح حاضر با هدف شناسایی، کلونینگ و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن‌های گوگردزدا در این باکتری طراحی و اجرا شد. مواد و روش‌ها: در این تحقیق ابتدا اپرون گوگردزدایی از داخل باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 جداسازی شد و به‌عنوان پروب در شناسایی ژن‌های مسیر سولفورزدایی 4S با استفاده از تکنیک سادرن بلاتینگ به کار رفت. بعد از تأیید حضور اپرون گوگردزدایی در باکتری بومی رودوکوکوس FMF، پرایمرهای مناسب طراحی شد؛ سپس ژن‌های dszA, B با استفاده از تکنیک PCR تکثیر گردید و بعد از خالص‌سازی برای کلونینگ به داخل وکتور pTZ57R مورد استفاده قرار گرفت. یافته‌ها: کانستراکت حاصل از کلونینگ ژن‌های dszA, B به داخل وکتور pTZ57R به نام pTZAB57R خوانده شد و با استفاده از برش‌های آنزیمی تأیید گردید، سپس توالی ژن‌های dszA, B بعد از خالص‌سازی پلاسمید به روش Large scale به‌طریقه اتوماتیک و توسط شرکت MWG DNA Biotech آلمان تعیین گردید. نتیجه‌گیری: مقایسه سکانس به‌دست آمده از ژن‌های dszA, B در باکتری بومی رودوکوکوس FMF هم‌سانی کامل آن را با سکانس ژن‌های dszA, B در باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 نشان می‌دهد که دلالت بر حفظ شدن مسیر گوگردزدایی در این باکتری دارد.

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

#### مقدمه

آزادسازی اکسیدهای گوگرد بعد از احتراق سوخت‌های فسیلی یک مسأله مهم زیست‌محیطی است. این مسأله یکی از علل مهم آلودگی هواست و به‌علاوه باعث ایجاد باران‌های اسیدی می‌شود [۶،۱۰،۹]. از طرف دیگر وجود گوگرد در ترکیبات نفتی باعث ایجاد خوردگی در وسائل تولید، پالایش و انتقال مواد نفتی و همچنین باعث غیرفعال شدن کاتالیست‌ها

می‌شود [۲]. روش رایج برای گوگردزدایی از ترکیبات نفتی، هیدرودسولفوریزاسیون (HDS) می‌باشد. هیدرودسولفوریزاسیون تحت فشار بالا (150- 3000 Ib/in<sup>2</sup>) و دمای بالا ۲۹۰-۴۵۵<sup>o</sup>C و استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزور فلزی برای تبدیل گوگرد موجود در ترکیبات نفتی به سولفید هیدروژن (H<sub>2</sub>S) صورت می‌پذیرد [۸]. ارزش سرمایه‌گذاری و بهره‌برداری از این پروژه بالاست،

مورد مطالعه قرار گرفت. بعد از تأیید خاصیت گوگردزدایی در این باکتری با استفاده از آزمون گیبس استاندارد [۱] مطالعات برای شناسائی ژن‌های درگیر در فرآیند گوگردزدایی در این باکتری آغاز گردید. در این حالت در دو تحقیق مجزا که به صورت موازی صورت پذیرفت ژن‌های dszA,B و ژن dszC جداسازی و کلون گردید و با سکانس ابرون، گوگردزدایی در باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8 که به عنوان یک سویه استاندارد در مطالعات گوگردزدایی بیولوژیک در دنیا مطرح است، مقایسه گردید. در این حالت سکانس به دست آمده به میزان ۹۹/۹۷٪ با سکانس حاصل از ژن باکتری R. E. IGTS8 هم خوانی دارد.

## مواد و روش‌ها

( مواد. کلیه آنزیم‌های محدودالثر به کار رفته در این کار به علاوه کیت PCR Product cloning InsT/A clone<sup>TM</sup> از شرکت Fermentas خریداری شد. مارکر وزن مولکولی و سایر کیت‌های به کار رفته شامل DIG DNA labeling and detction kit, high pure PCR product purification kit, high pure plasmid purification kit, Agarose gel DNA extraction kit از شرکت Roche خریداری شد. همگی مواد مورد استفاده ساخت شرکت Merck آلمان می‌باشد.

