Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۸، شماره ۲، زمستان ۱۳۸۵

کلونینگ و بیان اپرون سولفورزدایی SOX (dsz A,B,C) در باکتری اشریشیاکلی DH5α و مقایسه فعالیت سولفورزدایی آن با سویه‌های رودوکوکوس IGTS8، سودوموناس (آئروژینوزا و پوتیدا) و اشریشیاکلی CC118 λp ir

فرهاد برزگر *[۱،۲] (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 اریتروپولیسIGTS8 که واجد اوپرون 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 اوپرون گوگردزدایی dsz(A,B,C) در باکتری E.coli DH5α توسط وکتور PVLT31 کلون شد و فعالیت سولفورزدایی آن به اثبات رسید، برای تأیید وجود ژن‌های گوگردزدا، از هضم آنزیمی و تکنیک PCR استفاده شد.

یافته‌ها: مقایسه فرایند گوگردزدایی در این باکتری نوترکیب با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، سودوموناس پوتیدا EGSOX، E.coli cc118λpir توسط تست گیپس و HPLC، نشان داد که بالاترین میزان تولید 2HBP را سودوموناس آئروژینوزا EGSOX و E.coli DH5α به ترتیب دارا هستند.

نتیجه‌گیری: نتیجه‌گیری می‌شود که با افزایش کپی نامبر اوپرون 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 DH5α، پلاسمید PVLT31

مقدمه

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

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

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۵؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۴/۲۶

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

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 [۱،۲،۳،۴،۵]. 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 پوند بر اینچ مربع) و دمای بالا ۴۵۵-۲۹۰ ^{oc} و استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزور فلزی برای تبدیل گوگرد موجود در ترکیبات نفتی به سولفیدهیدروژن (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 دای‌بنزوتایوفن حمله می‌کنند (از دای‌بنزوتایوفن به‌عنوان منبع کربن، گوگرد و انرژی استفاده می‌کنند)، تعداد کمی از این میکروارگانیسم‌ها مثل سویه رودوکوکوس، اگروباکتریوم، کورینه‌باکتریوم قادرند طی یک مسیر ویژه، گوگرد را از مولکول دای‌بنزوتایوفن جدا کرده و آن را به ۲-هیدروکسی بای‌فنیل تبدیل کنند، بدون آن‌که ساختمان ترکیبات قابل احتراق نفت آسیب ببیند و از ارزش سوختی نفت کاسته شود. روش گوگردزدایی بیولوژیک با کارآیی 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 انستیتوتکنولوژی گاز و شرکت بیوسیستم‌های آمریکا در سال ۱۹۹۹ پتنت (تأیید) شده است. این باکتری قدرت اکسیداسیون DBT و تبدیل آن به ۲-هیدروکسی بی‌فنیل (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 به عنوان 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 kDa ۴۵ را کد می‌کند که به‌عنوان عضوی از خانواده اسیل کوآنزیم A دهیدروژنازها, واسطه اکسیداسیون ابتدایی DBT به DBT سولفون می‌باشد. این آنزیم به عنوان یک سولفید/سولفوکساید منواکسیژناز خوانده می‌شود که برای فعالیت خود نیاز به فلاوین منونوکلئوتید (FMN) احیا شده دارد. dsz C (دی‌بنزوتیوفن منواکسیژناز) تبدیل متوالی

