

# 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 نو ترکیب PTZ57 OR از باکتری Ecoli-DH5 $\alpha$  استخراج و توسط آنزیم‌های محدود کننده EcorI و HindIII برش داده شد که ژن اکسیدوردوکتاز به طول 600 bp جدا شد سپس در وکتورهای بیانی مختلف PET-21a و PKK کلون گردید و برای بررسی بیان سیتوپلاسمی پروتئینی مورد نظر پس از القاء با IPTG در زمان‌های مختلف بر روی ژل آکریل امید برده شد.

یافته‌ها: 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 در ناحیه 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 می‌آیند [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

ژن اکسیدوردوکتاز از یک سویه باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس و بررسی بیان بیوشیمیایی این ژن می‌باشد.

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 در این 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 زدایی مطرح می‌باشد. در این باکتری سه ژن dszA,B,C بر روی یک پلاسمید خطی بزرگ به طول ۱۲۰ Kb 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 ۴س دی‌بنزوتیوفن را به تدریج اکسیده کرده و به صورت یون سولفات جداسازی می‌کنند. از آن جایی 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 زدایی ایفا می‌کند. با شناسایی ژن کد کننده آنزیم اکسیدوردوکتاز، که یکی از اساسی‌ترین کاتالیزورهای واسطه‌ای مسیر گوگرد زدایی ۴س در باکتری‌ها می‌باشد، راه را در طرح‌های بعدی و بیان انبوه این ژن به موازات ژن‌های مسیر سولفورزدایی ۴س در باکتری‌ها میزان سولفورزدایی را می‌توان بالاتر برد. از آنجایی که آزمایش‌های invitro نشان 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

## 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 Ligase محصول 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 تأیید کلون حاصل توسط PCR، ژن اکسیدوردوکتاز از داخل آن تخلیص شده و به داخل وکتور 3-PKK223 کلون شد و سپس به داخل سویه DH5α و EcolI ترانسفورم گردید. بعد از تأیید صحت کلونینگ با استفاده از آنزیم‌های محدود الاثر بررسی برای بیان پروتئین مورد نظر 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 سکانس‌های زیر طراحی شد:

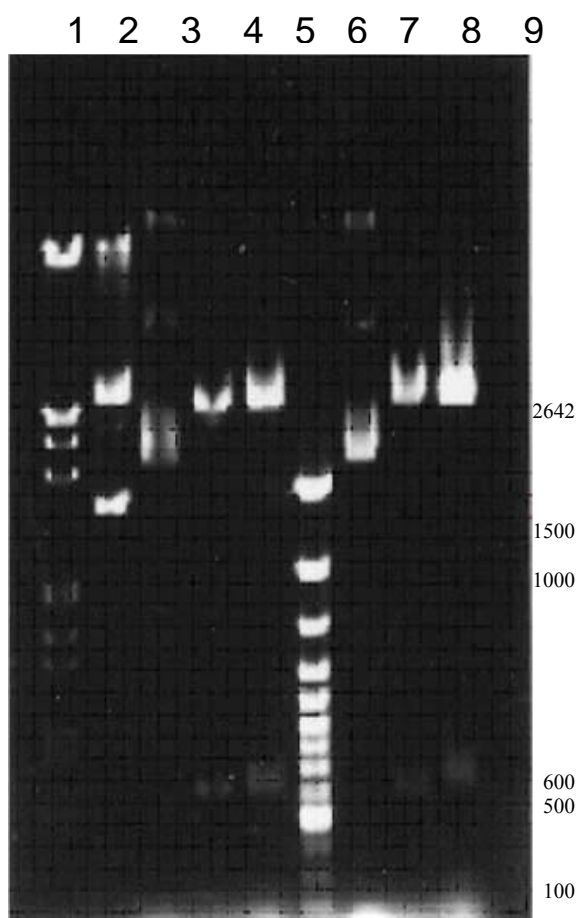
رفت ۵'-GAA TTC ATG TCT GAC AAG CCG AAT GCC-3'  
برگشت ۵'-TCT AGA CTA TTG ACC TAA CGG AGT CGG-3'  
و سپس تکثیر قطعات نوکلئوتیدی ژن اکسیدوردوکتاز با استفاده از یک دستگاه Corbett Research انجام گردید.