۲) کشت باکتری و استخراج DNA ژنومی. باکتری بومی R. FMF به مدت ۳-۴ روز در محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین رشد داده شد سپس رسوب باکتری، جدا شده و با EDTA (0/5M, pH=8/0) شسته شد. سلول‌ها در 10ml بافر لیزکننده حاوی لیزوزیم، RNase و پروتیناز K حل شد و بعد از نیم ساعت انکوباسیون در ۳۷°C تا روز بعد در فریزر ۷۰°C قرار گرفت سپس پروتئین‌ها با استفاده از دو مرحله فنل/کلروفورم حذف شد و DNA ژنومی بعد از جداسازی و شستشو در بافر TE حل گردید.

۳) سادرن بلا تینگ. DNA ژنومی، بعد از استخراج و برش با آنزیم‌های محدودالثر برای انجام تکنیک سادرن

به علاوه 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. مشخص شده است که تعدادی از میکروارگانیسم‌ها با تخریب باندهای کربن-کربن قادرند DBT را به CO<sub>2</sub> و بیومس تبدیل کنند اما این روش ارزش سوخت فسیلی را کاهش می‌دهد [۳،۶،۷،۱۳].

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

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

در این تحقیق باکتری بومی رودوکوکوس FMF که توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران جداسازی شده بود،

آمی سیلین) و توانائی  $\alpha$ -complementation می باشد. برای این کار کیت PCR Product cloning<sup>TM</sup> InsT/A clone مورد استفاده قرار گرفت که دارای توانائی کلون کردن قطعات با انتهای صاف می باشد. مرحله Ligation با اضافه کردن آنزیم T4 DNA ligase به محلول حاوی قطعه PCR و وکتور PTZ57R به صورت اورنایت در دمای ۲۲<sup>o</sup>C انجام پذیرفت. محصول Ligation به داخل باکتری کامپنت مناسب (DH5 $\alpha$ .E.coli) ترانسفورم شد. در مرحله بعد میزان ۱۰۰  $\mu$ l از باکتری ترانسفورم شده بر روی یک پلیت LB حاوی IPTG، Amp، X-Gal، پخش شد و به صورت اورنایت در انکوباتور ۳۷<sup>o</sup>C قرار گرفت. کلنی های سفید، بعد از کشت دادن و استخراج پلاسمید از نظر وجود ژن های dszA,B مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

باکتری بومی رود کوکوس FMF سویه ای است که از خاک اطراف پالایشگاه نفت تبریز جدا شده و دارای فعالیت سولفورزدایی اختصاصی از دی بنزوتیوفن (DBT) به عنوان یک مولکول مدل می باشد. بعد از این که به وسیله تست های بیوشیمیایی، فعالیت آنزیم های کلیدی در مسیر سولفورزدایی (مسیر 4S) در این باکتری به اثبات رسید، بررسی ها برای شناسایی و کلون کردن اپرون مربوطه آغاز شد. DNA ژنومی باکتری بعد از جداسازی و خالص کردن به وسیله آنزیم های محدودالتر BglIII, HindIII, EcoRV, EcoRI, ClaI, XbaI و NdeI که فاقد سایت برش در اپرون سولفورزدایی باکتری رود کوکوس اریتروپولیس IGTS8 می باشند، برش داده شد و سپس به صورت اورنایت بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید ران گردید. در این حالت از DNA ژنومی باکتری T3 به عنوان کنترل منفی و از فرگمنت به دست آمده از پلاسمید sox4 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (شکل ۱).