DBT سولفون $\rightarrow$ DBT سولفوکساید $\rightarrow$ DBT

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

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

به وزن ۴۰ کیلودالتون 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 گیبس 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 گیبس 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، KH2PO4، K2HPO، Na2HPO4، NH4Cl، MgCl2، CaCl2، FeCl3، MnCl2، اتانل، ایزوپروپانل، ایزوبوتانل، متانل، استن، کوماسی‌بلو، اکریل‌آمید و بیس اکریل‌آمید، کلرید لیتیم، فنل، کلروفورم، ایزوآمیل الکل، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA)، تریس اسیدی، تریس‌بازی، گلیسرول، گلوکز، گلایسین، آمونیوم پرسولفات، TEMED سوکروز، دی‌بنزوتیوفن (DBT)، دی‌هیدروکسی‌بی‌فنیل (2HBP)، معرف گیبس (۶ و ۲ دی‌کلروکینون ۴- کلرامید) بافر TAE ،1x، تریپتون، Yeast exteract agar، آگار معمولی و آگارز، که همگی از شرکت Merck خریداری شد. 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، آنتی‌بیوتیک‌ها شامل تتراسایکلین و کانامایسین به‌صورت پودر از شرکت بوهرینگر، انواع آنزیم‌های مورد استفاده شامل لیزوزیم، RNAase از شرکت Roche، آنزیم های محدودالاثر 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 E.coli DH5α، Rhodococcus erythropolis IGTS8، E.coli CC118λpir SOX4، Pesudomonas Putida EGSOX، Pesudomonas aeroginosa 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 آنتی‌بیوتیک کانامایسین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر.

- محیط Basal Salt Medium (BSM).

KH_2PO_4 ۲/۴۴ گرم، Na_2HPO_4 ۵/۵۷ گرم، NH_4Cl ۲ گرم، $MgCl_2, 6H_2O$ ۰/۲ گرم، $CaCl_2, 2H_2O$ ۰/۰۰۱ گرم، $FeCl_3,6H_2O$ ۰/۰۰۱ گرم و $MnCl_2, 4H_2O$ ۰/۰۰۴ گرم.

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

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

۶– رشد باکتری در محیط LB مایع. به منظور رشد باکتری در محیط LB مایع، ابتدا باکتری E.coli cc118 λpir 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 ۲۰۰rpm قرار گرفت.

۷– استخراج پلاسمید به روش Large Scale. ابتدا یک کشت بزرگ حاوی ۲۰۰ ml–۱۰۰ باکتری در محیط LB به‌مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد. پلت حاصله به‌وسیله سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه به‌دست آمد و در ۴ ml محلول Plasmid Prep Mix که شامل ۲۵ mM Tris، ۱۰mM EDTA و Sucrose 15% W/V PH=۸ مجدداً حل گردید. نمونه به یک فالکون ۵۰ml منتقل شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت، سپس ۸ ml از محلول SDS 1% و NaOH 0.2N اضافه و مخلوط گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد ml ۵ استات سدیم ۳ M pH=۴/۶ به نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط شدن به‌مدت چهل دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. نمونه سپس سانتریفیوژ (۵۰ دقیقه، ۲۱۰۰۰rpm) و سوپرناتانت بین دو تیوب تقسیم گردید. به هر تیوب ml ۱۷ اتانل ۱۰۰٪ اضافه و DNA به‌وسیله انکوباسیون در -۲۰^{oc} به‌صورت اورنایت رسوب داده شد. نمونه مجدداً به‌مدت 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 ml ۳ بافر TE حل گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه بر روی میز قرار گرفت تا DNA کاملاً حل شود. ml ۱/۹ کلرید لیتیم M ۸ سرد یخی به نمونه اضافه و مخلوط گردید. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. کلرید لیتیم باعث رسوب DNAی تک‌رشته‌ای می‌شود.

سوپرناتانت به یک تیوب تمیز حاوی ml ۵ ایزوپروپانل اضافه و در ۲۱۰۰۰ دور به‌مدت 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 µl ۵۰۰ بافر TE حل شد و به آن µl ۵ RnaseA اضافه و به‌مدت 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 µl ۳۳۰ از مخلوط NaCl و PEG و سپس یک مرحله استخراج با فنل/کلروفورم یک نمونه با خلوص بالاتر به‌دست آورد.