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 اریتروزولیس IGTS8 از طریق Gene bank و به طول ۵۹۷ bp بدست آمد و برای طراحی پرایمر مورد استفاده قرار

سپس محصول Ligation بداخل باکتری پذیرای مناسب (Ecoli, DH5 $\alpha$ ) ترانسفورم گردید و پس از استخراج پلاسمید، کلون‌ها با آنزیم‌های محدود الاثر بریده شد (شکل

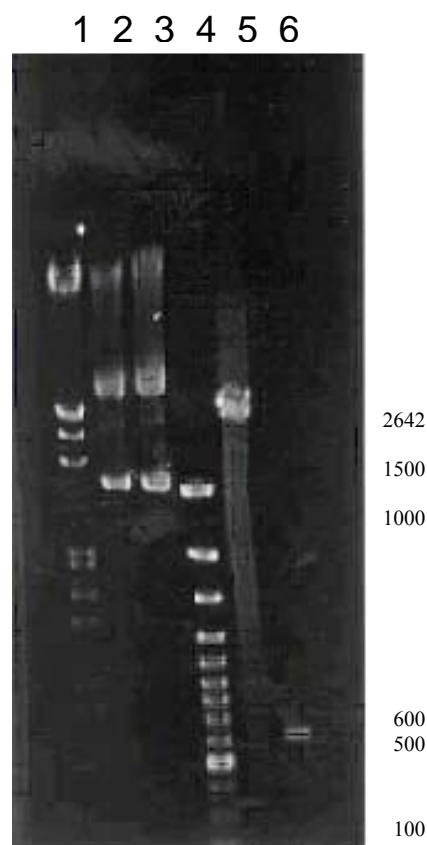


(۲).

شکل ۲- کلون ژن اکسیدوردوکتاز به داخل وکتور بیانی pKK 233-3 (۱) مارکروزن مولکولی  $\lambda$  ۳ وکتور pKK 233-3 فاقد insert (۳) کلون A شامل وکتور pKK 233-3 حاوی ژن اکسیدوردوکتاز (۴) کلون A بریده شده با آنزیمهای EcoRI و HindIII (۵) مارکر وزن مولکولی 100 bp (۷) کلون A شامل وکتور pKK 233-3 حاوی ژن اکسیدوردوکتاز (۸ و ۹) کلون D بریده شده با آنزیمهای EcoRI و HindIII

در این حالت 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 رسیدن OD به میزان مناسب، اینداکشن با ۱ mM IPTG انجام شد سپس در

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 محدود الاثر EcoRI و HindIII بریده شده بود، کلون شد.



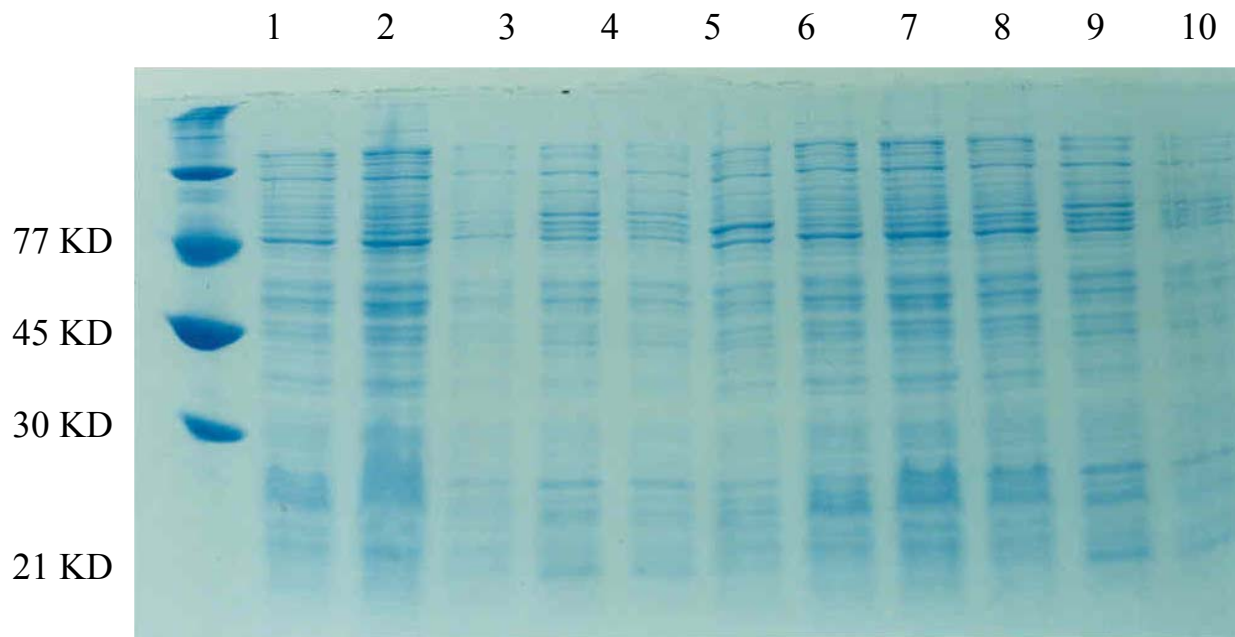
شکل ۱. لکتروفورز پلاسمید pKK 233-3 و پلاسمید pKK 233-3