بلا تینگ مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا DNA ژنومی بر روی ژل آگارز ۱٪ به صورت اورنایت با ولتاژ ۲۰<sup>v</sup> ران شد، سپس ژل به ترتیب با 0/25N HCl، محلول دناتوره کننده و محلول خنثی کننده تیمار گردید. DNA موجود در ژل توسط روش کاپیلاری ترانسفر به صورت شبانه بر روی غشاء نایلونی N<sup>+</sup> منتقل گردید. غشاء نایلونی بعد از خشک شدن، به وسیله اشعه UV با طول موج ۲۵۴nm به مدت پنج دقیقه تثبیت شد. مرحله بلا تینگ با استفاده از یک دستگاه هیبریداسیون آون و با استفاده از پروب تهیه شده از اپرون sox4 انجام گرفت به این ترتیب که بعد از انجام شستشوی لازم، مراحل پری هیبریداسیون و هیبریداسیون صورت پذیرفت. بعد از بلوک کردن جایگاه های آزاد، محلول آنتی دیگ آلکالین فسفاتاز به نمونه اضافه گردید؛ ممبران بعد از انجام شستشوی لازم، رنگ آمیزی و ظاهر شد.

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

پرایمر رفت

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

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

پرایمر برگشت

سپس از دو کیت Fast start taq DNA polymerase

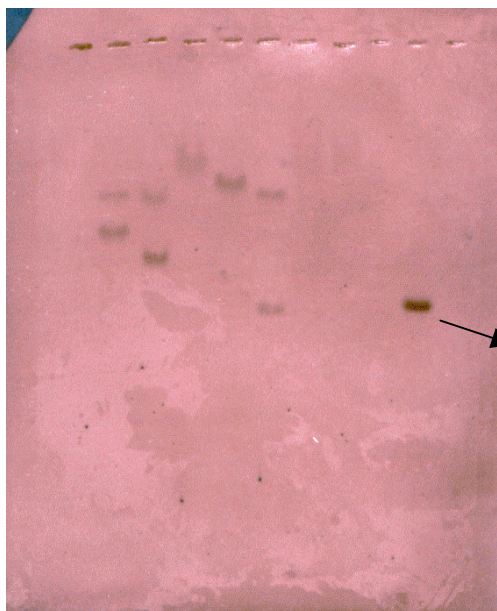
و High fidelity برای انجام PCR استفاده شد. تزیاید ژنی با استفاده از یک دستگاه Corbett Research و در دمای ۶۵<sup>o</sup>C Annealing صورت پذیرفت. بعد از به دست آمدن یک باند مشخص در ناحیه 2/48 kb محصول PCR با استفاده از کیت High pure PCR product purification خالص سازی و تغلیظ شد.

۵) کلونینگ. محصول PCR حاوی ژن dszA,B بعد از

خالص سازی و تغلیظ به داخل پلاسمید PTZ57R کلون شد. پلاسمید PTZ57R حاوی مارکر bla (سایت مقاومت به

EcoRV و EcoRI، ClaI به علت وجود توالی‌های داخل شونده در دو طرف اپرون سولفورزدایی در این باکتری می‌باشد. توالی‌های داخل شونده، ابزارهای مناسبی برای بررسی تفاوت‌های بین‌سویه‌ای است. دو عدد از مشهورترین این توالی‌ها IS1166 و IS1295 می‌باشند که در سر ۳ ژن SOXC در تعدادی از سویه‌های رودکوکوس گزارش شده است. وجود دو باند مشخص در آزمون سادرن‌بلا تینگ می‌تواند به علت قرار گرفتن سایت برش این آنزیم‌ها در درون توالی‌های داخل شونده باشد که قادرند با پروب SOX4 واکنش نشان دهند.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