۸– هضم آنزیمی (Digestion). دایجست به‌صورت زیر انجام گرفت:

۱۵ میکرولیتر پلاسمید SOX4 به یک تیوپ 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 سولفورزدایی از داخل پلاسمید PESOX4، این پلاسمید بعد از بریده شدن با آنزیم‌های محدودالاثر 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 Kb ۳/۸ 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 exteraction 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

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

(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 ژل کاملاً حل گردد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به ازای هر ۱۰۰ میلی‌گرم ژل آگارز به تیوپ‌ها ریخته و ورتکس گردید. سپس وارد High pure filter tube شد و مجموعه به داخل تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر وارد گردید (دقت شد که بیش‌تر از ۷۰۰ میکرولیتر ریخته نشود)؛ بعد به مدت ۱ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول، دور ریخته شد و به روی فیلتر تیوپ‌ها ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو (Washing buffer) اضافه شد. بعد باز هم به مدت ۱ دقیقه با سرعت rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و دوباره این‌کار انجام گرفت و فقط به‌جای ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو، ۲۰۰ میکرولیتر ریخته شد (این مرحله شستشو برای خالص‌سازی بیش‌تر صورت گرفت)؛ سپس محلول فیلتر شد و تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری دور ریخته و فیلتر تیوپ‌ها 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 rpm ۱۲۰۰۰ قرار گرفت. تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تازه شامل DNAی خالص شده است و سپس این DNA بر روی ژل آگارز برده شد.

۱۰- کلونینگ. قطعه ژنی Kb ۳/۸ بعد از استخراج و خالص‌سازی از روی ژل آگارز در سایت‌های ECOR1 و HindIII، که در مولتی‌پل کلونینگ سایت پلاسمید PVLT31 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 PVLT31 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 PVLT31 که قبلاً در مولتی‌پل کلونینگ خود با آنزیم‌های ECOR1-HindIII بریده شد، در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به‌صورت 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 ۰/۵-۰/۴ برسد.

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

۴- رسوب به‌دست آمده در هر تیوپ در ۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۱۰۰ mM کاملاً سرد، حل و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگه‌داری شد.

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

۶- رسوب به‌دست آمده هر تیوپ در ml ۲ 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 DNAی 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.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

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 این‌جا به‌وسیله 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 پیپت شد و روی سه پلیت LB-Tet، PTG و XGaL کشت داده شد و به‌صورت 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 محدودالاثر کلونی‌های مذکور برش داده شدند و از لحاظ وجود ژن مورد نظر مورد 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 به‌عنوان کنترل مثبت و از DH5α فاقد اپرون سولفورزدایی به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

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

5' GAATTCCGCGATGACTCAACAACGAC 3'
پرایمررفت

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. ترکیب واکنش PCR شامل:

	حجم	غلظت نهایی
10x PCR buffer	۱۰ul	۱x
10mM dNTP mix	۲ul	۰/۲mM each
50mM $MgCl_2$	۳ul	۱/۵m M
Primer 1(10uM)	۱ul	۰/۵uM
Primer 1(10uM)	۱ul	۰/۵uM
Primer2 (10uM)	۱ul	۰/۵uM
Tag DNA polymerase	۱ul	۲۵unit per 10 ul
Templet DNA	۱ul که در انتها با ۸۰ µl آب مقطر به حجم ۱۰۰ µlرسانده شد.	

مرحله آمپلی‌فیکاسیون. 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} به‌مدت 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 به‌مدت یک دقیقه در ۹۴^{oc}, جفت شدن پرایمرها به‌مدت یک دقیقه در ۶۸^{oc} و مرحله طویل شدن به‌مدت ۳ دقیقه در ۷۲^{oc} صورت پذیرفت. ج) پلیمریزاسیون نهایی که به مدت ۷ دقیقه در ۷۲^{oc} صورت گرفت.

۱۶- تست‌های بیوشیمیایی.

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

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

CC118λpir و سویه اشریشیا کلی DH5α منفی به‌عنوان کنترل منفی، این تست گذاشته شد. به این صورت که ابتدا باکتری‌ها به‌مدت 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 ۲۰۰rpm 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 اشریشیا کلی DH5α SOX3 و مقایسه آن با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، سودوموناس پوتیدا EGSOX و اشریشیا کلی SOX4 CC118λpir 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 اولدفیلد و همکاران مقدار نمونه انتخاب شده باید طوری باشد که درنهایت 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 ppm ۱۰۰ DBT به‌عنوان منبع گوگرد و ۲۰۰۰ppm گلیسرول به‌عنوان منبع کربن، تحت آنتی‌بیوتیک مناسب انتقال داده شد. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور ۳۰ درجه با rpm ۲۰۰ 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 سوپرناتات جدا و به آن ۱۰ میکرولیتر معرف گیبس اضافه شد، سپس ویال‌ها به‌مدت 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 µl ۱۰ معرف گیبس اضافه شد و سه ساعت در ۳۰^{oc} قرار گرفت. طول موج هر یک از استانداردها در ۶۰۰nm 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