۳ بریده شده، جهت کلونینگ روی ژل آگارز ۱%

(۱) مارکر وزن مولکولی 100bp (۲ و ۳) پلاسمید pKK 233-3 (۴) مارکر وزن مولکولی 100bp (۵) وکتور pKK 233-3 بریده شده با EcoRI و HindIII (۶) ژن اکسیدوردوکتاز بطول (600 bp) که از داخل وکتور pTZ57OR بریده و تخلیص شده است.

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 و ۴).

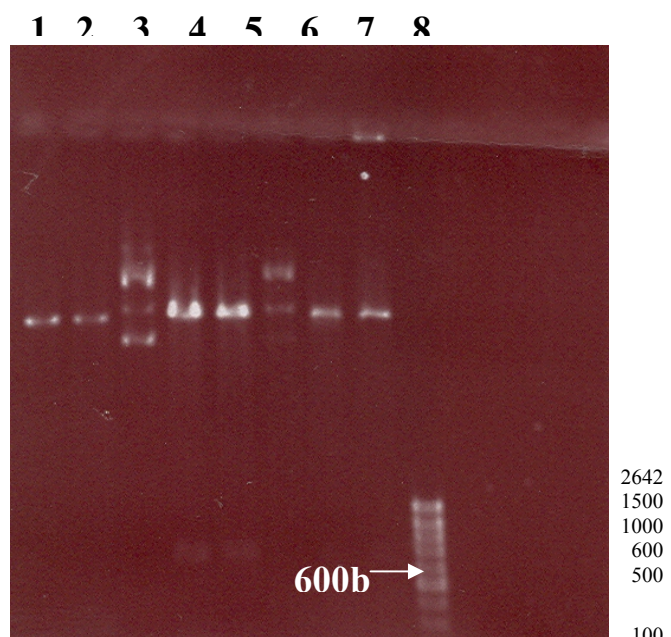
زمان‌های مختلف بعد از القاء نمونه برداری انجام شد و بر روی ژل اکریلامید ۱۲٪ حاوی SDS برده شد (شکل ۳)، در این حالت باند مشخصی در ناحیه KD25 دیده نشد که به علت بیان کم ژن اکسیدوردوکتاز در وکتور PKK223-3 می‌باشد. بنابراین ژن اکسیدوردوکتاز تحت یک پروموتور قوی‌تر در یک

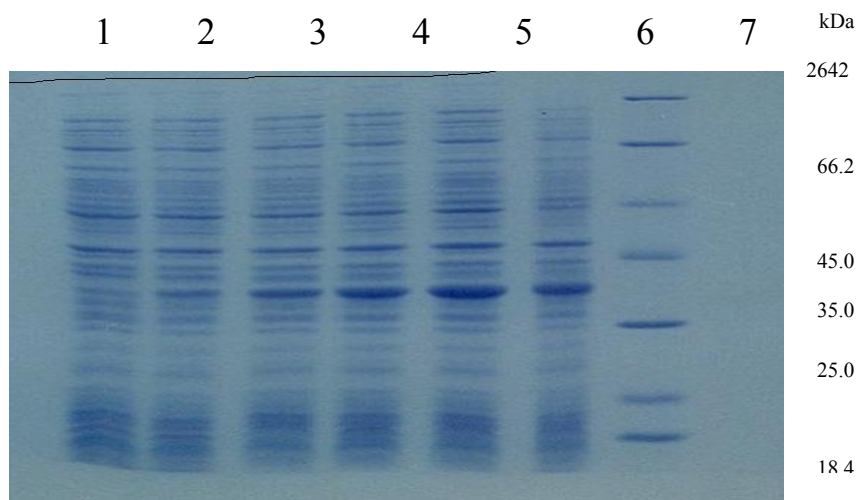


شکل ۳. بررسی بیان سیتوپلاسمی ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید 3-233 pKK تحت پروموتور tac الکتروفورز عصاره باکتری DH5 $\alpha$  که شامل پلاسمید 3-233 pKK حاوی ژن اکسیدوردوکتاز می‌باشد، توسط ژل SDS-PAGE ۱۲ درصد