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

(1) DNA ژنومی برش داده شده با EcoRI

(2) DNA ژنومی برش داده شده با EcoRV

(3) DNA ژنومی برش داده شده با HindIII

(4) DNA ژنومی برش داده شده با BglIII

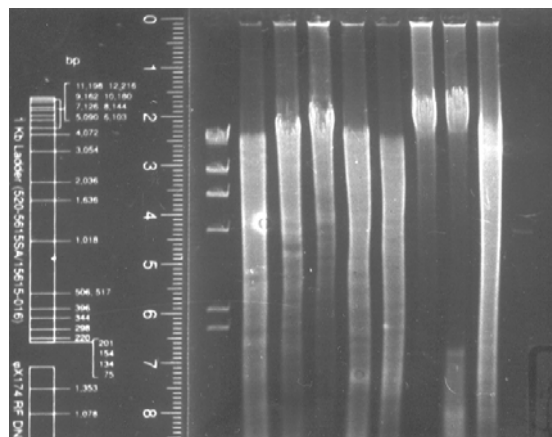
(5) DNA ژنومی برش داده شده با ClaI

(6,7) DNA ژنومی برش داده شده با XbaI, NdeI

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

(9) فرگمنت حاوی اپرون SOX: کنترل مثبت

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



شکل ۱. پروفایل DNA ژنومی در باکتری بومی R.FMF

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

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

(9) DNA ژنومی باکتری T3 بریده شده با آنزیم EcoRI به عنوان کنترل

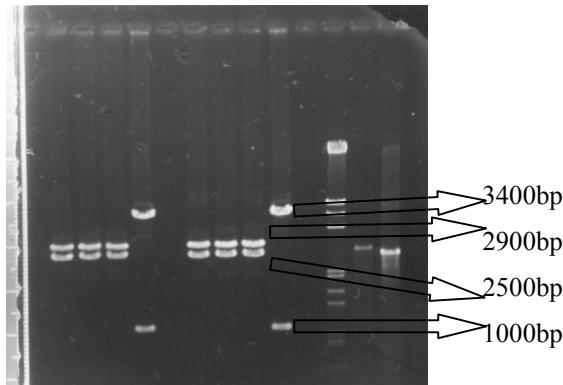
منفی

(10) فرگمنت حاوی اپرون SOX به عنوان کنترل مثبت

بعد از دناتوره شدن، DNA ژنومی از داخل ژل به روی ممبران منتقل گردید و سپس مراحل مختلف سادرن بلا تینگ مطابق پروتکل مربوطه صورت پذیرفت. DNA ژنومی برش داده شده با EcoRI دو باند در نواحی ۲۰/۵ kb و ۹ و DNA ژنومی برش داده شده با EcoRV دو باند در نواحی ۲۰ kb و ۷ نشان می‌دهد، در حالی که در مورد آنزیم‌های BglIII و HindIII یک باند به ترتیب در نواحی ۲۳ kb و ۲۵ دیده می‌شود. در برش با آنزیم ClaI دو باند در نواحی ۲۰ kb و ۴ دیده می‌شود که باند پائینی با پروب در یک عرض قرار دارد. آنزیم‌های XbaI و NdeI که بر روی DNA ژنومی عمل نکرده بودند در این جا نیز باندی را نشان نمی‌دهند. ردیف ۹ کنترل منفی و ردیف ۱۰، کنترل مثبت می‌باشد که دارای یک باند شارپ در ناحیه ۳/۸ kb می‌باشد (شکل ۲).

از آنجایی که تمام گزارشات ارائه شده، دلالت بر حفظ شدن اپرون سولفورزدایی در داخل سویه‌ها و گونه‌های مختلف دارد، به نظر می‌آید ایجاد دو باند در برش با آنزیم‌های

1 2 3 4 5 6 7 8 10 11 12

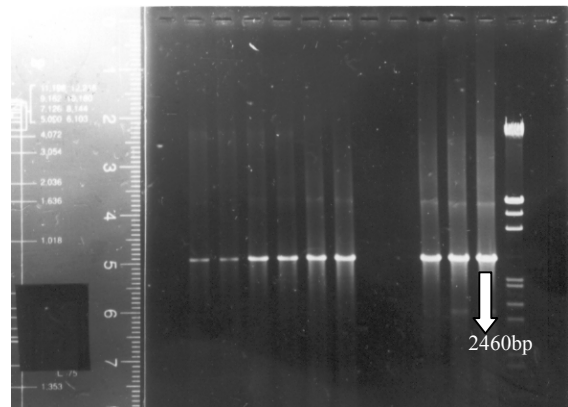


شکل ۴. تأیید صحت کلونینگ با استفاده از برش‌های آنزیمی.