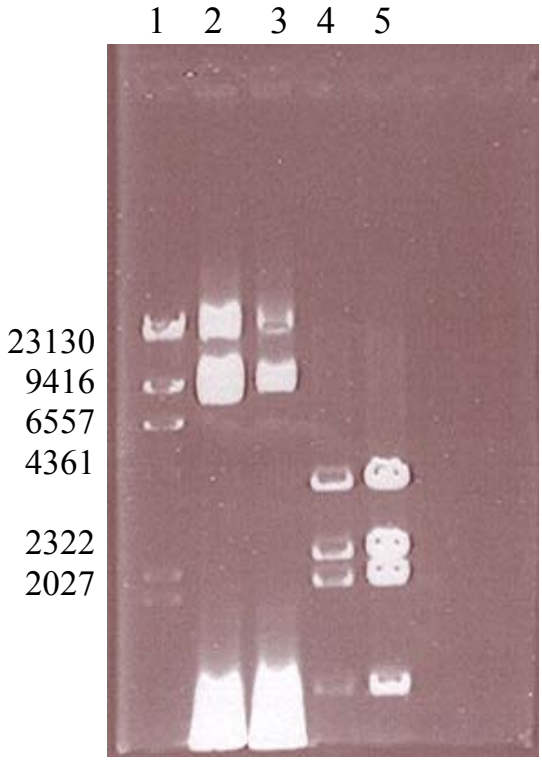
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

حجم نمونه‌ها اتیل استات ریخته و دیده شد که محیط، دو فازی شد (فاز آلی و فاز آبی یا فاز محیط) و سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه ورتکس گردید تا 2HBP که در فاز محیط است به داخل فاز آلی 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 این‌کار انجام شد) و بعد از این‌که اتیل استات نمونه‌ها تبخیر گردید، 2HBP در ته لوله‌ها به‌صورت پودر نازک دیده شد، به روی آن ۱ میلی‌لیتر استونیتریل ۵۰٪ و TFA (تری‌فلورواستیک اسید) ۰/۱٪ 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 uM (۲۵۰mm و ۹/۶ mm)
- جذب: ۲۸۰ نانومتر
- Flow rate: ۰/۹ mL/min
- Mobile phase: استونیتریل ۵۰٪ و TFA (تری‌فلورواستیک اسید) ۰/۱٪

نتایج

شناسایی و کلونینگ. باکتری E.coli CC118 λpir 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 به‌وسیله آنزیم‌های محدودالاثر 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 کلونینگ (MCS) وکتور PVLT31 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 DH5α 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 λpirSOX4 CC118 با ECORI-HindIII

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-ECORI

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

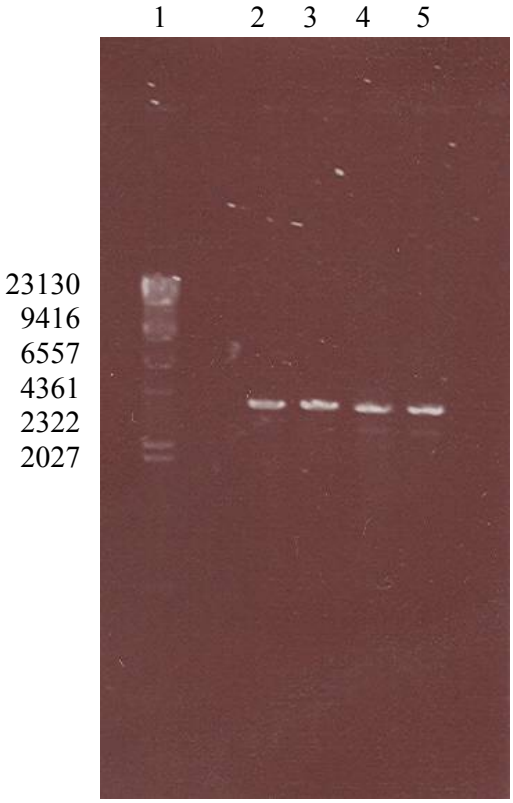
باند بریده شده سومی: قطعه بریده شده با آنزیم ECORI-ECORI