(۱) مارکوزن مولکولی ۳ و ۲ عصاره باکتری حاوی پلاسمید (3-233 pKK 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 (۸ و ۹) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده A در زمانهای ۷، ۶ ساعت بعد از القاء با IPTG (۱۰ و ۱۱) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده A. در زمانهای ۲۱، ۸، ۹ 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 (۴) کلون D بریده شده با آنزیم‌های HindIII و EcoRI (۵) کلون E بریده شده با آنزیم‌های HindIII و EcoRI (۶) کلون E شامل وکتور PET-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





شکل ۵. بررسی بیان سیتوپلاسمی ژن اکسیدوردوکتاز در پلاسمید PET-21a تحت پروموتور T7

الکتروفورز عصاره باکتری DH5 $\alpha$  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 (۴,۳,۲) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده در زمانهای ۴,۲,۱ ساعت بعد از القاء با IPTG (۶,۵) عصاره باکتری حاوی پلاسمید کلون شده در زمانهای ۷,۶ ساعت بعد از القاء با IPTG (۷) مارکروزن مولکولی

سولفورزدایی نیاز به محصولات ژن dszD دارند. بنابراین پس از شناسایی و کلونینگ ژنهای سولفورزدایی در وکتور بیانی PET-21a که قبلاً انجام شده بود ژن dszD را که از یک باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس 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 می شود در وکتور بیانی 3-PKK233 تحت پروموتور tac کلون شد. که چون بیان انبوهی در ژل آریلامید دیده نشد و با توجه به رفرنسی که داشتیم که این ژن در وکتور 3-PKK233 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 آریلامید اوراکسپرس دیده شد که نشان می دهد این ژن در وکتور PET-21a بیان می شود.

در این حالت ژن اکسیدوردوکتاز در ناحیه 600 bp جدا گردید که نشان دهنده صحت کلونینگ می باشد پس از انجام کلونینگ جهت بررسی بیان ژن اکسیدوردوکتاز در وکتور بیانی PET-21a، همانند مرحله قبل ۲ 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 ۱ mM IPTG اضافه شد در ساعات مختلف نمونه برداری انجام گرفت آمد و اضافه گردید و سپس بر روی ژل SDS - PAGE، ۱۳٪ برده شد (شکل ۵).

## بحث و نتیجه گیری

پروتئینهای dszA dszC منواکسیژنازی هستند که NADH را بطور مستقیم به مصرف نمی رسانند، بلکه از FMNH2 تولید شده توسط DszD استفاده می نمایند. موقعی که فلاوین ردوکتاز به مخلوط واکنش اضافه می شوند یا در کانستراکت های نو ترکیب اوراکسپرس می گردند، سرعت سولفورزدایی تا ۱۰۰ برابر افزایش می یابد. در نتیجه ژن های

## 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. Kheirolmoon 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.

DszD اکسیداسیون NADH را با اکسیژناسیون سوبسترا dsz A, C بوسیله متصل می‌کند و فعال سازی dsz A, C بوسیله Dsz D از نظر کینتیکی اشباع می‌گردد. موقعی که فلاوین ردوکتاز، فلاوین منونوکلوئوتیدردوکتازهای دیگر به مخلوط واکنش اضافه می‌شوند یا در کانستراکت‌های نو ترکیب 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.

## Enhancement of Biodesulfurization activity via the over expression of the oxidoreductase gene from *R.erythropolis* IGTS8 using 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 desulfurization is a microbial procedure which uses manipulated bacterial strains for increasing of desulfurization 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 desulfurization of microbial oil strains is increasing of copy number of oxidoreductase gene. this gene is able to supply the required FMNH<sub>2</sub> for desulfurization genes of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, which is used as a model micro organism in desulfurization 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 Institute of genetic Engineering and bio technology we are trying to apply genetic Engineering tools to increase gene dosage of oxidoreductase gene to enhancement of desulfurization gene expression.

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

---

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