خطوط ۱ تا ۴) پلاسمید T7 که به ترتیب با آنزیم‌های EcoRI, HindIII, XhoI, EcoRI/HindIII بریده شده است.  
خطوط ۵ تا ۸) پلاسمید T8 که به ترتیب با آنزیم‌های EcoRI, XhoI, HindIII, EcoRI/HindIII بریده شده است.  
خط ۱۰) مارکر وزن مولکولی (λ DNA digested with EcoRI/HindIII)  
خط ۱۱) وکتور pTZ57R بعد از خالص‌سازی از یک کلنی آبی و برش با EcoRI, HindIII آنزیم‌های  
خط ۱۲) محصول PCR ژن dszA,B

بعد از انجام مراحل Transformation و Ligation دوازده کلنی سفید بررسی شد و پلاسمید آن‌ها به روش Mini prep استخراج گردید. در این حالت یک باند سوپرکویل در ناحیه ۳/۵ kb مشاهده شد که با توجه به طول قطعه وکتور به نظر می‌آید تمام کلنی‌های سفید، Insert مورد نظر را دریافت کرده باشند. سپس دو کلنی برای مطالعات بیشتر انتخاب شد و پلاسمید آن‌ها به ترتیب با آنزیم‌های EcoRI, HindIII, XhoI, EcoRI/HindIII بریده شد (شکل ۴). بعد از برش با آنزیم‌های EcoRI و HindIII دو باند در نواحی ۲/۹ kb و ۲/۵ مشاهده شد. با توجه به این‌که جایگاه ۳' وکتور و ۵' insert دارای سایت برش با EcoRI و جایگاه ۵' وکتور و ۳' insert دارای سایت برش با HindIII می‌باشد، مشخص می‌شود که این قطعه به‌طور کامل کلون شده است. تأیید نهایی کلون‌شدن ژن AB به‌وسیله برش با آنزیم XhoI به‌دست آمد. از آنجایی‌که این آنزیم فاقد سایت برش بر روی وکتور و دارای دو سایت برش به فاصله ۱۰۰۰ bp بر روی ژن AB می‌باشد، خروج یک قطعه ۱۰۰۰ bp از داخل وکتور، نشان‌دهنده کلونینگ قطعی ژن‌های dszA,B می‌باشد.

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



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

قطعه ژنی dszA,B به‌دست آمده از DNA ژنومی باکتری R.FMF (1,2,3,4)  
قطعه ژنی dszA,B به‌دست آمده از پلاسمید pESOX4 به‌عنوان کنترل مثبت (5,6)  
کنترل منفی: DH5α (7,8)  
قطعه ژنی dszA,B به‌دست آمده از R.FMF بعد از خالص‌سازی و تغلیظ (9,10,11)  
مارکر وزن مولکولی (λ DNA digested with EcoRI/HindIII) (12)

برای بررسی‌های بیشتر، کلونینگ مولکولی اپرون سولفورزدایی در دستور کار قرار گرفت. به‌علت طول زیاد اپرون (۳/۸kb) پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های dszA,B که حدود ۲/۵kb طول دارند، طراحی شد؛ سپس سایت برش با آنزیم EcoRI در سر ۵' پرایمر رفت و سایت برش با آنزیم HindIII در سر ۵' پرایمر برگشت قرار گرفت. بعد از ست شدن برنامه PCR، ژن‌های dszA,B آمپلی‌فاید شد که با استفاده از دو کیت Fast start taq DNA polymerase (شکل ۳. باندهای ۱ و ۲) و High fidelity (شکل ۳. باندهای ۳ و ۴) صورت پذیرفت. برای تأیید PCR از نمونه CC118 SOX4 به‌عنوان کنترل مثبت (شکل ۳. باندهای ۵ و ۶) و از DH5α به‌عنوان کنترل منفی (شکل ۳. باندهای ۷ و ۸) استفاده شد. ژن dszA,B بعد از تکثیر با استفاده از کیت High pure PCR product purification خالص‌سازی و تغلیظ شد. جذب نمونه با یک دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm خوانده شد و بعد از تعیین غلظت معادل ۰/۵ μg از DNA، برای کلونینگ به داخل وکتور مورد استفاده قرار گرفت.

## بحث

به علت واقع شدن در محل باز سوم باعث تغییر اسید آمینه نمی شود.