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

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

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، به‌کار برده شد. با توجه به طول زیاد اپرون سولفورزدایی (۳/۸ kb)، پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های dszA, B 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 و۶ از شکل ۵).

نتایج تست‌های بیوشیمیایی.

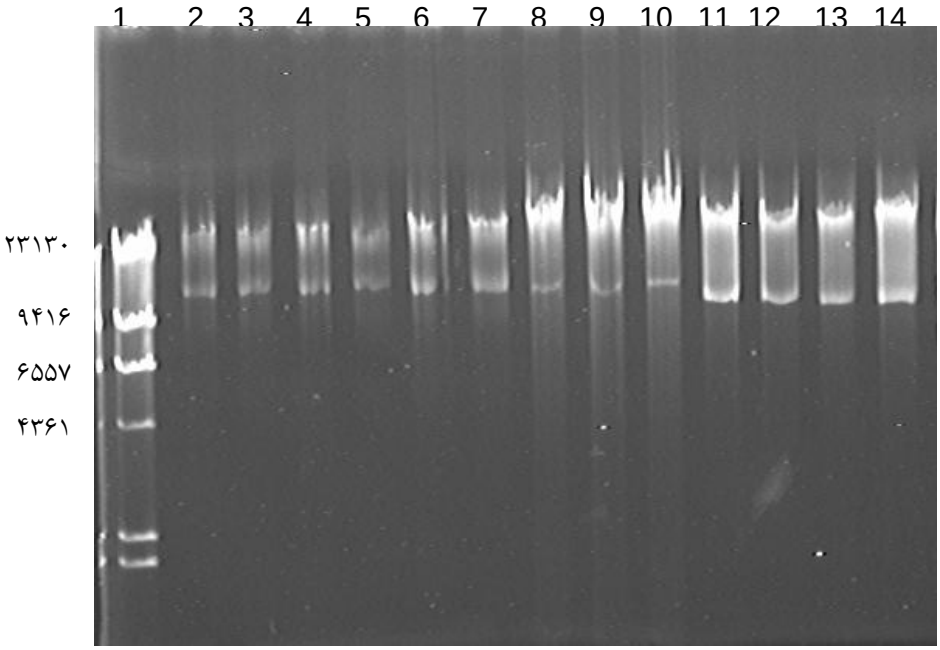
نتایج تست گیبس کیفی: نتایج به‌دست آمده از روش ۱۶ در عکس ۶ دیده می‌شود. به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیر سولفورزدایی ۴S در سویه نوترکیب و مقایسه آن با سویه‌های مورد نظر از تست گیبس کیفی استفاده شد. این تست بر روی سویه نوترکیب اشریشیا کلی DH5α SOX3 و مقایسه آن با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیسIGTS8، 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 به‌دست آمده نمونه‌های استاندارد در ۶۰۰ نانومتر

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

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 به‌کار 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 (۴۰۰میلی‌لیتری) BSM که حاوی ۱۰۰ ppm DBT به‌عنوان منبع گوگرد و ۲۰۰۰ppm گلیسرول به‌عنوان منبع کربن، تحت آنتی‌بیوتیک مناسب، قرار گرفت؛ به این ترتیب که نمونه‌برداری هر۱۲ ساعت یک بار انجام شد و بعد از سانتریفیوژ کردن و افزودن معرف گیبس، نمونه‌ها به‌مدت 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.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019