در مطالعات گوگردزایی، استفاده از سویه های بومی دارای مزیت نسبی فراوان می باشد. چون اگرچه سویه های متعدد حاوی اپرون گوگردزایی در بانک ژنی موجود می باشد ولیکن حق استفاده از این سویه ها فقط برای مطالعات تحقیقاتی است و فاقد جواز استفاده تجاری می باشد. در عین حال که به نظر می رسد، قابلیت سویه های بومی برای کار بر روی نفت ایران که از نظر حضور گوگرد بسیار سنگین است متفاوت از توانایی سویه های غیر بومی موجود می باشد که بررسی فعالیت آن ها نیازمند یک سری آزمایشات وسیع و دنباله دار می باشد و حمایت سازمان های مربوطه را می طلبد.

## منابع

- [1] Akbarzadeh S, Raheb J, Aghaei A, Karkhane AA. Study of desulfurization rate in *Rhodococcus* FMF native bacterium. *Iranian J Biotechnol*, 2003; 1: 36-40.
- [2] Denome SA, Olson ES, Young K. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Appl Environ Microbiol*, 1993; 59(9): 2837-2843.
- [3] Gallardo ME, Ferrandez A, Lorenzo VD, Garcia JL, Diaz E. Designing recombinant *pseudomonas* strain to enhance biodesulfurization. *J Bacteriol*, 1997; 179(22): 7156-7160.
- [4] Izumi Y, Ohshiro T, Ogino YH, Hine Y, Shima M. Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol*, 1994; 60: 223-226.
- [5] Kilbane JJ, Jackowski K. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol Bioengin*, 1992; 40: 1107-1114.
- [6] Larose CD, Labbe D, Bergeron H, Jones AM, Greer GW, Al-Hawari J. Conservation of plasmid encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococci*. *Appl Environ Microbiol*, 1997; 63(7): 2915-2919.
- [7] Li MZ, Squires CH, Monticello DJ, Childs JD. Genetic analysis of the *dsz* promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *J Bacteriol*, 1996; 175(22): 6409-6418.
- [8] Maghsoudi S, Kheiriloom A, Vossoughi M, Tanaka E, Kotoh S. Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp. strain P32C1. *Biochem Engin J*, 2000; 5: 11-16.
- [9] Maghsoudi S, Vossoughi M, Kheiriloom A, Tanaka E, Kotoh S. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochem Engin J*, 2001; 8: 151-156.
- [10] Oldfield C, Poogrebinsky O, Simmonds J, Olson ES, Kulpa CF. Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC53968). *Microbiol*, 1997; 143: 2961-2973.
- [11] Omori T, Monna L, Saiki Y, Kodama T. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. *Appl Environ Microbiol*, 1992; 53: 911-915.
- [12] Omori T, Saiki Y, Kasuga K. Desulfurization of alkyl and aromatic sulfides and sulfonates by dibenzothiophene desulfurizing *Rhodococcus* sp. strain SY1. *Biosci Biotech Biochem*, 1995; 59: 1195-1198.
- [13] Piddington CS, Kovacevich BR, Rambosk J. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the

یکی از مسائل اصلی صنعت نفت کشور حذف گوگرد از فرکشن های مختلف نفت خام می باشد. روش رایج در گوگردزایی از این ترکیبات، هیدروکسولفوریزاسیون می باشد که در پالایشگاه ها به صورت گسترده مورد استفاده قرار می گیرد ولی این روش علی رغم قیمت بالا، فاقد توانایی لازم در حذف گوگرد از ترکیبات آروماتیک حاوی گوگرد مثل بنزوتیوفن و دی بنزوتیوفن می باشد. هم اکنون مطالعات زیادی بر روی روش بیولوژیکی حذف گوگرد صورت پذیرفته است و باکتری های زیادی شناسایی شده اند که قادرند گوگرد را از ترکیبات آروماتیک حاوی گوگرد جدا نمایند، بدون این که باعث شکستن اسکلت کربنی آن ها شوند. یکی از مهم ترین این سویه ها، باکتری رودوکوکوس اریتروبولیس IGTS8 می باشد که توسط انستیتو تکنولوژی نفت و گاز آمریکا پتنت شده و دارای توانایی بالایی در حذف گوگرد از ترکیبات نفتی می باشد، به علاوه به عنوان یک سویه مدل در تحقیقات گوگردزایی مطرح است.

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

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

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