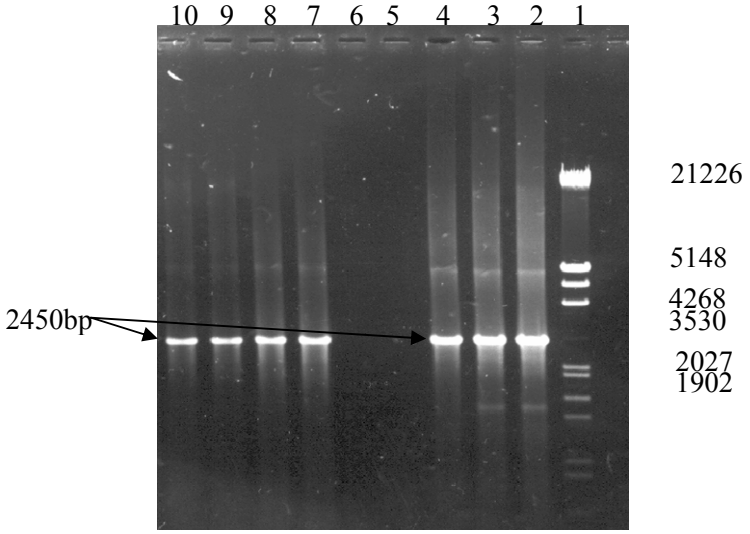
شکل ۳. پلاسمید SOX3 به‌دست آمده از سویه E.coli DH5α بعد از انتقال از CC118λpirSOX4

۱) مارکر وزن مولکولی II

۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷) کنترل مثبت SOX4 از باکتری C118λpirSOX4

۸ الی ۱۴) پلاسمید SOX3 به‌دست آمده از سویه E.coli DH5α بعد از انتقال ازCC118λpirSOX4 به DH5α

(خالص‌سازی به روش Large scale)



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

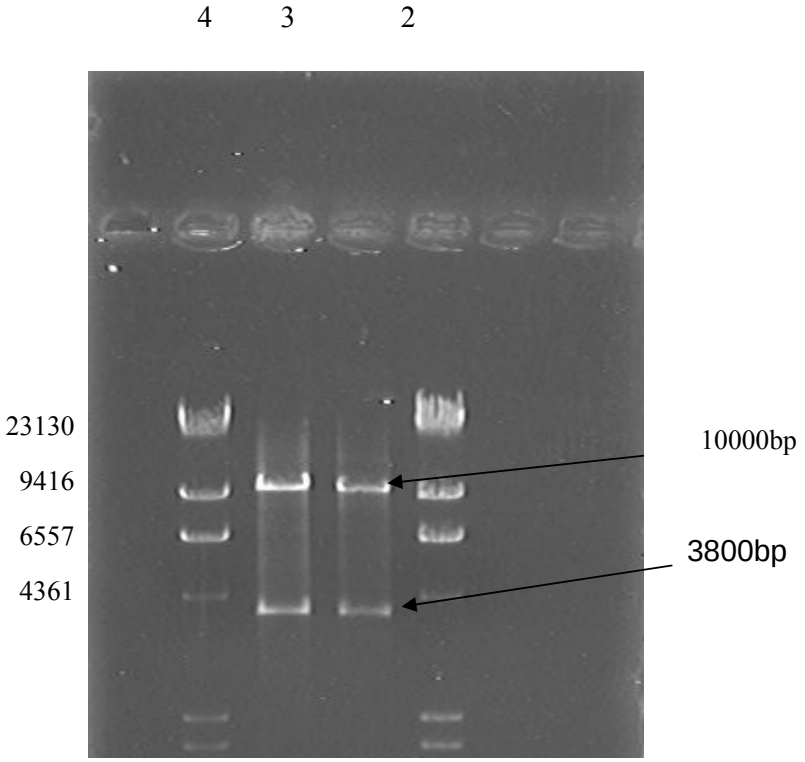
۱ و ۴) مارکر وزن مولکولی II

۲ و ۳) DNA پلاسمیدی بریده شده

باند بالایی وکتور PVLT31 (10kb)

باند پایینی قطعه بریده شده اوپرون سولفورزدایی (3.8kb)

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019



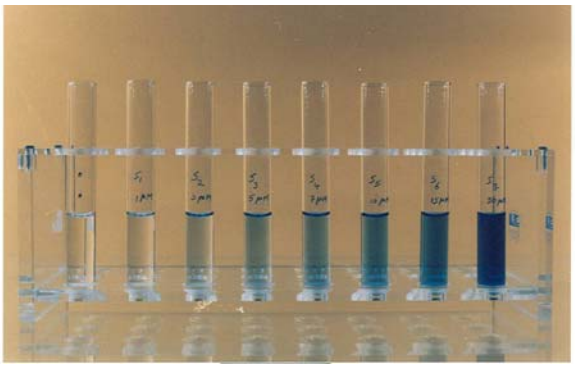
شکل ۵. تکثیر قطعات ژنی (dsz A, B) با استفاده از PCR

خطوط ۱۰، ۹، ۸ و ۷) قطعات ژن AB به‌دست آمده از PE SOX4 به‌عنوان کنترل مثبت

خطوط ۶ و ۵) E.coli DH5α فاقد اپرون سولفورزدایی به‌عنوان کنترل منفی

خطوط ۲، ۳ و ۴) قطعات ژن AB به‌دست آمده از E.coli DH5α SOX3

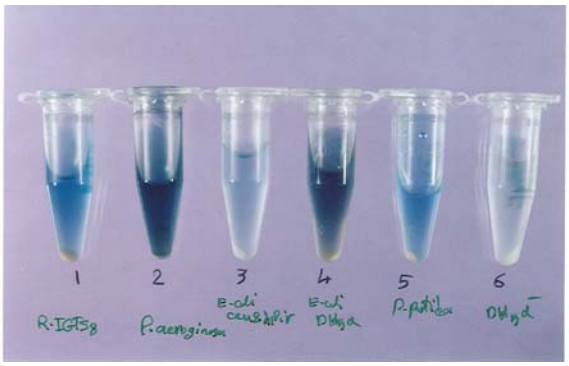
خط ۱) مارکر وزن مولکولی III



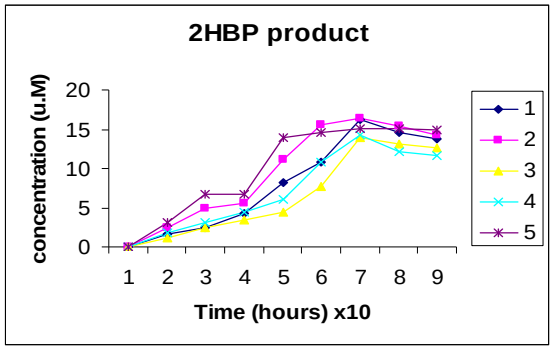
شکل ۶. نتایج تست گیبس کیفی از چپ به راست: رودوکوکوس اریتروپولیسIGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، اشریشیا کلی CC118λpi SOX4، اشریشیا کلی DH5α SOX3، سودوموناس پوتیدا EGSOX و اشریشیا کلی- DH5α

برای به‌دست 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 هریک از غلظت‌ها ۱۰µl معرف گیبس اضافه شد (شکل ۷) و سه ساعت در ۳۰^{oc} قرار گرفت. طول موج هر یک از استانداردها در ۶۰۰ nm قرائت شد و منحنی جذب بر حسب غلظت ماده استاندارد به‌دست آمد (جدول ۱)؛ سپس با استفاده از منحنی استاندارد و جذب به‌دست آمده در تست گیبس، میزان تولید 2HBP در باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه یک منحنی بر اساس میزان تولید 2HBP برحسب میکرومولار در واحد زمان رسم گردید و منحنی‌های مختلف با هم مقایسه شدند (نمودار ۱).

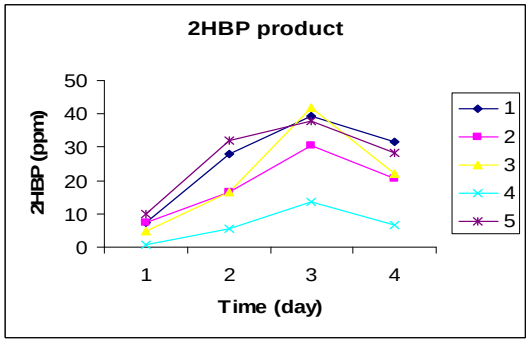
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019



شکل ۷. نمونه‌های استاندارد میزان ۰، ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکرومول از2HBP 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 اریتروپولیسIGTS8، ۲- سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، ۳- سودوموناس پوتیدا EGSOX، ۴- اشریشیا کلی SOX4 CC118λpi، ۵- اشریشیا کلی SOX3 DH5α برای تولید 2HBP برحسب میکرومولار در واحد زمان نشان داده شد



نمودار ۲. مقایسه منحنی‌های 2HBP به‌دست آمده از سویه‌های ۱- سویه نوترکیب اشریشیا کلی SOX3 DH5α، ۲- سویه رودوکوکوس اریتروپولیسIGTS8، ۳- سویه سودوموناس آئروژینوزا EGSOX، ۴- سویه سودوموناس پوتیدا EGSOX و ۵- سویه اشریشیا کلی SOX4 CC118λpir

همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود تقریباً با کتری مهندسی شده اشریشیا کلی SOX3 DH5α، مثل سودوموناس آئروژینوزا EGSOX فعالیت مطلوبی در جهت تولید 2HBP دارد.

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 اسکاندیناوی, اروپای غربی, آمریکا و ژاپن در طی نشستی در سال ۱۹۹۴ قانونی را به تصویب رساندند که بر طبق آن لازم است به‌طور پیش‌رونده درصد گوگرد ترکیبات پتروشیمی کاهش یابد [ ]. از طرف دیگر از آن‌جایی‌که 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, هیدرودسولفوریزاسیون (HDS) می‌باشد. هیدرودسولفوریزاسیون تحت فشار بالا ($۱۵۰-۳۰۰۰ Ib/in^2$) و دمای بالا $۲۹۰-۴۵۵^{oc}$ و استفاده از گاز هیدروژن در حضور کاتالیزور فلزی برای تبدیل گوگرد موجود در ترکیبات نفتی به سولفید هیدروژن (H_2S) 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.

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

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 میکروارگانیسم ها با تخریب باندهای کربن- کربن قادرند DBT را به CO_2 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 بی‌فنیل تبدیل نماید.

باکتری رودوکوکوس اریتروپولیس IGTS8، یکی از اولین سویه‌هایی است که مطالعات گوگردزدایی در مورد آن به انجام رسیده و ژن‌های گوگردزدا 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 قرارگرفته 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 بی‌فنیل (2HBP) و سولفیت می‌باشد. هر دو منواکسیژناز Dsz A, C به NADPH (نوکلئوتید 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 ریکامبیننت، 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 (PVLT31) تحت کنترل پروموتور tac به سویه E.coli DH5α 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 اشریشیا کلی DH5α SOX3 با باکتری‌های رودوکوکوس اریتروپولیسIGTS8، سودوموناس آئروژینوزا EGSOX4، سودوموناس پوتیدا EGSOX4 و اشریشیا کلی CC118λpir 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

Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 19:41 +0330 on Tuesday February 19th 2019

اشریشیا کلی DH5α SOX3، 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 گوگردزدایی 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 اپتیمم را به‌دست آورد و در مرحله بعد میزان بیان و فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر ۴s در شرایط کشت انبوه و در محیط فرمانتور بررسی خواهد شد و شرایط برای استفاده صنعتی از این سویه‌ها فراهم خواهد گردید. ۲-هیدروکسی بای‌فنیل (2HBP) به‌عنوان محصول نهایی در محیط تجمع یافته که تأیید حضور آن در محیط کشت با استفاده از تست گیبس کیفی و ظهور رنگ آبی مشخص شد که با نتایج آزمایشات Oldfild در سال ۱۹۹۷مطابق است؛ اما به دلیل این‌که معرف گیبس 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 نوترکیب هم دارای فعالیت سولفورزدایی هست و با مقایسه با باکتری‌های مذکور توان گوگردزدایی آن تقریباً برابر سودوموناس آئروژینوزا EGSOX است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط پژوهش‌گاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست‌فن‌آوری 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 زیست‌فن‌آوری 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, Kehrli 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, Shimao 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.